



**HAL**  
open science

# Activité antifongique et antimycotoxines d'huiles essentielles tunisiennes sur des souches de *Fusarium* productrices d'enniaines et évaluation de leur potentialisation par nanoencapsulation

Yasmine Chakroun

## ► To cite this version:

Yasmine Chakroun. Activité antifongique et antimycotoxines d'huiles essentielles tunisiennes sur des souches de *Fusarium* productrices d'enniaines et évaluation de leur potentialisation par nanoencapsulation. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux; Université de Carthage (Tunisie), 2022. Français. NNT : 2022BORD0165 . tel-03814696

**HAL Id: tel-03814696**

**<https://theses.hal.science/tel-03814696>**

Submitted on 14 Oct 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX  
ET DE L'UNIVERSITÉ DE CARTHAGE**

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

ÉCOLE DOCTORALE de l'industrie agroalimentaire

SPÉCIALITÉ Microbiologie-Immunologie

Par Yasmine CHAKROUN

**« Activité antifongique et antimycotoxines d'huiles essentielles tunisiennes sur des souches de *Fusarium* productrices d'enniaines et évaluation de leur potentialisation par nanoencapsulation »**

Sous la direction de Mr. SAVOIE Jean-Michel

et de Mr. ABDERRABBA Manef

Soutenue le 12 Mai 2022

Membres du jury :

Mme Florence MATHIEU, Professeure, Université de Toulouse, Présidente de jury

M. Jean-Michel SAVOIE, Directeur de recherche, INRAE , Directeur de thèse

Mme Nourhène MIHOUBI BOUDHRIOUA, Professeure, Université de la Manouba, Institut Supérieur de Biotechnologie, Rapporteur

Mme Angélique FONTANA, Maître de conférences, UMR Qualisud-Polytech Montpellier - Université de Montpellier, Rapporteur

M. Manef ABDERRABBA, Professeur, Université de Carthage, Directeur de thèse

M. Fethi MOUSSA, Professeur émérite, Université Paris Saclay, Examineur



*A mes parents*

*A mon frère*

*A mon chéri*





# Remerciements

*Alors que je conclue la rédaction des dernières pages de ce manuscrit, je me remémore toutes les personnes qui m'ont soutenue durant ce projet de thèse. Nombreuses ont été les rencontres qui m'ont permis d'accroître mes connaissances et nombreuses seraient les personnes à remercier. Je tiens donc à m'excuser d'avance auprès des personnes que je n'aurais pas eu la délicatesse de citer.*

*En premier lieu, je tiens à remercier fortement mes deux encadrants et directeurs de thèse, Mr Jean-Michel SAVOIE et Mr Manef ABDERRABA, pour leur soutien indéfectible, leur disponibilité et la pertinence de leurs remarques et de leurs conseils. Je tiens particulièrement à vous exprimer ma gratitude pour votre bienveillance et votre écoute dans les moments les plus difficiles, notamment quand rien ne s'est déroulé comme prévu. Vous avez su me rassurer et m'encourager à donner le meilleur de moi-même.*

*Je tiens à présenter mes remerciements les plus sincères aux membres du jury pour leur implication dans l'évaluation de mes travaux.*

*Tout au long de cette thèse en cotutelle, j'ai eu la chance d'être membre de deux unités de recherches : l'unité MycSA-INRAe Nouvelle Aquitaine et le laboratoire LMMA-IPEST. Je remercie les membres des deux unités de m'avoir accueillie parmi eux.*

*Ainsi, je souhaite remercier Florence Richard-Forget pour m'avoir aiguillée avec ses conseils techniques et son expertise qui m'ont permis de canaliser mes travaux de thèse.*

*Je remercie également Olfa BACHROUCH pour son écoute et son aide précieuse dans tous les travaux d'extraction et de caractérisation des huiles essentielles. Je la remercie infiniment pour ses qualités humaines et pour les échanges que nous avons eus tant professionnels que personnels qui m'ont été d'une grande aide.*

*Je tiens par ailleurs à remercier Vessela et Sylvain pour la qualité de leur encadrement sur le volet des analyses biochimiques. Je les remercie pour la bonne humeur qu'ils ont apportée à mon quotidien, notamment Sylvain pour son humour décalé et ses taquineries et Vessela pour sa bonne humeur et sa joie de vivre contagieuse.*

*Je remercie Magalie pour son aide technique précieuse, ses conseils qui ont sauvé pas mal de mes expérimentations et qui m'ont épargné pas mal de mésaventures. Je la remercie pour son humeur joyeuse et de son écoute dans les moments difficiles.*

*Je remercie Fabien pour toutes les discussions enrichissantes partagées ensemble et qui nous ont permis de refaire le monde à multiples reprises.*

*Je souhaite à exprimer spécialement ma reconnaissance à Mounia qui m'a été d'un soutien immense aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Je la remercie infiniment de m'avoir*

*accueillie et traitée comme un membre de sa famille et d'avoir été présente dans les bons moments comme les mauvais.*

*Je tiens à remercier également Sandrine et Christophe pour leur immense aide dans les tracas de la vie quotidiennes notamment pour leur écoute et leurs conseils inestimables.*

*Je désire exprimer ma reconnaissance à Youssef pour m'avoir accompagnée durant ce projet de thèse sur le volet de la nano-synthèse et la nanoencapsulation. Je le remercie pour le partage de son savoir technique.*

*Je remercie les doctorants, Imen, Najet, Imen, Aurélie, Valentin, Jean-Marie, Antoine, Diane et Zhenhui, que j'ai pu côtoyer durant ces années de thèse et avec qui, le partage des mêmes difficultés, nous a rapprochés.*

*Un grand merci à mes parents qui n'ont cessé de me combler de leur amour. Sans leur soutien et leur confiance, je ne serais pas là où je suis aujourd'hui. Merci d'être présents dans ma vie.*

*Je remercie également mon « petit » frère pour son écoute, sa bienveillance et son soutien. Merci pour tous les fous rires que nous avons partagés ensemble et qui ont égayé mes journées.*

*Il me reste encore à remercier mes amies, Donia, Mouna, Mariem, Hejer, Rania et Emna, pour avoir été là sans me voir et pour être toujours là encore après...*

*Enfin, je tiens à exprimer mon infinie reconnaissance à celui qui partage ma vie et qui m'a soutenu tout au long de ses années de thèse dans les moments de doutes, de stress et d'angoisse. Je te remercie de m'avoir toujours encouragé, cru en moi et de, surtout, supporté mes sauts d'humeur dans les moments difficiles. Un grand merci à toi mon chéri d'avoir été là et de m'avoir couvert de ton affection.*



## Publications scientifiques

Chakroun, Y., Oueslati, S., Atanasova, V., Richard-Forget, F., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2021. ***Ammoides pusilla* Essential Oil: A Potent Inhibitor of the Growth of *Fusarium avenaceum* and Its Enniatin Production.** *Molecules* 26, 6906. doi :10.3390/molecules26226906

Chakroun, Y., Atanasova, V., Jallouli, S., Oueslati, S., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2021. **Tunisian Thyme essential oil for controlling enniatins producing *Fusarium* species.** *Journal of International Scientific Publications : Agriculture & Food* 9, 221–230. <https://www.scientific-publications.net/en/article/1002161/>

Chakroun, Y., Oueslati, S., Pinson-Gadais, L., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2022. **Characterization of *Fusarium acuminatum*: a potential enniatins producer in Tunisian wheat.** *Journal of Fungi*, 8, 458. <https://doi.org/10.3390/jof8050458>.



## Communications scientifiques

### *Communication orale :*

Chakroun, Y., Atanasova, V., Jallouli, S., Oueslati, S., Abderrabba, M., Savoie, J.-M. **Essential oils from Tunisian aromatic plants for controlling enniatins producing *Fusarium* species.** AGRICULTURE & FOOD, 9<sup>th</sup> International Conference, Burgas, Bulgaria, 16-19 August 2021

### *Présentation poster :*

Chakroun Y., Atanasova V., Jallouli S., Oueslati S., Abderrabba M., Savoie J.M. **Inhibitory efficiency of *Ammoides pusilla* essential oil on mycelial growth and enniatins production of *Fusarium avenaceum*.** 15<sup>th</sup> European *Fusarium* Seminar, Ghent, Belgium, May 31 - June 1, 2021





# Table des matières

<b>Avant-propos</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>I. La fusariose du blé</b> .....	<b>9</b>
1. La FHB : Origine et causes.....	10
2. Les principales espèces fongique responsable de la FHB .....	12
3. Les mycotoxines de <i>Fusarium</i> et les règlementations sanitaires associées .....	15
4. Moyens de contrôle de la contamination des céréales par la Fusariose et ses mycotoxines.....	22
<b>II. Régulation de la production des mycotoxines sous l'action des huiles essentielles</b> .....	<b>25</b>
1. Définition et origine des huiles essentielles : .....	25
2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles : .....	26
3. Composition des huiles essentielles : .....	27
4. Limites d'utilisation des huiles essentielles : .....	28
5. Activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles sur des espèces de <i>Fusarium</i> .	29
<b>III. Potentialisation des huiles essentielle par nanoencapsulation</b> .....	<b>31</b>
1. La nanoencapsulation : avantages pour la potentialisation des huiles essentielles .....	31
2. Choix des matériaux d'encapsulation : .....	32
3. Techniques d'encapsulation des huiles essentielles : .....	33
4. Application de la nanoencapsulation des huiles essentielles en traitement antifongique contre la fusariose et sa production de mycotoxines.....	36
<b>IV. Projet de thèse</b> .....	<b>38</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>41</b>
<b>I. Isolement de souches fongiques à partir de grain de blé et préparation de cultures monosporales</b> .....	<b>43</b>
1. Méthode Ulster .....	43
2. Culture monosporale .....	44
<b>II. Préparation de l'inoculum</b> .....	<b>44</b>
<b>III. Milieux et conditions de culture</b> .....	<b>45</b>
<b>IV. Extraction des TCTB et des enniatines</b> .....	<b>45</b>
1. A partir de grain .....	45
2. En milieu liquide.....	46
3. En milieu gélosé.....	46
<b>V. Dosage des TCTB et des enniatines</b> .....	<b>46</b>

1.	Enniatines .....	46
2.	TCTB.....	47
<b>VI.</b>	<b>Extraction de l'ADN et PCR.....</b>	<b>48</b>
<b>VII.</b>	<b>Extraction des huiles essentielles .....</b>	<b>50</b>
<b>VIII.</b>	<b>Caractérisation des huiles essentielles .....</b>	<b>50</b>
<b>IX.</b>	<b>Evaluation de l'activité des huiles essentielles .....</b>	<b>51</b>
1.	Dans le milieu liquide .....	51
2.	Dans le milieu gélosé .....	51
3.	En fumigation .....	52
<b>X.</b>	<b>Synthèse, imprégnation et enrobage des nanosupports .....</b>	<b>52</b>
1.	Synthèse de la silice mésoporeuse .....	52
2.	Encapsulation des huiles essentielles .....	53
3.	Dépôt de la couche externe de chitosane.....	53
<b>XI.</b>	<b>Caractérisation des nanoproduits et suivi du largage .....</b>	<b>54</b>
1.	Caractérisation .....	54
2.	Suivi du largage de l'huile essentielle.....	54
<b>XII.</b>	<b>Evaluation de l'activité des nanoproduits .....</b>	<b>55</b>
<b>Chapitre I : Isolement et identification de souches de <i>Fusarium</i> productrice d'enniatiens .59</b>		
<b>I.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>59</b>
<b>II.</b>	<b>« Characterization of <i>Fusarium acuminatum</i>: a potential Enniatins producer in Tunisian wheat » .....</b>	<b>60</b>
1.	Introduction .....	60
2.	Materials and Methods .....	61
3.	Results.....	65
4.	Discussion.....	70
5.	Conclusions .....	73
	References.....	74
<b>III.</b>	<b>Synthèse.....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre II : Evaluation de l'activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles originaires de la Tunisie.....83</b>		
<b>I.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>83</b>
<b>II.</b>	<b>« <i>Ammoides pusilla</i> essential oil: a potent inhibitor of the growth of <i>Fusarium avenaceum</i> and its enniatins production » .....</b>	<b>84</b>
1.	Introduction .....	84
2.	Results.....	88

3. Discussion.....	93
4. Materials and Methods .....	96
5. Conclusions .....	98
References.....	99
<b>III. « Tunisian thyme essential oil for controlling enniatins producing <i>Fusarium</i> species » ..</b>	<b>103</b>
1. Introduction .....	103
2. Materials and Methods .....	104
3. Results.....	105
4. Discussion.....	109
5. Conclusions .....	110
References.....	111
<b>IV. Synthèse.....</b>	<b>113</b>
<b>Chapitre III : Nanoencapsulation de l'huiles essentielles d'<i>Ammoides pusilla</i> et de <i>Thymus capitatus</i> .....</b>	<b>118</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>118</b>
<b>II. « Mesoporous silica nanoparticles for the encapsulation of essential oils and improvement of their activity against <i>Fusarium avenaceum</i> and its production of mycotoxins ; enniatins » ..</b>	<b>119</b>
1. Introduction .....	120
2. Materials and methods.....	122
3. Results.....	126
4. Discussion.....	133
5. Conclusion.....	136
Bibliography.....	138
<b>III. Synthèse.....</b>	<b>141</b>
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>145</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>156</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>159</b>



# Table des figures et des tableaux

## Introduction

<b>Figure 1:</b> Cycle de développement des <i>Fusarium</i> responsables de la FHB.	11
<b>Figure 2 :</b> Les principales espèces de <i>Fusarium</i> responsables de la FHB et leurs mycotoxines	13
<b>Figure 3 :</b> Distribution des espèces de <i>Fusarium</i> et de <i>Microdochium</i> dans des grains de blé tendre (BT) et blé dur (BD) collectés en France en 2008, 2009 et 2010.	14
<b>Figure 4 :</b> Occurrence des espèces impliquées dans la FHB	15
<b>Tableau 1 :</b> Toxicité des principales mycotoxines réglementées des céréales	16
<b>Figure 5 :</b> Voie de biosynthèse des trichothécènes	17
<b>Tableau 2 :</b> Limites maximales de concentrations en mycotoxines dans les céréales, définies par les règlements (EC) No 1881/2006 et (EC) No 1126/2007 et évolutions en discussion (SANTE/10242/2021)	19
<b>Figure 6 :</b> Structure des enniatines (ENN) et de la beauvericin (BEA). (A) Structure cyclohexadepsipeptidique générale, (B) Nature chimique des groupements R1, R2 et R3, (C) Structures chimiques des groupements R1, R2 et R3	21
<b>Figure 7 :</b> Occurrence (%) et concentrations ( $\mu\text{g/Kg}$ ) des enniatines dans différentes céréales sur le continent européen	22
<b>Figure 8 :</b> Bonnes pratiques pour réduire les risques de l'accumulation des mycotoxines	23

## Matériels et méthodes

<b>Tableau 1:</b> Variétés de blé tunisien échantillonnées et leurs années de récoltes	43
<b>Tableau 2:</b> Gradient d'élution pour l'analyse des enniatines par UPLC-DAD (solvant A : d'eau ultra pure, solvant B : acétonitrile)	47
<b>Tableau 3 :</b> Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des TCTB par HPLC-DAD (solvant A : d'eau ultra pure, solvant B : acétonitrile)	48
<b>Tableau 4 :</b> Paramètres d'amplification de la PCR	49
<b>Tableau 5 :</b> Caractéristiques des amorces utilisées pour les gènes de références	49
<b>Figure 1 :</b> Mécanisme générale de la synthèse d'une silice mésoporeuse de type MCM-41	53

## Chapitre I

<b>Table 1.</b> List of primers used in the work	64
<b>Table 2.</b> Levels of enniatin analogues ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) in Tunisian wheat grains from different varieties comparing crop years (2017 vs. 2018) and cultures (Durum vs. Bread varieties).	65
<b>Figure 1.</b> Morphological characteristics of <i>Fusarium</i> sp. isolated from asymptomatic Tunisian durum wheat grains. Observation of mycelial colonies and macroconidia grown on PDA. A) 3T isolate representing the first morphotype after incubation at 25°C for 7 days. B) 32T isolate representing the second morphotype, after incubation at 25°C for 11 days. Spores were observed under an optical stereomicroscope (magnification 2000x).	66
<b>Figure 2.</b> Growth kinetics and mycelial colonies aspects of four isolated <i>Fusarium</i> strains (A=3T, B=4T, C=32T and D=33T) on PDA and FDM-agar media. Values are means of 3 replicates. Error bars are $\pm$ standard deviation.	67

- Figure 3.** Dendrogram of similarity and difference of b-tub gene fragment sequences of the studied *Fusarium* species (species name and sample number are given) constructed using the UPGMA method. Stability was determined by bootstrap analysis (100 alternative dendrograms), the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) are shown next to the branches 68
- Figure 4.** Accumulation of enniatins by *F. acuminatum* 32T and 33T in different culture media measured after 11 days of culture at 25 °C. (A) = culture in FDM liquid medium, (B) = culture on PDA and FDM-agar medium. Values are means of triplicates. Error bars are ± standard deviation. Means with the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ). 68
- Figure 5.** Susceptibility of *F. acuminatum* 33T to the antifungal activity of a set of essential oils from eight Tunisian plants diluted at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  in FDM-agar, incubated at 25 °C for 10 days. 69
- Figure 6.** Effect of essential oils (EO) extracted from eight Tunisian plants, diluted at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  FDM-agar, on the production of enniatins by *F. acuminatum* 33T. 70
- Table S1:** Molecular identification of the *Fusarium* sp. isolates based on ITS and  $\beta$ -tubulin sequence analysis 76
- Figure 7 :** Résultats de l'analyse de la production des TCTB par les deux souches 32T et 33T 78
- Tableau 4 :** Résultats du séquençage génétique des souches 3T, 4T, 32T et 33T avec les différentes amorces. 78

## Chapitre II

### II. « *Ammoides pusilla* essential oil: a potent inhibitor of the growth of *Fusarium avenaceum* and its enniatins production »

- Table 1.** Published article with data on the effect of EOs on the mycelial growth of *F. avenaceum* 85
- Table 2.** Extraction yield of essential oils from 8 Tunisian aromatic plants. 88
- Figure 1.** Effect of essential oils extracted from eight Tunisian plants used at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  on the mycelial growth (A) and the accumulation of enniatins (B) by *F. avenaceum* 88
- Table 3.** Chemical composition (%) of essential oils of *A. pusilla* using GC-MS 89
- Table 4.** Linear growth index of *F. avenaceum* and ENNs accumulation in presence of different concentrations of AP1 EO 90
- Figure 2.** Mycelial growth of *F. avenaceum* in presence of different quantities of volatile compounds of *A. pusilla* EO (AP1). The volumes in  $\mu\text{L}$  are the quantity of EO per L of air 90
- Table 5.** Linear growth index of *F. avenaceum* and ENNs accumulation after 10 days in presence of different quantities of *A. pusilla* EO (AP1) volatile components 91
- Figure 3.** Mycelial growth of *F. avenaceum* in presence of volatile compounds from 16.7 or 33.3  $\mu\text{L EO L}^{-1}$  in consecutive cultures. A: First exposure to volatiles. B and C: second exposure with the same quantity of EO than in the first exposure of fungal material coming from A as spore suspension (dark bars) or plugs (light bars) (second culture-EO). D and E: second culture without EO of fungal material coming from A as spore suspension (dark bars) or plugs (light bars);  $\mu\text{L}$  are those of the first exposure (second culture-control). B and D are measures at 10 days, C and E are measures at 28 days 91
- Figure 4.** Changes in sporulation capacity and rate of spore germination after treatment with two concentrations of *A. pusilla* EO for 24 h 92

**Figure 5.** Effect of thymol on the mycelial growth rate (A and C) and production of ENNs (B and D) by *F. avenaceum*. Thymol was either diluted in the culture medium (A and B) or use as a fumigant (C and D)

### III. « Tunisian thyme essential oil for controlling enniatins producing *Fusarium species* »

**Table 1:** Chemical composition (%) of essential oils extracted from two batches of *T. capitatus* (TC1 and TC2) using GC-MS 106

**Figure. 1.** Inhibition of the mycelial growth of *F. avenaceum* by EO of *T. capitatus*, batch 1. A- Photographs of Petri dishes, 5 and 10 days after inoculation in the centre with plugs or spore suspensions of *F. avenaceum* I496; B- Photographs of Petri dishes 5 and 10 days after inoculation by spore suspension of *F. acuminatum*. 33T 107

**Figure. 2.** Surface of mycelial colonies of two *Fusarium spp* strains on FDM-agar media supplemented with *T. capitatus*, batch 2, measured after incubation for 10 d at 25°C. 108

**Table 2.** Concentrations of enniatins (ENNs) released in the medium ( $\mu\text{g}$  per units of mycelial colonies ( $\text{cm}^{-2}$ )), 108

**Figure. 3.** Kinetics of the mycelial growth of *F. avenaceum* on FDM-agar in the presence of volatile components of *T. capitatus* EO (TC2) at different concentrations (0 to 25  $\mu\text{L}$  of EO difusing in 1.5 L jars) 109

### Chapitre III

**Figure 1 :** Nitrogen adsorption-desorption isotherms (A) and pore size distribution (B) of empty mesoporous silica nanoparticles 127

**Figure 2 :** Thermogravimetric analysis (TGA) of (A) empty mesoporous silica nanoparticles, (B) mesoporous silica nanoparticles loaded with AP EO 128

**Figure 3 :** Percentages of the initial weights measured after evaporation of *A. pusilla* and *T. capitatus* EOs formulations at room temperature for 192 hours 129

**Figure 4 :** Release kinetics of AP EO from different formulas in the PBS buffer solution 130

**Figure 5 :** Effects in agar dilution assays of free essential oil of *A. pusilla*, (A, D), essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles (B, E) and essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles coated with chitosan (C, F) on the mycelial growth (A, B, C) and on the production of ENNs, sum of ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1(D, E, F) of *F. avenaceum* I 496I 132

**Figure 6 :** Effect of volatile components of free essential oil of *A. pusilla*, (A, C), and essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles (B, D) on the mycelial growth (A, B) and on the production of ENNs, sum of ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1(C, D) of *F. avenaceum* I 496I 133





## Table des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ATG	Analyse thermogravimétrique
BET	Méthode Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Méthode Barrett-Jorner-Halenda
$\beta$ -tub	Béta-tubuline
CE	Commission Européenne
CI50	Concentration Inhibitrice médiane
CMC	Carboxyméthylcellulose
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DON	Déoxynivalénol
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
ENNs	Enniatines
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDM	<i>Fusarium</i> Defined Medium
FHB	<i>Fusarium</i> Head Blight
FTSC	<i>Fusarium tricinctum</i> species complex
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
HE	Huile essentielle
ITS	Internal transcribed spacer region
MIC	Concentration minimale inhibitrice
MS	Minimum Synthetic Medium
NIV	Nivalénol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
rpm	rotation par minute
TCTB	Trichothécène de type B
TEOS	Tetraethyl Orthosilicate
UPLC-DAD	Ultra High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector
ZEA	Zéaralénone



# *Avant-propos*



La contamination par les mycotoxines est l'un des principaux dangers qui menacent la sécurité alimentaire depuis des décennies. En effet, les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques de faible poids moléculaire (0,3-0,7 kDa) et à forte capacité de bioaccumulation, produits par plusieurs genres de champignons filamenteux tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Fusarium*. La contamination des cultures par ces champignons entraîne une perte économique importante et la contamination par leurs mycotoxines représente un risque significatif pour la santé animale et humaine.

Des mesures strictes ont été mises en œuvre pour faire face à ce danger dans le monde entier. L'OMS et la FAO ont réglementé la quantité autorisée de plusieurs de ces toxines dans plusieurs matrices alimentaires. Au niveau local, de nombreux pays ont adopté plusieurs lois et normes qui réglementent ces occurrences. Par ailleurs, une augmentation de l'occurrence des "mycotoxines émergentes" a été enregistrée dans le monde entier au cours de la dernière décennie. Ce terme englobe les mycotoxines qui ne font pas l'objet d'une surveillance systématique ni d'une réglementation. Les enniatines (ENNs) sont un groupe principal de mycotoxines émergentes produites par plusieurs espèces de *Fusarium* telles que *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum* qui ont été détectées dans diverses denrées alimentaires en grandes quantités. Jusqu'à présent, aucune preuve d'une mycotoxicose aiguë n'a été rapportée, mais la fréquence croissante de l'occurrence des ENNs détectées, leur capacité de bioaccumulation et la synergie possible avec les autres mycotoxines pourraient conduire à de sérieuses préoccupations en matière de sécurité alimentaire.

Différentes stratégies sont mises en place pour réduire la contamination des récoltes par les *Fusarium* spp. et les mycotoxines, de l'application de fongicides chimiques de synthèse au travail du sol et à la rotation des cultures. Cependant, plusieurs études ont démontré les limites de ces stratégies comme la détérioration de la qualité du sol et la résistance des pathogènes aux traitements traditionnels. Le développement de nouvelles alternatives est donc devenu une priorité majeure. L'une des lignes de recherche est l'étude du potentiel fongicide des huiles essentielles. L'utilisation d'huiles essentielles (HE) de plantes pour l'élaboration de produits de protection écologiques présente divers avantages : ce sont des composés volatils agissant à faibles concentrations, de nature biodégradable, éphémère et sont bien acceptés par les consommateurs.

En outre, il a été prouvé que les huiles essentielles ont de multiples applications antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, insecticides, médicinales et cosmétiques.

Malgré les bioactivités prouvées des huiles essentielles, leur volatilité relativement élevée et leur sensibilité à l'oxydation et à l'exposition aux UV rendent leur utilisation à l'état libre peu pratique et réduisent leur activité biologique. Afin d'améliorer les conditions d'utilisation et d'accroître l'applicabilité des formulations bioactives naturelles, les technologies d'encapsulation revêtent une grande importance. Les supports mésoporeux en silice (SMPS) ont été utilisés comme supports inorganiques pour le stockage et la libération de médicaments et de molécules organiques. Parmi les caractéristiques uniques des SMPS figurent une grande stabilité, une biocompatibilité, une porosité homogène, une grande inertie et une facilité de fonctionnalisation.

L'objectif des travaux présentés dans ce document était d'améliorer les connaissances sur la production d'enniatines et leur contrôle possible par des huiles essentielles.

Dans un premier temps, nous avons isolé deux souches de *Fusarium* à partir de grains de blé tunisiens qui étaient hautement productives d'enniatines. Elles ont été identifiées par observation au microscope et analyse de séquences de gènes PCR, comme étant *Fusarium acuminatum*. L'analyse du profil de production des mycotoxines a démontré une production d'enniatines B, B1 et A1.

Ensuite, l'effet de huit HE extraites de plantes aromatiques tunisiennes a été évalué sur la croissance mycélienne de *F. avenaceum* I496 (de la collection INRAE) et de *F. acuminatum* (isolé précédemment) et sur leur production d'enniatines. Les HE d'*Ammoides pusilla* et *Thymus capitatus* ont montré une activité d'inhibition significative de la croissance mycélienne et de la production d'enniatines sur les deux souches et ont été sélectionnées et étudiées pour leur composition et l'activité de leurs composés volatils. Le thymol et le carvacrol ont été identifiés comme les principaux composants des HE d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* respectivement. Pour évaluer l'activité antifongique et antimycotoxines de ces huiles essentielles, nous avons utilisé la méthode de dilution en gélose pour les tests de contact et la fumigation pour cibler l'activité des composants volatils.

Pour la suite du travail, nous nous sommes concentrés sur *A. pusilla* car peu d'études ont été menées sur son huile essentielle. Des investigations ont été menées pour déterminer

l'implication du thymol dans l'activité antifongique et antimycotoxine de l'huile essentielle. Nous avons procédé à l'application des mêmes méthodes précédemment utilisées pour les essais de contact et les essais de fumigation. L'huile essentielle est inhibitrice de la germination des spores et possède un effet fongistatique qui s'atténue au cours du temps, probablement par épuisement en composés actifs et détérioration de l'huile essentielle.

Des nanoparticules mésoporeuses de silice ont été synthétisées, chargées d'huile essentielle d'*A. pusilla* ou d'huile essentielle de *T. capitatus*, puis enrobées de chitosane. La préparation a été testée en suivant le même plan expérimental que celui présenté précédemment. Les résultats ont montré que l'encapsulation dans la silice mésoporeuse (sans revêtement de chitosane) a amélioré l'activité antifongique et antimycotoxines dans les tests de contact et de fumigation. Les nanoparticules de silice mésoporeuse enrobées de chitosane n'ont pas eu d'activité antifongique dans les tests de contact mais se sont révélées avoir une activité antimycotoxine.

Tous ces éléments sont présentés en détail dans ce document sous la forme de 4 articles répartis dans 3 chapitres, après une partie développée de l'état de l'art et une présentation des matériels et méthodes.

Ce travail est issu du projet CMCU 18G0913 / Campus France 39198RK dans le cadre d'une collaboration Tunisie – France financée par le programme PHC-Utique.





# *Introduction*



## I. La fusariose du blé

La production céréalière est une des filières agricoles les plus importantes pour l'alimentation humaine. La consommation céréalière est ancrée dans de multiples traditions et patrimoines culinaires des civilisations. Cette filière agricole est une des piliers de l'économie agricole au niveau mondial et la préservation de sa stabilité relève d'un problème de l'ordre de la sécurité alimentaire mondiale.

De nos jours la filière céréalière est face à de multiples défis d'ampleur, notamment le réchauffement climatique (Doohan et al., 2003; Liu and Van der Fels-Klerx, 2021), la diminution de variabilité génétique (Jia et al., 2020), la croissance de la démographie mondiale (United Nations, 2019) et les contaminations par des agents biologiques (Jedidi et al., 2018). Une des principales contaminations affectant la production céréalière est la contamination par certains champignons filamenteux qui attaquent les cultures au champ quand les conditions favorables sont réunies et se développent dans les grains, affectant les rendements et réduisant leurs qualités organoleptiques et technologiques (Parry et al., 1995; Chekali et al., 2016; Gautier et al., 2020). D'autre part, ces champignons peuvent produire des métabolites secondaires toxiques pour les humains et les animaux d'élevage et de compagnie. Ces métabolites, nommées mycotoxines, sont des substances généralement thermostables, peu labiles et résistantes aux traitements et aux processus de transformation (Bennett and Klich, 2003; Alshannaq and Yu, 2017).

Un des principaux genres fongiques phytopathogènes responsables de ces contaminations est le genre *Fusarium*. Ces phytopathogènes sont responsables de la maladie endémique qui est la fusariose du blé. Cette contamination peut affecter diverses parties de la plante des racines jusqu'à l'épi (Karlsson et al., 2021). Plusieurs types de fusarioses sont ainsi différenciées. Nous parlons de fusariose des racines (Seedling Blight or root rot), de la fusariose du collet (Foot Rot) et de la fusariose des épis (*Fusarium* Head Blight / FHB) pour le blé et autres céréales à petits grains (Parry et al., 1995).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la fusariose des épis ou FHB (*Fusarium* Head Blight).

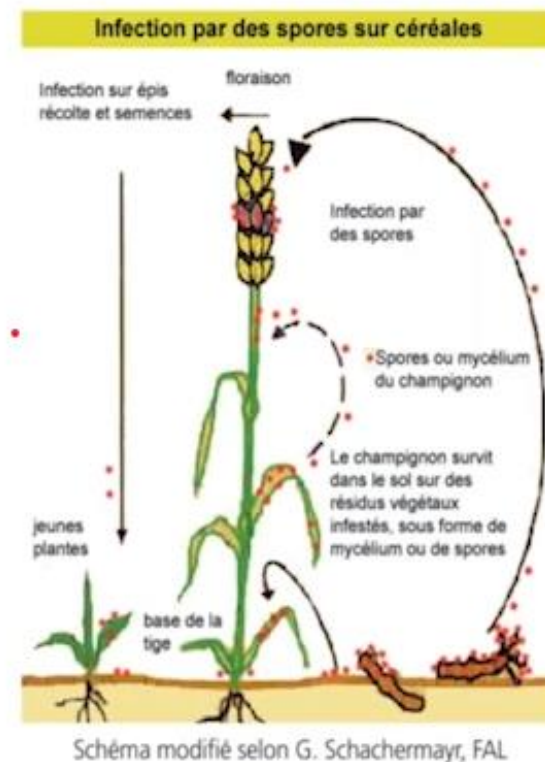
## 1. La FHB : Origine et causes

La fusariose des épis ou *Fusarium* Head Blight (FHB) est une infection fongique causée par des champignons phytopathogènes qui font partie de deux genres taxonomiques : *Fusarium* et *Microdochium* (Parry et al., 1995; Glynn et al., 2005; Wegulo et al., 2015). Cette maladie contamine les céréales à petits grains (blé, orge, avoine, ...) ainsi que le maïs (Ferrigo et al., 2016) ce qui confère à cette infection un fort impact d'ordre agroéconomique.

La description de la fusariose de l'épi a été faite pour la première fois en 1884 par W. G. Smith qui la nommée « la gale du blé » (Wheat scab). Cette dénomination a été modifiée en un premier temps en 1920 par Atanasoff en « maladie de *Fusarium* » (*Fusarium* blight) et par la suite en Fusariose par Douin en 1926 (Goswami and Kistler, 2004). La FHB est une maladie des céréales dévastatrice et peut contaminer une large partie de la culture quelques semaines avant la récolte. Le cycle de vie des agents fongiques responsables de cette contamination a été décrit pour seulement certaines espèces de *Fusarium* dont le plus connu est celui du *Fusarium graminearum* (Figure 1)(Trail, 2009). Des spores matures se déposent au niveau des épis de blé à la saison de la floraison et commencent à germer et envahir les anthères des fleurs. Le champignon évolue alors à l'intérieur de ces dernières et colonise la graine en formation. La pénétration du *Fusarium* dans les fleurs peut aussi se faire à travers les ouvertures naturelles telles que les stomates, les lésions et blessures et la base de l'épillet (Champeil et al., 2004). Le réseau mycélien se développe alors à l'intérieur de l'épillet pour atteindre les ovaires 24 à 26 heures après l'inoculation. L'infection atteint ensuite le rachis et la tige et commence à se reprendre aux épillets adjacents (Walter et al., 2010). Les symptômes commencent à apparaître à partir de 2 à 4 jours après l'inoculation suite à la colonisation intracellulaire et nécrotrophe de la part du champignon, ce qui résulte en un blanchiment des zones infectées (Christ et al., 2011). L'infection en se propageant à travers le rachis cause un dysfonctionnement dans le système vasculaire de la plante qui s'associe à une maturation précoce de la partie de l'épi supérieure à l'infection (Argyris et al., 2005). Plus l'infection a lieu tôt dans le développement des grains de blé, plus ils sont atrophiés voire même absents. Les grains atteints sont décolorés avec un aspect chétif, rugueux et peuvent présenter un duvet blanc ou rose (Wegulo, 2012). Lors de l'infection, le champignon utilise les ressources glucidiques des grains modifiant de la sorte la composition finale des grains atteints qui présentent des teneurs en amidon et en protéines de réserves bien inférieures à celles enregistrées chez les grains sains. Le changement d'aspect et de composition des grains infectés réduit leurs qualités

technologiques lors de la transformation des céréales (mouture, panification, malterie...) en plus de la baisse du rendement de récolte (Pirgozliev et al., 2003). De surcroît, les infections fusariennes sont aussi souvent synonymes de présences de mycotoxines dans les grains de blé.

Après les récoltes, l'agent pathogène survit, pendant l'hiver et tout au long du cycle cultural, dans le sol sur les résidus végétaux sous forme de chlamydospores qui peuvent infecter les semis et causer la fusariose des racines (Seedling Blight or root rot) ou bien atteindre le collet et causer la fusariose du collet (Foot Rot) (Asran and Eraky, 2012). Les résidus et les semis infectés constituent l'inoculum primaire pour les prochaines cultures. Des ascospores et/ou des conidies sont libérées à la fin de la période hivernale et sont disséminées par le vent ou par effet « splashing » (dispersion par la pluie de feuille en feuille) ou bien par des insectes pour être acheminées vers les fleurs au niveau des épis en saison de floraison (Parry et al., 1995).



**Figure 1:** Cycle de développement des *Fusarium* responsables de la FHB.

Webinaire Phytocontrol – Mycotoxines, 22 avr 2021

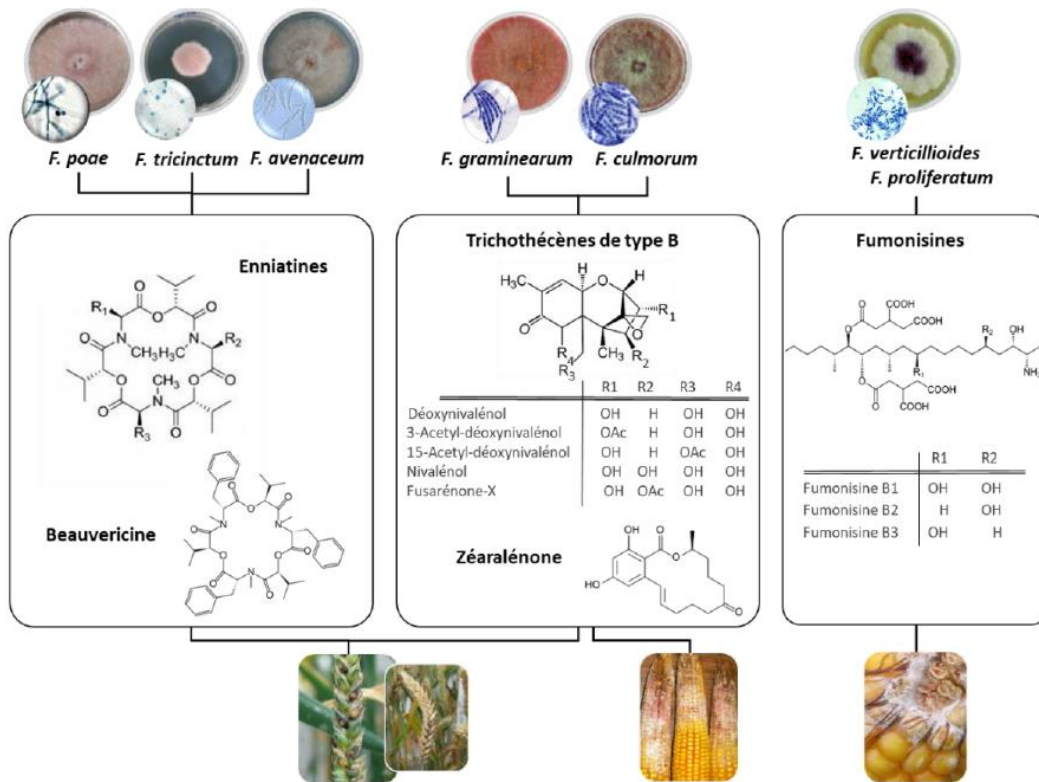
(<https://www.youtube.com/watch?v=knZQBY6W-co>)

## 2. Les principales espèces fongique responsable de la FHB

La fusariose du blé est causée par les espèces fongiques de *Fusarium spp.* et de *Microdochium spp.* Le genre *Microdochium* appartient à la famille des Tuberculariacées et regroupe deux espèces, *M. nivale* et *M. majus* (Glynn et al., 2005). Il n'a pas été démontré dans la littérature que ces deux espèces produisent des mycotoxines. L'infection par ces deux espèces provoque les mêmes symptômes sur épis et sur feuilles que ceux résultant d'une infection par les *Fusaria*.

Le genre *Fusarium* a été décrit pour la première fois par Link en 1809. Sa nomination a comme origine le mot *fusus* en latin signifiant fuseau et ceci en rapport avec la forme de fusiformes de ses macroconidies. Le genre *Fusarium* est classé dans la division Ascomycètes appartenant à la famille des Nectriaceae. Les études ont montré que plus que 15 espèces fusariennes différentes sont susceptibles d'infecter le blé et causer des ravages en réduisant le rendement de récolte (comme décrit précédemment) et en contaminant les grains avec des mycotoxines nocives à la santé humaine et animale (Leslie and Summerell, 2006). Il a été observé que de multiples espèces peuvent coexister dans un seul champ, un seul épi ou voire même un seul grain (Smith et al., 2016).

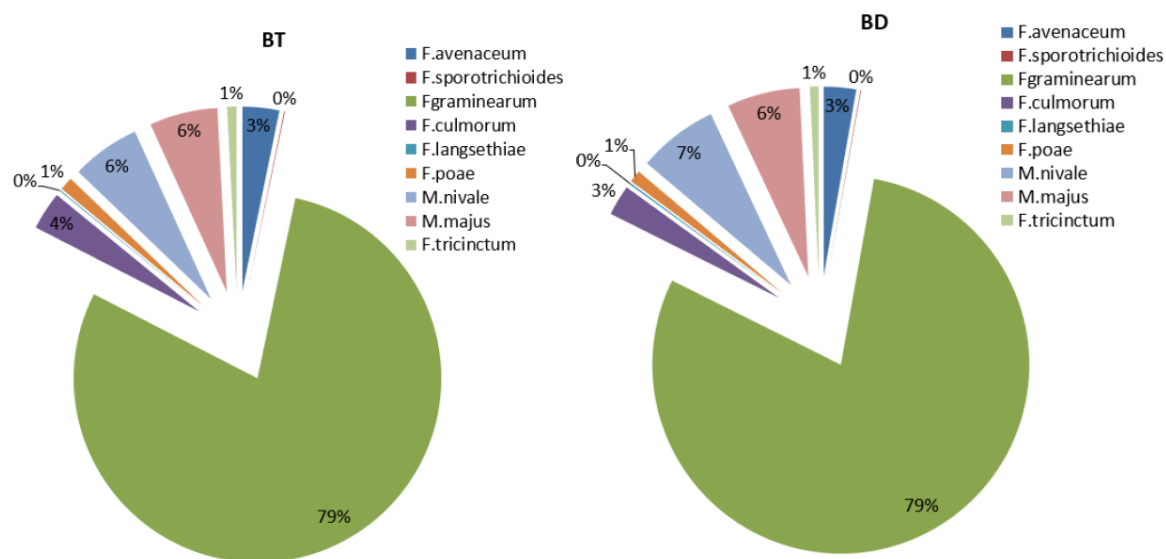
Les principales espèces de *Fusarium* qui induisent la FHB sont les suivantes : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. proliferatum* (Figure 2) (Parry et al., 1995; Xu and Nicholson, 2009; Ferrigo et al., 2016). L'espèce fusarienne qui a été la plus décrite pour son implication dans la contamination du FHB est *F. graminearum* dans les régions qui ont un climat plutôt tempéré et *F. culmorum* pour les régions avec un climat plutôt frais et humide (Doohan et al., 2003).



**Figure 2:** Les principales espèces de *Fusarium* responsables de la FHB et leurs mycotoxines  
(L. Pinson, communication personnelle)

En France, un Projet ANR DON&Co (ANR-10-CESA-0012) a été conduit pour se pencher sur l'étude des sept espèces fusariennes précédemment citées ainsi que les deux espèces du genre *Microdochium* présentes chez le blé dur et le blé tendre (étude effectuée à l'unité de recherche MycSA). En effet, 300 échantillons de grains récoltés durant les années 2008, 2009 et 2010 ont été analysés pour quantifier la présence de l'ADN fongique des espèces citées.

Les résultats montrent une présence significativement importante de *F. graminearum* avec un pourcentage de 79% chez les deux types de blé suivi par les deux espèces du genre *Microdochium* et par la suite nous retrouvons *F. culmorum* et *F. avenaceum* avec des proportions très proches chez les deux types de blé (Figure 3).

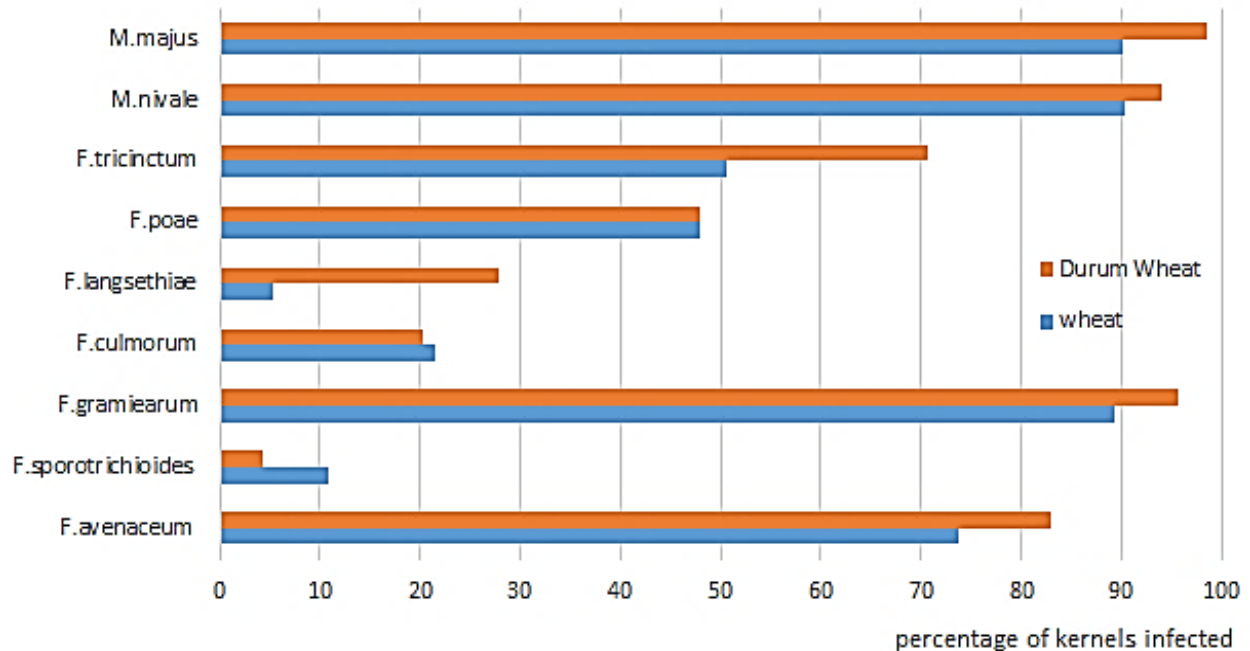


**Figure 3:** Distribution des espèces de *Fusarium* et de *Microdochium* dans des grains de blé tendre (BT) et blé dur (BD) collectés en France en 2008, 2009 et 2010.

(INRAe-MycSA – Projet ANR DON&Co)

Une étude complémentaire a été faite, dans le cadre de ce même projet, dans le but de déterminer la fréquence de la contamination de ces espèces dans les grains testés. Il a été démontré que les espèces *M. majus* et *M. nivale* sont les espèces les plus répandues dans les échantillons testés et chez les deux types de blé avec des taux de contaminations dépassant les 94% (Figure 4). Dans le cas des espèces du genre *Fusarium*, *F. graminearum* a été détectées dans plus de 85% des échantillons du blé tendre et 95% chez le blé dur suivi par *F. avenaceum* et *F. tricinctum* avec des pourcentages entre 70% et 85% dans le cas de *F. avenaceum* et entre 50 et 70% dans le cas de *F. tricinctum*. Elles appartiennent au ‘*Fusarium tricinctum* species complex’ (FTSC). *Fusarium avenaceum* et *Fusarium acuminatum*, un autre membre du FTSC, sont trouvés de plus en plus souvent parmi les pathogènes prévalents des céréales à petit grains en Amérique et dans le sud de l’Europe. Les membres du FTSC produisent des mycotoxines dites émergentes que sont la beauvericine, les enniatines et la moniliformine (Jestoi, 2008; Urbaniak et al., 2020). Une analyse phylogénétique récente montre la grande diversité d’espèces au sein de ce complexe, (Laraba et al., 2022).





**Figure 4:** Occurrence des espèces impliquées dans la FHB  
(INRAe-MycSA– Projet ANR DON&Co)

### 3. Les mycotoxines de Fusarium et les réglementations sanitaires associées

Les mycotoxines sont définies comme des métabolites secondaires produits par certaines espèces fongiques (Prandini et al., 2009). Ces métabolites sont sécrétés lors de l’infection des matrices végétales par le champignon au moment de la floraison dans les épis, lors du transport et du stockage. Ces mycotoxines se diffusent dans la matrice et s’y accumulent. Elles sont actives à faible dose, thermostables, peu labiles et elles résistent aux process de transformations (Bennett and Klich, 2003).

A ce jour, près de 300 mycotoxines sont identifiées et caractérisées dont une trentaine est considérée comme dangereuse pour la santé humaine et animale (Khaneghah et al., 2019). Les principales mycotoxines qui ont suscité l’attention des chercheurs et les acteurs de la filière céréalière dans le monde sont les ochratoxines, les aflatoxines, les alcaloïdes d’ergot, et les fusariotoxines comme les trichothécènes (de type A ou B), les fumonisines et la zéaralénone (Chauhan et al., 2016). La consommation de produits alimentaires contenant ces mycotoxines expose le consommateur soit à une toxicité aigüe (lors de l’ingestion d’une forte dose de toxines durant une courte durée) soit à une toxicité chronique (lors de l’ingestion de faibles doses pendant

une durée prolongée en raison de l'accumulation des toxines dans les denrées alimentaires et leur résistance aux processus de transformation) avec différents effets (Tableau 1) (D'Mello et al., 1999; Agriopoulou et al., 2020). Les trichothécènes ont été mis en évidence comme étant des inhibiteurs de la synthèse des protéines chez les cellules eucaryotes et de l'activation des gènes de défense de la plante (Cumagun et al., 2004; Wagacha and Muthomi, 2008). Ils provoquent aussi des altérations du foie, des reins, du système nerveux central, des dérèglements hormonaux ou encore une réduction des défenses immunitaires. La toxine T-2 est responsable de l'aleucie toxique alimentaire qui se manifeste par des vomissements, une inflammation du tube digestif et peut conduire à la mort du consommateur. Le déoxynivalénol (DON) est la mycotoxine la plus répandue dans les cultures de blé en Europe et a été désignée sous le terme de vomitoxine. Des effets immunotoxiques ont été rapportés suite à son ingestion. La zéaralénone, qui est un analogue d'œstrogène, est responsable d'effets reprotoxiques (Bennett and Klich, 2003; Ferrigo et al., 2016).

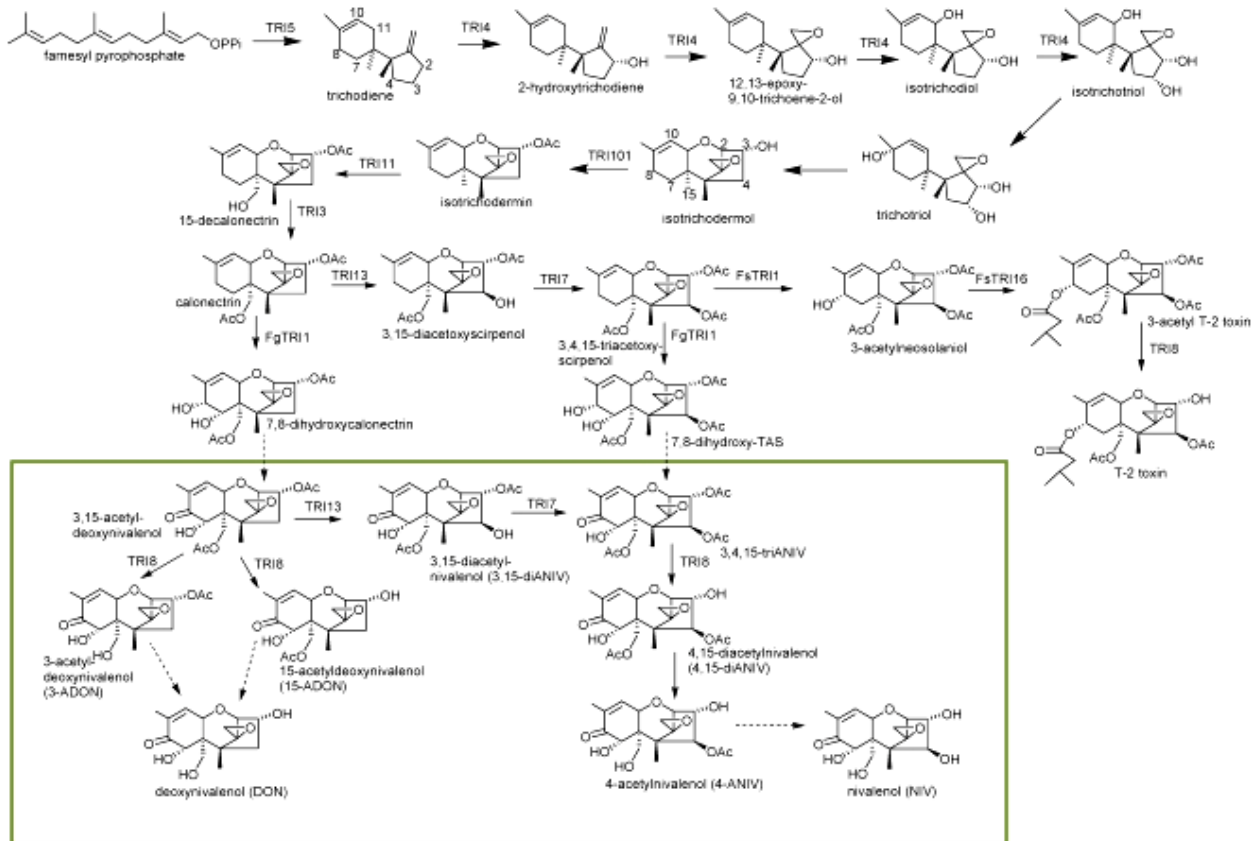
**Tableau 1:** Toxicité des principales mycotoxines réglementées des céréales

	<b>Aflatoxines B</b>	<b>Ochratoxines A</b>	<b>Fumonisines</b>	<b>Trichothécènes</b>	<b>Zearalenone</b>
<b>Cancérogène *</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Génotoxique</b>	✓	✓		✓	
<b>Hépatotoxique</b>	✓	✓	✓		
<b>Immunotoxique</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Néphrotoxique</b>		✓	✓		
<b>Neurotoxique</b>		✓		✓	
<b>Analogue Œstrogène</b>					✓
<b>Tératogène</b>	✓	✓			

\* **Groupe 1** (Cancérogène humains), **Groupe 2B** (possible cancérogène), **Groupe 3** (non classé pour sa cancérogénicité). Remarque : les Aflatoxines et les Ochratoxines ne sont pas produites par des *Fusarium* spp. mais par des *Aspergillus* spp. et des *Penicilium* spp.

Les mycotoxines de types trichothécènes sont des molécules qui ont une structure chimique de sesquiterpènes tricycliques. Leur biosynthèse est un processus complexe de plusieurs étapes successives : oxygénation, isomérisation et estérification (Figure 5) (McCormick et al., 2011). Ces mycotoxines sont dotées d'une double liaison en position C9/C10 et un pont époxyde en position

C12/C13 qui leur confère leur toxicité. Une fonction cétone en position C8 fait la différence entre les trichothécènes de type A et de type B. Dans le cas des fumonisines, la structure de base est une chaîne hydrocarbonée hydroxylée longue qui comporte des groupes méthyle et amine. La zéaralénone a été identifiée comme une lactone de l'acide résorcylique (Bennett and Klich, 2003). Les deux mycotoxines précédemment citées dérivent de la voie des polyacétates.



**Figure 5 :** Voie de biosynthèse des trichothécènes

Les gènes codant pour une étape enzymatique sont identifiés à côté des flèches indiquant l'étape. Les flèches discontinues indiquent des étapes pour lesquelles aucun gène ne lui a encore été assigné. Les molécules identifiées dans le rectangle vert sont les trichothécènes de type B. (McCormick et al., 2011)

Historiquement plusieurs vagues de contamination et d'incidents dont le genre *Fusarium* est le responsable ont été identifiés. En effet, l'un des incidents le plus connu est la tragédie qui a eu lieu à l'union soviétique en 1930 et pendant la deuxième guerre mondiale durant laquelle approximativement cent mille personnes de la ville d'Orenbourg ont trouvé la mort suite à l'ingestion de grains de blé contaminés avec la mycotoxine T-2 (Yli-Mattila, 2011). En l'année 1960, une très forte présence de la mycotoxine T-2 a été enregistrée dans du maïs aux Etats Unis d'Amérique. En raison de la très forte toxicité de certaines mycotoxines de *Fusarium* observée, des suspicions ont même été émises concernant la probable utilisation de ces dernières en tant qu'arme biologique durant les conflits militaires dans les années 70 et 80 en Afghanistan, Laos et le Cambodge (Tucker, 2001). À la fin du 20<sup>ème</sup> siècle des nouvelles vagues de contaminations ont été détectées en Asie, Europe, Canada... et des pertes très importantes de rendements ont été observées (Windels, 2000). Suite à l'occurrence de ces événements importants, une action internationale s'est avérée nécessaire pour la protection de la sécurité alimentaire mondiale.

Les instances sanitaires européennes et d'autres pays ont établi des doses limites maximales réglementaires et recommandées pour certaines mycotoxines que l'on peut retrouver dans les céréales brutes et les produits céréaliers (Tableau 2). Actuellement une évolution de ces règlements est en cours de discussion. Elle comportera des baisses de seuil comme par exemple le passage de 1250 à 1000 µg/Kg pour la DON et l'entrée dans la réglementation de nouvelles céréales comme l'avoine, ou encore la réglementation des toxines T2+HT2 avec des seuils réglementaires inférieurs aux recommandations actuelles (par exemple, baisse à 50 g/Kg pour le maïs). Le prise en compte des formes masquées et des dérivés de DON a été remise à plus tard.

**Tableau 2:** Limites maximales de concentrations en mycotoxines dans les céréales, définies par les règlements (EC) No 1881/2006 et (EC) No 1126/2007 et évolutions en discussion (SANTÉ/10242/2021)

Mycotoxines	Céréales brutes – blé tendre	Céréales brutes – blé dur	Farine	Pâte	Pain
Teneur maximale réglementaire en µg/kg – Février 2022					
<b>DON</b>	1250	1750	750	750	500
<b>ZEA</b>	100	100	75	75	50
<b>OTA</b>	5	5	3	3	3
<b>AFLA</b>	5	5	2	2	0.1
<b>T-2/HT-2</b>	Recommandation 100	Recommandation 200	Recommandation 50	Recommandation 50	Recommandation 50
Teneur maximale réglementaires en µg/kg – Draft en discussion à l'union européenne					
<b>DON</b>	1000	1250	500	500	400
<b>OTA</b>	5	5	3	3	1.5
<b>T-2/HT-2</b>	50	100	20	20	20
<b>Alcaloïdes de l'ergot</b>			150 (cendres>0.9 %) 50 (cendres<0.9 %)		
<b>Sclérotés d'ergot</b>	0.2 g/kg	0.2 g/kg			

(Source : Webinaire Phytocontrol – Mycotoxines, 22 avr 2021

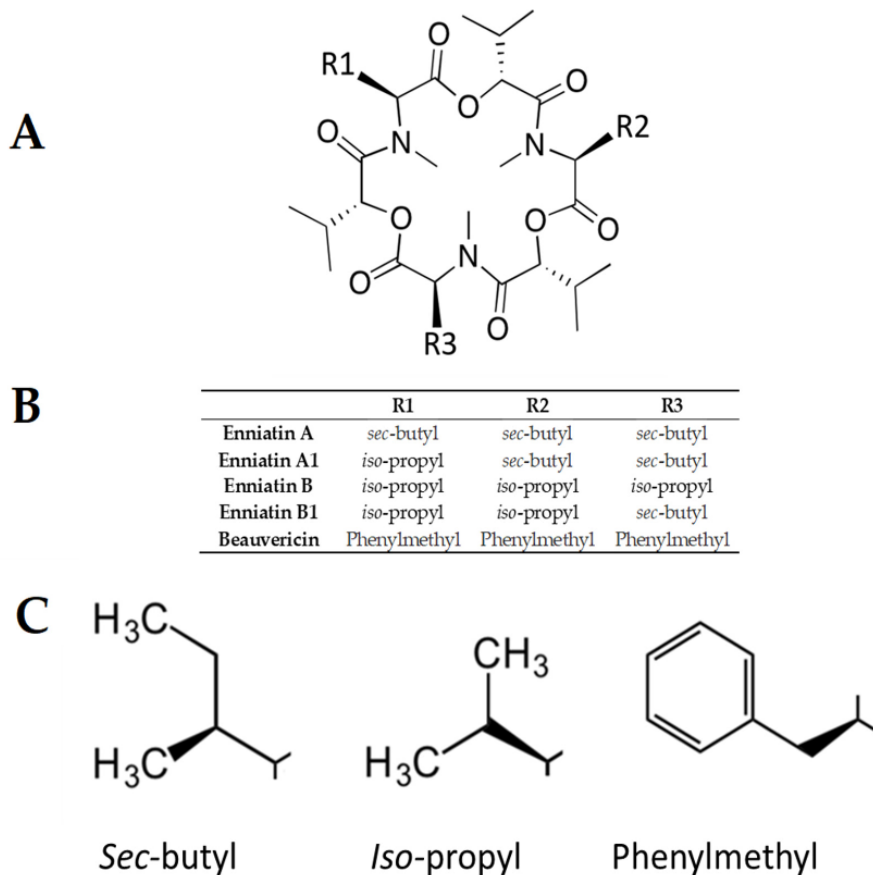
(<https://www.youtube.com/watch?v=knZQBY6W-co>)

Certaines espèces du genre *Fusarium* sont aussi responsables de la production de mycotoxines dites émergentes telles que les enniatines, la beauvéricine, la moniliformine et la fusarine C (Jestoi, 2008). La beauvéricine et les enniatines ont une structure chimique similaire. Les sont des hexadepsipeptides cycliques qui diffèrent par des résidus aminés (R1, R2 et R3) : N-méthyl-phénylalanines pour la beauvéricine, N-méthyl-valine et N-méthyl-isoleucine pour les enniatines (Olleik et al., 2019). Contrairement aux mycotoxines de type trichothécènes dont la toxicité est avérée, les mycotoxines émergentes ne sont pas sujettes à des réglementations ou à des recommandations particulières mais restent sous une surveillance active de la part de l'EFSA (Gautier et al., 2020).

Actuellement, 29 enniatines différentes ont été caractérisées. Parmi celles-ci, les enniatines A, A1, B et B1 sont les plus répandues dans les céréales. Ce sont des Cyclohexadepsipeptides

lipophiles qui n'ont pas été reconnues responsables d'événement de toxicité aigüe jusqu'à présent. Cependant, de multiples études se sont penchées sur l'évaluation de leur toxicité *in-vitro*. En effet, il a été démontré que les enniatines B présentent une hépatotoxicité significative après 24 heures d'exposition de lignées cellulaires hépatiques (Svingen et al., 2017). Les enniatines B ont démontré aussi un effet génotoxique chez des souris qui ont été mises en contact avec de fortes doses de cette dernière provoquant une altération de l'ADN au niveau de la moelle épinière et du foie (Maranghi et al., 2018). D'autre part, des effets immunotoxiques ont été observés au niveau de la maturation des cellules de dendrites et de la différenciation des monocytes en macrophages (Ficheux et al., 2013). Les données disponibles sur la toxicité des enniatines nécessitent encore un approfondissement notamment sur le plan des interactions entre les différentes mycotoxines. Comme présenté précédemment, plusieurs espèces de *Fusarium* peuvent contaminer la même matrice et, selon l'espèce, sécréter différentes mycotoxines qui peuvent avoir des interactions différentes entre elles : additive, antagoniste ou synergique.

Les enniatines sont aussi reconnues pour leur activités insecticides (Grove and Pople, 1980), et antimicrobiennes contre des bactéries Gram-plus, *Mycobacterium*, des champignons mais pas contre des bactéries Gram-moins (Olleik et al., 2019). Elles causent une dépolarisation des membranes bactériennes, probablement du fait de la formation de canaux ioniques. Ce mécanisme d'action est complété par une inhibition de la synthèse d'ARN par les enniatines A et A1, ou une inhibition de la synthèse de protéines par les enniatines B et B1 (Figure 6).

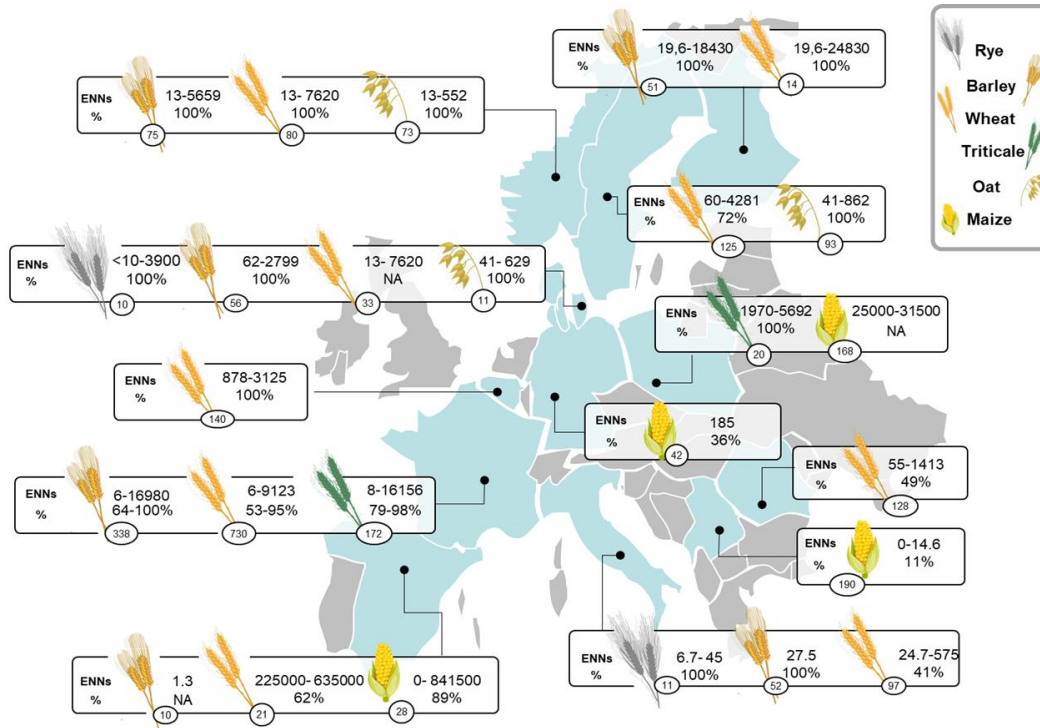


**Figure 6 :** Structure des enniatines (ENN) et de la beauvericin (BEA). (A) Structure cyclohexadepsipeptidique générale, (B) Nature chimique des groupements R1, R2 et R3, (C) Structures chimiques des groupements R1, R2 et R3

(Olleik et al., 2019)

La nécessité du suivi des teneurs des enniatines dans les denrées alimentaires et l’approfondissement des études sur leur toxicité et l’interaction avec les autres mycotoxines est d’autant plus importante aujourd’hui que les enniatines sont quasi omniprésentes dans les apports alimentaires céréaliers quotidiens en Europe. La revue de Gautier et al. (2020) a démontré que 90 articles et revues scientifiques publiés durant les 15 dernières années ont traité de la présence des enniatines dans les céréales, dont 80% concernent les céréales en Europe (Gautier et al., 2020). La figure 7 présente le recueil des teneurs en enniatines détectées dans certains pays d’Europe chez plusieurs types de céréales. Dans la quasi majorité des cas, 100% des échantillons analysés sont contaminés avec une valeur maximale enregistrée en Espagne de 635 mg/kg pour le blé et de 841.5

mg/kg pour le maïs. Les contaminations des différentes céréales avec des enniatines ont été enregistrées également en Egypte, Tunisie, Mozambique, Burkina Fasso, Cameroun, Chine et Canada (Oueslati et al., 2011; Abia, 2013; Ederli et al., 2021). Ces observations démontrent la présence permanente des enniatines dans les apports alimentaires quotidiens des consommateurs, présentant une exposition chronique à ces mycotoxines émergentes dans des proportions qui peuvent être importantes.



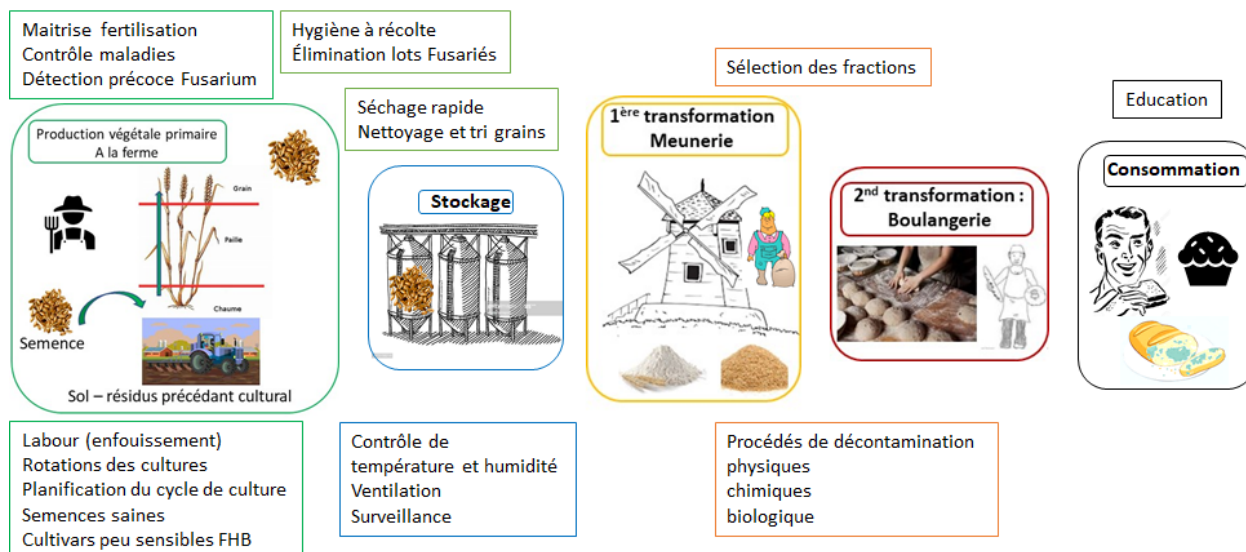
**Figure 7** : Occurrence (%) et concentrations (µg/Kg) des enniatines dans différentes céréales sur le continent européen

(Gautier et al., 2020)

#### 4. Moyens de contrôle de la contamination des céréales par la Fusariose et ses mycotoxines

En raison de l'impact économique et sanitaire engendré par la contamination des céréales par le genre *Fusarium* et ses mycotoxines, et en l'absence de méthode disponible permettant un contrôle total des mycotoxines, il est recommandé d'appliquer certaines bonnes pratiques limitant les risques de contamination pendant la culture au champ, le stockage et la transformation des céréales (Figure 8).





**Figure 8:** Bonnes pratiques pour réduire les risques de l'accumulation des mycotoxines

Certaines pratiques culturales se sont montrées efficaces dans la réduction de l'inoculum primaire de l'infection fusarienne. En effet, comme démontré dans la partie I.1 l'inoculum primaire est conservé dans le sol sur des résidus végétaux. Le travail du sol permet l'enfouissement de ces résidus et favorise la décomposition de la matière organique, ce qui contribue à la réduction importante de l'inoculum primaire (Wegulo et al., 2015; Cowger et al., 2020). D'autres part, il est important d'alterner les cultures, essentiellement après un précédent cultural sensible à la contamination. Le soja, les pois et le colza sont parmi les cultures utilisées lors de la rotation culturale en raison de leur caractère non hôte de la fusariose (Parry et al., 1995).

Le choix variétal est également un levier activable dans la limitation de l'infection fusarienne du blé. Des variétés plus ou moins résistantes à la fusariose ont été sélectionnées, caractérisées et sont inscrites au Catalogue Officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France. La résistance des variétés à la fusariose est notée de 1 à 9 et permet d'orienter le choix du producteur.

En addition à ces deux leviers et une fois la culture installée, la lutte chimique est envisageable comme 3<sup>ème</sup> levier de lutte. Cependant dans le cas de la fusariose, cette lutte présente une efficacité limitée et l'application est délicate. Une application à une bonne dose et au bon stade est primordiale pour la prévention de l'infection : application à floraison avant la contamination.

Le choix des produits à utiliser est complexe en raison des multiples agents pathogènes pouvant infecter le blé. En effet, les champignons de genre *Fusarium* sont sensibles aux triazoles et ceux du genre *Microdochium* sont sensibles aux strobilurines (Simpson et al., 2001). En addition à l'efficacité limitée de ces produits, des formes de résistances ont été observées chez les champignons du genre *Fusarium*. D'autre part, ces substances sont largement critiquées pour leur impact sur l'environnement et sur la santé des applicateurs et des consommateurs.

Le développement d'une lutte biologique contre la fusariose et l'accumulation de ses mycotoxines dans les céréales est aujourd'hui en voie de développement et présente un des principaux axes de recherches pour la lutte (da Cruz Cabral et al., 2013). De nos jours, les études sont majoritairement effectuées dans des conditions contrôlées et l'application sur champs reste encore limitée. Cependant de multiples pistes de recherches sont très prometteuses. L'utilisation d'agents biologiques a été envisagée et ceci notamment en utilisant différentes espèces de *Trichoderma* qui ont démontré une inhibition de croissance fongique et une baisse de la production de DON (Matarese et al., 2012). *Clonostachys rosea* a été de même mis en contact avec *F. graminearum*. Une inhibition de 50% de la croissance a été observée suite à ce test (Xue et al., 2008). D'autre part, l'utilisation des extraits végétaux et en particulier les acides phénoliques et les flavonoïdes a démontré des résultats prometteurs. En effet l'acide férulique, l'acides *p*-coumarique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque et l'acide caféique ont démontré une activité antifongique et une inhibition de la production des mycotoxines par *Fusarium spp* (Gauthier et al., 2016). Ces composés sont naturellement présents dans les grains et participeraient à la résistance de certaines variétés de blé à la fusariose. En effet, ils contribuent au renforcement des parois cellulaires et ont des effets antioxydants et antimicrobiens. D'autres types d'extraits végétaux ont été largement étudiés pour leurs propriétés biologiques diverses : antimicrobien, antioxydant, antiparasitaire, antiviral et antifongique ; ces extraits sont les huiles essentielles. Les huiles essentielles sont largement étudiées pour leur effet antifongique et ont démontré des résultats remarquables dans l'inhibition de la croissance fongique et la production de mycotoxines de plusieurs espèces de genre *Fusarium* (Chaudhari et al., 2019). Cependant, très peu d'études ont été conduites sur les espèces productrices d'enniaines et sur leur production en mycotoxines. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'investigation de cette propriété des huiles essentielles sur des espèces productrice d'enniaines.

La lutte efficace contre la fusariose et l'accumulation des mycotoxines repose sur une stratégie de combinaison des différents leviers présentés : rotation des cultures, gestion de résidus, choix variétal et application de traitements fongicides (synthétique et/ou biosourcés) (Wagacha and Muthomi, 2008).

## **II. Régulation de la production des mycotoxines sous l'action des huiles essentielles**

### **1. Définition et origine des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles ont suscité l'intérêt des scientifiques depuis la nuit des temps pour leurs multiples utilisations médicinales et cosmétiques, leurs actions antiseptiques, leurs parfums, leurs utilisations dans la conservation des denrées alimentaires, leurs actions anti-inflammatoires, sédatives et aussi comme anesthésiant local (Bakkali et al., 2008). De multiples études sont conduites pour comprendre la composition de ces extraits végétaux, leurs mécanismes d'action et les possibilités de les potentialiser dans des moyens de biocontrôle (Asbahani et al., 2015; Prakash et al., 2015).

Selon la Pharmacopée Européenne VI<sup>e</sup> édition, une huile essentielle est définie comme suit : « Un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par extraction à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ». Ces extraits de nature volatil hydrophobe sont extraits de plus de 17500 espèces de plantes aromatiques appartenant aux familles d'angiosperme comme les *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae* et *Asteraceae* (Zabka and Pavela, 2018). Ils sont biosynthétisés dans différentes parties de la plante, notamment les fleurs (jasmin, rose, violette...), les bourgeons (girofle), les feuilles (thym, eucalyptus, sauge), les fruits (anis, badiane), les écorce (cannelle), les zestes (agrumes), les graines (cardamome), le bois (santal), les rhizomes et les racines (gingembre) (Asbahani et al., 2015).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires secrétés par deux types de glandes de sécrétions : des tissus de sécrétions externes tels que les papilles épidermiques, des cellules

épidermiques coniques situées généralement au niveau des pétales de fleurs, ou bien dans des cellules glandulaires trichomes qui se développent à partir des cellules épidermiques et sont caractéristiques de la famille des *Lamiaceae*. Les huiles essentielles peuvent être sécrétées aussi dans des tissus de sécrétion internes tels que les canaux de sécrétion (essentiellement chez la famille des *Apiaceae*), les poches schizogènes qui se situent dans l'espace intercellulaire et qui se remplissent de gouttelettes d'huile essentielle sécrétée à partir des cellules adjacentes. Finalement, les huiles essentielles sont sécrétées par des cellules à sécrétions intracellulaires dans lesquelles elles s'accumulent dans les vacuoles en grandes concentrations (Asbahani et al., 2015).

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le rôle biologiques que jouerait les huiles essentielles vis-à-vis de la plante. Certaines études ont évoqué le probable rôle dans l'interaction plante-plante et ceci en inhibant la germination et la croissance d'autres plantes, aussi dans l'interaction plante-insecte/animal en attirant les pollinisateurs et en répulsant les prédateurs. Les huiles essentielles joueraient aussi un rôle dans la protection de la plante contre certains microorganismes phytopathogènes (Tisserand and Young, 2014). Il a été démontré que la composition et la quantité des huiles essentielles varient en fonction du climat, la composition du sol, l'organe sécréteur de la plante et le stade de croissance de la plante (Tefiani et al., 2016).

## 2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles existent de nos jours. Ces méthodes peuvent être catégorisées en deux groupes : méthodes conventionnelles et méthodes plus avancées. L'hydrodistillation est la méthode la plus ancienne et la plus simple pour l'extraction des huiles essentielles. Cette méthode a été découverte entre les années 980 et 1037 en utilisant un système d'alambic et consiste en l'immersion du matériel végétal dans de l'eau qui est portée à ébullition (Burt, 2004; Asbahani et al., 2015). La vapeur de l'eau émise emporte les gouttelettes des huiles essentielles. Un système de refroidissement permet la séparation de l'eau aromatiques et l'huile essentielle par simple décantation. L'hydrodistillation par système de Clevenger a présenté une optimisation de cette méthode d'extraction. En effet ce système permet de recycler l'eau aromatique et d'éviter le compactage et l'agglutination du matériel végétal lors de l'extraction (Meyer-Warnod, 1984). L'extraction par entrainement par vapeur d'eau reprend le même principe de l'hydrodistillation à la différence de la mise en place d'une grille sur la quelle est posé le matériel végétal et qui est traversé par la vapeur d'eau bouillante. Cette méthode a pour avantage

de réduire le temps d'extraction et l'exposition de l'huile essentielle à la chaleur (Asbahani et al., 2015). L'extraction des huiles essentielles à partir des agrumes se fait plutôt par pression à froid. En effet la sécrétion des huiles essentielles par les agrumes se fait au niveau dans la partie externe du mésocarpe. Une émulsion huile/eau est obtenue et l'huile est séparée par centrifugation.

Parmi les méthodes les plus avancées, nous pouvons citer l'extraction à l'aide de fluide supercritique tel que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). En effet dans l'état supercritique (à une température et à une pression critique) le fluide acquiert des propriétés intéressantes telles qu'une faible viscosité, une forte capacité de diffusion. Cette méthode permet de réduire d'avantage l'exposition à la chaleur des composés d'huile essentielle, de favoriser le rendement d'extraction et de réduire considérablement les contaminants (Cook and Lanaras, 2016). D'autres méthodes peuvent être utilisées notamment le couplage d'une extraction plus conventionnelle telle que l'hydrodistillation ou l'entraînement par vapeur d'eau à une action des ultrasons. En effet ce couplage favorise la libération des gouttelettes des huiles essentielles à l'aide de l'action mécanique et permet par conséquent la réduction de l'action thermique et le temps d'extraction. L'utilisation des microondes a révolutionné les pratiques d'extractions en conférant de large piste d'exploitation à savoir la distillation par micro-ondes à air comprimé, hydrodistillation sous vide sous micro-ondes, extraction sans solvants sous microondes, distillation à vapeur accélérée par microondes, ... Malgré les nombreux avantages qu'apportent ces nouvelles méthodes d'extraction, le coût des appareillages requis et leurs maintenances présentent un obstacle d'ampleur pour y accéder (Asbahani et al., 2015; Cook and Lanaras, 2016).

### 3. Composition des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir de 20 à 60 composés présents à des concentrations variables. Généralement, deux ou trois composés sont présents en concentration majoritaire comprise entre 20 et 70% par rapport à la totalité des composants constituant ainsi le chémotype de l'huile (Tisserand and Young, 2014; Zabka and Pavela, 2018) comme par exemple le carvacrol (30%) et le thymol (27%) pour l'huile essentielle de *Origanum compactum* (Bouhdid, et al., 2008), le  $\beta$ -Thujone (58%) pour l'*Artemisia herba-alba* (Mighri et al., 2010) et le menthol (36.9%) et le menthone (28.8%) pour l'huile essentielle du *Mentha piperita* (Mahboubi and Kazempour, 2014).

Les composants des huiles essentielles sont caractérisés par un faible poids moléculaire et appartiennent à deux groupes chimiques issus de deux voies de biosynthèses différentes : des terpènes et des composants aliphatiques et aromatiques. Les terpènes constituent environ 90% de la composition des huiles essentielles (Zabka and Pavela, 2018). Les monoterpènes sont constitués de deux unités d'isoprènes ( $C_5H_{10}$ )<sub>2</sub> et présentent différentes structures chimiques (acyclique, monocyclique et bicyclique) avec une masse molaire qui varie entre 136.23 g/mol et 272.47 g/mol. Ils appartiennent à plusieurs familles chimiques en fonction des groupement fonctionnels associés (alcool, aldéhyde, cétones, esters, éthers ...) et ils représentent les composants les plus abondants dans la composition des huiles essentielles à plus de 80% (Bakkali et al., 2008). Les sesquiterpènes sont formés de 3 unités d'isoprènes ( $C_5H_{10}$ )<sub>3</sub>. L'extension de la structure leur permet une aptitude élevée de cyclisation.

Généralement, l'activité biologique étudiée des huiles essentielles est associée aux composés majoritaires de celles-ci (Tisserand and Young, 2014; Zabka and Pavela, 2018). Certaines huiles essentielles ont démontré une activité antifongique importante (Daferera et al., 2003; Boyraz and Ozcan, 2006; Cardiet et al., 2012; Lasram et al., 2019; Krzyśko-Łupicka et al., 2020). L'étude de la composition de ces huiles et de la structure de leurs composés majoritaires a permis de démontrer le rôle de ceux-ci dans l'activité perçue. Le thymol et son isomère le carvacrol présentent une inhibition de la croissance fongique importante et ceci s'expliquerait par leurs actions au niveau de la membrane cellulaire des champignons. La présence du groupement hydroxyle ainsi que les groupements isopropyle en position R2 et R5 et le groupement méthyle en position R5 et R2 (respectivement chez le thymol et le carvacrol) (Tisserand and Young, 2014) qui permettent un système de délocalisation des électrons, confèrent à ces composés leurs fort potentiel d'altération des membranes cellulaires. Ces composés s'accumulent par la suite dans les cellules provoquant une perturbation dans les transports de protons (Maurya et al., 2021). L'eugénol a aussi démontré un rôle dans l'activité antifongique de certaines huiles essentielles qui peut être expliquée par la présence d'un groupement méthoxyle dans sa structure (Zabka and Pavela, 2018).

#### 4. Limites d'utilisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles représentent un potentiel considérable pour leur utilisation comme alternative biologique aux traitement synthétiques utilisés actuellement pour leurs différentes

activités biologiques (Maurya et al., 2021). Cependant, en raison de leur nature chimique, leur exploitation fait face à plusieurs limites. En effet l'exposition à l'oxygène pose un problème d'oxydation pour certains composés, essentiellement les alcènes. Ces doubles liaisons sont réactives à l'oxygène et peuvent générer des composés allergènes tels que le  $\beta$ -myrcene oxydé. L'oxydation de certains composés peut provoquer la réduction de leur activité biologique ; une étude a démontré la baisse de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de citronnelle par rapport à une fraîchement extraite. De même l'exposition à la chaleur catalyse les potentielles réactions chimiques endothermiques. La lumière, en particulier les UV (ultraviolets), favorise la formation de radicaux libres d'oxygène, qui sont très réactifs. Par exemple, l'huile d'orange douce s'est avérée subir des changements de composition lorsqu'elle est exposée à la lumière UV à 20°C pendant 50 minutes. Ces changements comprenaient des diminutions de néral, géraniol et citronellal, et des augmentations significatives de carvone, isopulegol, carvéol, oxyde de linalol et oxyde de limonène, ainsi que l'apparition d'au moins 12 nouveaux constituants dont la pipéritone, trans-b-terpinéol,  $\alpha$ -cyclocitral, photocitral A, menthone et l'isomenthone (Tisserand and Young, 2014; Prakash et al., 2015; Asbahani et al., 2015).

##### 5. Activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles sur des espèces de *Fusarium*

L'investigation de l'activité biologique des huiles essentielles vis-à-vis de l'inhibition de la croissance fongique de plusieurs espèces du genre *Fusarium* est faite dans des conditions *in-vitro* en ayant recours à plusieurs méthodes expérimentales notamment la dilution de l'huile dans l'agar, la diffusion par la méthode des puits ou de disques et bien encore par la fumigation.

L'activité biologique dépend de la composition de l'huile essentielle et de la concentration utilisée. En effet parmi les huiles essentielles de *Pimpinella anisum*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium odoratissimum*, *Rosmarinus officinalis* et *Foeniculum vulgare* par exemple, l'huile essentielle de *T. vulgaris* a présenté le meilleur résultat d'inhibition du *Fusarium culmorum* selon Matusinsky et al. (2015). L'étude de Ferreira et al. (2018) a démontré l'inhibition de la teneur en ergostérol et de la production de toxines chez *F. graminearum* par l'huile essentielle de *Zingiber officinale*. Le même résultat a été observé pour *Fusarium verticillioides*. L'huile essentielle de *Curcuma longa* a été testée sur *F. graminearum* ; Une inhibition complète de la croissance a été

enregistrée à 3500 µg/ml et une inhibition complète de la production de ZEA a été observée à 3000 µg/ml (Naveen Kumar et al., 2016).

Les propriétés antifongiques et antimycotoxigènes de différentes huiles essentielles ont été étudiées sur des matrices végétales dans des conditions de laboratoire. Kalagatur et al. (2018). ont montré une activité inhibitrice de l'huile essentielle de *Cymbopogon martinii* vis-à-vis *F. graminearum* dans les grains de maïs avec une inhibition de la production de ZEA et de DON. Les résultats de la réduction de l'ergostérol étaient corrélés à la diminution de la concentration en mycotoxines. Dans les expériences menées avec des grains de maïs contaminés artificiellement, Kalagatur et al.(2015) ont montré un effet inhibiteur de l'huile essentielle d'*Ocimum sanctum* sur la croissance et la production de ZEA par *F. graminearum*. Une diminution significative de la concentration de ZEA a été observée avec une augmentation de la concentration en huile essentielle. Les conditions d'incubation ont un effet sur l'efficacité de l'activité antifongique et antimycotoxigène des huiles essentielles. Velluti et al. (2004) ont décrit l'effet de la nature de l'huile essentielle, de la température et de l'activité de l'eau sur l'inhibition de la croissance de *F. graminearum* et sur sa production de mycotoxines pour cinq huiles essentielles (origan, cannelle, citronnelle, clou de girofle et palmarose). De plus, Marín et al. (2004). ont montré que les conditions environnementales influencent l'effet de quelques huiles essentielles (cannelle, clou de girofle, origan, palmarose et citronnelle) sur la production de ZEA et déoxynivalénol (DON) par *F. graminearum*.

Plusieurs études se sont penchées également sur l'investigation de l'activité antifongique de différentes huiles essentielles vis-à-vis de producteurs d'enniaines (voir tableau 1 du chapitre II ; Chakroun et al., 2021b) tels que le *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum* et *F. poae*. Ces études ont démontré des résultats prometteurs. En revanche très peu d'informations ont été relayées concernant l'aptitude des huiles essentielles à inhiber ou moduler la production de ces mycotoxines « émergentes ».



### **III. Potentialisation des huiles essentielle par nanoencapsulation**

#### **1. La nanoencapsulation : avantages pour la potentialisation des huiles essentielles**

De nos jours, la nanotechnologie est en plein essor et fait l'objet depuis plus de vingt ans de nombreux travaux au sein et à l'interface de disciplines scientifiques multiples telles que la physique, la chimie, la biologie ... (Ghayempour and Montazer, 2016; Prasad, 2016; Balaure et al., 2017). En effet, la nanotechnologie comprend toutes les techniques de synthèse, de caractérisation et d'application de matériaux dont une dimension, au minimum, est inférieure à 100 nm (Chaudhari et al., 2021). La réduction de la taille des matériaux à une échelle nanométrique leur confère des propriétés nouvelles et intéressantes. A cette échelle, les lois de la physique quantique s'appliquent désormais sur les matériaux à la place des lois de la physique conventionnelle (Saglam et al., 2016). Le passage de la matière à des dimensions nanométriques, comme une rugosité ou une porosité nanométrique du matériau, augmente fortement la surface spécifique de l'objet, c'est-à-dire l'aire superficielle par gramme de solide. Ainsi, le nombre d'atomes en surface d'un nano-objet est bien plus important que pour des objets plus grands. Le taux d'atomes en surface par rapport au nombre total d'atomes augmente lorsque la taille du nano-objet diminue : par exemple, une nanoparticule de 10 nm de diamètre comporte environ 2 500 atomes dont 30% à sa surface tandis qu'une nanoparticule de 1 nm de diamètre comporte environ 50 atomes dont 90% en surface. Or, ce sont principalement les atomes présents en surface des objets qui interagissent avec l'environnement lors des réactions chimiques engendrées.

L'utilisation des nanomatériaux pour l'encapsulation, le transport et la délivrance de substances actives ouvre un nouveau domaine de recherche. En effet, l'encapsulation dans des nanosupports ayant des propriétés physiques bien déterminées réduirait le dosage nécessaire d'utilisation des substances actives (Sattary et al., 2020). En effet, plusieurs matériaux pourraient être utilisés pour la synthèse et la fonctionnalisation de la surface de ces matériaux. Le choix des matériaux utilisés est très important. Selon le but visé, la nanoencapsulation permet d'améliorer la solubilité de la substance d'intérêt, améliorer sa capacité d'être absorbé par les cellules vivantes, la protéger contre la métabolisation et l'élimination au niveau tissulaire ou cellulaire et la protéger contre les facteurs de dégradation physicochimiques externes (Marques, 2010; Álvarez et al., 2016; Chaudhari et al., 2021). L'ajout de ligands sur la surface des nanoproduits et le choix de sa nature

permettrait aussi de cibler le périmètre de leur action en ciblant des cellules bien déterminées par exemple.

Dans le cas des huiles essentielles, la nanoencapsulation a été étudiée dans le but de la stabilisation de ces dernières dans le temps en limitant leur volatilisation et de les protéger de l'oxydation et de l'exposition aux rayons UV. D'autre part, la surface des nanomatériaux choisis augmente la solubilité des HEs dans l'eau en réduisant leur hydrophobicité, leur permettant de pénétrer dans les cellules fongiques en causant une perte d'intégrité de la membrane et détruisant ainsi les cellules (Sattary et al., 2020; Chaudhari et al., 2021). L'encapsulation permettrait aussi de réduire les quantités nécessaires pour leur utilisation.

## 2. Choix des matériaux d'encapsulation :

De multiples matériaux sont utilisés pour la nanoencapsulation des huiles essentielles. En addition aux facteurs précédemment étayés, le choix des matériaux repose aussi sur leurs caractéristiques intrinsèques notamment leur capacité d'encapsulation, leur biocompatibilité, leur biodégradabilité, leur abondance, leur potentielle activité antifongique ainsi que leur rentabilité. Parmi ces matériaux, nous pouvons citer la silice, le chitosane, la cellulose, la cyclodextrine, les alginates, la gomme arabique ...

Pour nos travaux nous nous sommes intéressés à deux de ces matériaux. En premier lieu, la silice mésoporeuse a été choisie comme premier support d'encapsulation. En effet, la silice mésoporeuse est un nanomatériau présentant un réseau homogène et organisé de pores de taille moyenne qui varient de 2 à 50 nm (Ebadollahi et al., 2017). Cette particularité lui confère un rapport surface/volume important et fait de lui un excellent candidat pour l'encapsulation et la libération des molécules actives (« drug delivery »). La silice mésoporeuse est aussi une matrice très stable mécaniquement grâce aux liaisons siloxanes Si-O-Si et résiste aux attaques microbiennes. De plus, l'intérêt se porte sur cette matière pour sa très faible cytotoxicité et la biocompatibilité de sa surface (Janatova et al., 2015; Sattary et al., 2020). En effet, la structure chimique de la surface des particules de la silice mésoporeuse confère une facilité pour sa fonctionnalisation en y ajoutant des molécules actives ou d'autres qui se fixent sur des cellules cibles telles que des anticorps par exemples (Slowing et al., 2010; Balaure et al., 2017).

Le chitosane, en second lieu, est le sujet de multiples études et investigations pour sa capacité d'encapsulation et de libération de molécules actives. Le chitosane est un polymère

cationique composé de D-glucosamine en liaison  $\beta$ -(1–4) et d'unités N-acétyl-D-glucosamine, produite par désacétylation alcaline de la chitine, qui est le deuxième composé le plus abondant dans la nature après la cellulose et composant principal de l'exosquelette des crustacés et des parois cellulaires fongiques (Valencia Junca et al., 2019; Das et al., 2021; Chaudhari et al., 2021). Il est considéré comme l'un des matériaux les plus appréciés pour la synthèse et la formulation des parois pour la nanoencapsulation des molécules actives. Les caractéristiques qui font de ce matériau un outil d'une importante valeur ajoutée pour l'encapsulation des biomolécules sont : l'abondance de cette matière, sa biocompatibilité, son hydrophilie, sa biodégradabilité, sa non-toxicité (statut GRAS), sa capacité importante de formation de gels et de particules couplées à une activité antifongique exceptionnelle (Zachetti et al., 2019; Chaudhari et al., 2021). En raison de sa non-toxicité, le chitosane a déjà été approuvé comme additif alimentaire dans différents pays dont le Japon, la Corée, l'Italie et la Finlande.

### 3. Techniques d'encapsulation des huiles essentielles :

Les techniques de nanoencapsulation qui sont utilisées pour la protection des huiles essentielles sont diverses et ont connu une évolution au cours des dernières décennies. Deux d'entre elles sont principalement étayées dans la littérature : la nanoencapsulation à base de polymères et la nanoencapsulation à base de lipides (Asbahani et al., 2015; de Matos et al., 2019).

#### *3.1. Systèmes nanostructurés à base de polymères*

Plusieurs méthodes ont été testées dans le but d'obtenir une nanoencapsulation dans des systèmes nanostructurés à base de polymères de la nanopréciptation à la coacervation en passant par le séchage par pulvérisation. Certes ces méthodes ont démontré leurs avantages néanmoins la présence des étapes de chauffage et d'évaporation des solvants utilisés pose une limite majeure pour l'encapsulation des huiles essentielles sans les dénaturer.

La nanopréciptation est une technique d'encapsulation simple et reproductible qui permet l'obtention de nanoparticules monodispersées. C'est une méthode rapide et économique. Deux phases miscibles sont nécessaires : une phase organique et une phase aqueuse. La phase organique contient une solution de polymère et l'huile essentielle. La phase aqueuse comprend un non-solvant ou un mélange de non-solvants pour le polymère qui peut être complété par un ou plusieurs tensioactifs naturels ou synthétiques.

La méthode de coacervation est une technique qui peut être simple ou complexe si un ou deux polymères sont utilisés, respectivement. La coacervation est généralement définie comme la séparation de deux phases liquides dans une solution colloïdale. La coacervation simple est basée sur l'ajout d'un solvant pauvre à une solution colloïdale hydrophile qui aboutit à la formation de deux phases : l'une est riche en molécules colloïdes (coacervat), et l'autre est quasiment dépourvue de coacervat. Par exemple, lorsqu'une solution de sulfate de sodium, d'acétone ou d'alcool est progressivement ajoutée à une solution de gélatine sous agitation, un coacervat se forme.

Le séchage par pulvérisation consiste en une atomisation liquide de la suspension de polymère en petites gouttelettes suivie par une étape de séchage réalisée à l'aide d'un gaz réchauffé pour finalement collecter les particules solides. Cette méthode est répandue pour la formation des microparticules et est utilisée à l'échelle industrielle et en production continue.

### *3.2. Systèmes nanostructurés à base de lipides*

La technique d'encapsulation en systèmes nanostructurés à base de lipides repose essentiellement sur l'encapsulation dans des liposomes, des nanoparticules lipidiques solides et des émulsions.

Les liposomes sont des systèmes formés d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques définissant un ou plusieurs compartiments aqueux. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles capables de s'auto-organiser spontanément en milieu aqueux. Ils sont largement utilisés comme porteurs à la fois de molécules hydrophiles dans les compartiments aqueux et lipophiles dans les bicouches, mais aussi de molécules amphiphiles. De plus, l'utilisation de liposomes pour l'encapsulation des HE est une approche intéressante pour surmonter leurs problèmes de stabilité physico-chimique (sensibilité à l'oxygène, à la lumière, à la température et à la volatilité) et leur biodisponibilité réduite qui est due à une faible solubilité dans l'eau. Différentes méthodes sont utilisées pour procéder à cette encapsulation :

La méthode d'hydratation en couche mince se base sur le principe de la dissolution des phospholipides et les huiles essentielles dans une phase organique. Un mince film de bicouches empilées de phospholipides est obtenu à la suite d'une évaporation du solvant organique sous dépression au rotavapor. Ce film sec est hydraté par une phase aqueuse sous agitation qui permet la formation spontanée des liposomes. Cependant, cette méthode donne de grandes vésicules avec

une distribution de taille hétérogène. Afin d'homogénéiser la taille des liposomes obtenus de multiples procédures sont appliquées de la technique de l'extrusion à la technique du gel-dégel.

L'évaporation en phase inverse est une méthode conventionnelle capable de former des liposomes de grandes tailles. Elle consiste en la préparation d'une émulsion huile dans eau en mélangeant une phase organique phospholipidique, contenant généralement les principes actifs lipophiles, dans une phase aqueuse. Ensuite, le solvant organique est évaporé, donnant des liposomes

Les nanoparticules lipidiques solides sont des nanoporteurs qui se constituent de lipides solides à température ambiante telles que des triacylglycérols ou des cires. Ces nanosupports offrent de nombreux avantages : une stabilité physique, la protection du matériau encapsulé contre la dégradation et sa libération contrôlée. Plusieurs techniques ont été utilisées pour préparer les nanoparticules lipidiques solides telles que l'homogénéisation à haut cisaillement et les ultrasons, l'homogénéisation à haute pression et les techniques de préparation à base de microémulsion. La technique à haute pression présente de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes : une facilité d'utilisation à grande échelle, non -utilisation des solvants organiques et un temps de production court. Les homogénéisateurs à haute pression poussent un liquide à haute pression (100 à 2 000 bars) à travers un espace étroit (de l'ordre de quelques microns). Le fluide accélère sur une très courte distance jusqu'à une vitesse très élevée (plus de 1000 km/h). Des forces de cisaillement et de cavitation très élevées perturbent les particules jusqu'à la gamme submicronique. Deux approches générales de l'étape d'homogénéisation, les techniques d'homogénéisation à chaud et à froid, peuvent être utilisées pour la production des nanoparticules lipidiques solides.

Les nanoémulsions sont des systèmes colloïdaux, généralement constitués de deux phases distinctes non miscibles, l'une hydrophile et l'autre hydrophobe, également appelées phases aqueuse et huileuse (ou organique), où l'une des phases est dispersée dans l'autre sous forme de gouttelettes de taille nanométrique. Cependant, ces systèmes sont thermodynamiquement instables en raison de la forte tension superficielle formée à l'interface entre les deux phases. Afin de surmonter l'instabilité, des tensioactifs sont ajoutés à la formulation en raison de leur capacité à abaisser la tension superficielle et à stabiliser le système. Pour aboutir à la formation de ces nanoémulsion diverses techniques sont utilisées : l'agitation à haut cisaillement, l'homogénéisation haute pression, la nanoémulsification spontanée, l'inversion de phase ...

Dans le cadre de ce projet de thèse, la méthode d'encapsulation des huiles essentielles qui a été suivie est l'encapsulation dans des nanosupports mésoporeux inorganiques. Ce choix s'est appuyé sur le faible nombre d'étapes de chauffage au moment de l'encapsulation, la stabilité du support choisi (la silice mésoporeuse) et la non utilisation de solvant organique limitant ainsi la dénaturation et la perte des huiles essentielles. La nanoencapsulation a été suivie d'un enrobage en utilisant du chitosane. Une étape qui a pour but de prolonger la durée de libération des huiles essentielles dans l'environnement ainsi de fortifier l'activité antifongique huiles essentielles.

#### 4. Application de la nanoencapsulation des huiles essentielles en traitement antifongique contre la fusariose et sa production de mycotoxines

La nanoencapsulation des huiles essentielles et son application comme traitement antifongique a fait objet de multiples études ces dernières années. L'apport de cette technique pour la protection des huiles essentielles et/ou leurs composants et la prolongation de leur libération a été mis en évidence. Janatova et al. (2015) ont étudié l'activité antifongique de plusieurs composés terpéniques (allyl-isothiocyanate, carvacrol, cinnamaldehyde, diallyl-disulfide, eugénol, thymol, et thymoquinone) encapsulés dans des nanoparticules de silice mésoporeuse sur la croissance de *Aspergillus niger*. Les résultats obtenus ont montré que la modification du comportement des substances encapsulées a varié en fonction de leur nature. L'activité antifongique du thymol et de la thymoquinone a été amplifiée significativement (multipliée huit fois dans le cas du thymol après son encapsulation). La libération de ces deux composés dans l'environnement a été également significativement ralentie. L'eugénol et le carvacrol ont montré un résultat similaire mais de moindre importance au niveau de l'activité antifongique. Ebadollahi et al. (2017) ont procédé à l'encapsulation de l'huile essentielle de *Thymus eriocalyx* et *Thymus kotschyanus* dans des nanoparticules de silice mésoporeuse. Le produit obtenu a été testé contre *Tetranychus urticae* et les résultats montrent une amélioration du temps de diffusion des huiles jusqu'à 20 jours de plus par rapport aux huiles libres. Sattary et al. (2020) se sont penchés sur l'étude des huiles essentielles de la citronnelle et de clou de girofle encapsulées dans de la silice mésoporeuse contre le champignon phytopathogène *Gaeumannomyces graminis* et ont démontré une augmentation significative de l'activité antifongique de ces deux huiles (activité multipliée 3 fois). Très peu de recherches ont été menées sur l'apport de l'encapsulation dans de la silice mésoporeuse des huiles essentielles sur leur activité antifongique sur des champignons de genre *Fusarium* et encore moins

sur les producteurs d'enniatines. L'activité de ces nanoformulations sur la production de mycotoxines n'a pas été rapportée dans la littérature scientifique.

Les études se focalisant sur le chitosane comme agent d'encapsulation des huiles essentielles et son effet sur leur activité antifongique et l'inhibition de la production de mycotoxines sont multiples. Das et al. (2021) ont travaillé sur l'encapsulation de l'eugénol dans des nanoparticules de chitosane et ont étudié son activité biologique sur *Aspergillus flavus*. Ils ont reporté une augmentation de l'inhibition de la croissance fongique du produit encapsulé par rapport à l'huile libre et une inhibition de la production de l'aflatoxine B1 plus importante. Kujur et al. (2020) ont reporté un résultat similaire au précédent travail. En effet, la nanoencapsulation de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a amélioré son activité antifongique significativement et une inhibition de 100% de la production de l'aflatoxine B1 (AFB1) a été observée à  $1 \mu\text{L.mL}^{-1}$  par rapport à l'huile libre, qui elle, a affiché une inhibition totale à  $1.25\mu\text{L.mL}^{-1}$ . Kalagatur et al. (2018) se sont intéressés à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène de l'huile essentielle de *Cymbopogon martinii* encapsulée dans des nanoparticules de chitosane sur *F. graminearum* sur du maïs. La croissance fongique et la production de ZEA et de DON ont été inhibées significativement plus fortement avec l'huile encapsulée par rapport à l'huile libre. D'autre part, utilisé en agent de fonctionnalisation sur la surface de particules de montmorillonite, le chitosane a amélioré la capacité d'adsorption de deux mycotoxines testées à savoir la zearalenone et AFB1 et peut contribuer ainsi à la détoxification (Wang et al., 2020).

L'étude bibliographique que nous avons menée au cours de ce projet a mis en évidence un manque d'information concernant l'activité biologique des huiles essentielles encapsulée sur la croissance fongique des champignons du genre *Fusarium* et sur leur production de toxines en particulier sur des producteurs d'enniatines.

#### IV. Projet de thèse

La qualité sanitaire des céréales représente une préoccupation primordiale pour la sécurité alimentaire mondiale. La contamination fusarienne suscite une attention particulière en raison de sa capacité à dégrader les récoltes en détériorant la qualité des grains et de surcroît en raison de la contamination mycotoxique qui en résulte. Les champignons du genre *Fusarium* produisent de multiples types de mycotoxines qui se sont avérées être nocives pour la santé humaine et animale telles que les TCTB, mais aussi de mycotoxines dites « émergentes » telles que les enniatines dont la toxicité n'a été prouvée qu'à une échelle laboratoire jusqu'à présent. Néanmoins, les enniatines sont retrouvées fréquemment dans les cultures céréalières et notamment en coprésence avec d'autres mycotoxines. En raison du manque de connaissance sur ces mycotoxines, la chronicité de l'exposition du consommateur à ces dernières reste non évaluée et leur possible interaction avec les autres mycotoxines demeure indéfinie. Par conséquent, la mise en place de stratégies de lutte contre l'accumulation des enniatines dans les céréales reste limitée, voire inexistante à ce jour. Des efforts supplémentaires de recherche sont nécessaires pour définir la toxicité de ces mycotoxines, étudier leur interaction en cooccurrence avec d'autres mycotoxines et définir des méthodes de contrôles. Cependant il est nécessaire de trouver dès à présent des moyens de limitation de l'accumulation des enniatines dans les céréales.

Dans le contexte écologique actuel, les méthodes de lutte contre l'accumulation des mycotoxines dans les céréales se tournent vers la valorisation de molécules naturelles dotées de propriétés antifongiques et ayant une capacité de limiter la production des mycotoxines. Une des pistes de recherche les plus développées dans ce sens est la valorisation des huiles essentielles. En effet, ces extraits végétaux sont dotés d'activités antifongiques prouvées contre plusieurs espèces de *Fusarium*. Cependant très peu d'étude traitent de leur activité vis-à-vis des producteurs d'enniaticines. La valorisation des huiles essentielles en vue de les utiliser comme alternatives aux fongicides de synthèse se heurte à de multiples limites d'utilisation de ces substances en pratique. En raison de leurs propriétés intrinsèques, les huiles essentielles présentent une volatilité importante. De plus ces extraits sont très sensibles à l'oxydation et à l'exposition aux rayons UV. La nanoencapsulation se présente alors comme un outil qui permettrait de remédier à ces limites. En effet, cette technologie permet de protéger les huiles essentielles contre l'exposition à la lumière et à l'oxygène et prolongerait leur diffusion dans l'environnement. D'autre part, il existe un large



choix de matériaux biocompatibles et biodégradables permettant aux nanoproduits finaux de respecter les exigences environnementales actuelles.

C'est dans ce contexte que se présentent mes travaux de thèses centrés sur les champignons producteurs d'enniatiines pour répondre aux objectifs suivants :

1. Isolement et identification de souches de *Fusarium* productrice d'enniatiines en Tunisie.
2. Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et leur capacité à inhiber la production des enniatiines sur les souches sélectionnées.
3. Encapsulation des huiles essentielles sélectionnées et évaluation de l'apport de cette encapsulation sur l'activité des huiles précédemment décrite.

Ainsi, après une description détaillée des méthodes expérimentales utilisées durant ce projet de recherche, le manuscrit de thèse s'articulera en trois chapitres qui répondent aux trois objectifs présentés. Nous allons commencer par le premier chapitre qui décrit la méthode d'isolement et de caractérisation de souches de *Fusarium* productrice d'enniatiines à partir d'échantillons de blé tunisien. Par la suite le deuxième chapitre décrit l'évaluation de l'activité antifongique et antimycotoxines d'un panel d'huiles essentielles sur les souches de travail sélectionnées. Le troisième chapitre traitera de l'encapsulation des huiles essentielles étudiées et de l'évaluation de l'apport de cette encapsulation sur leurs activités précédemment définies. Le manuscrit se clôturera par une partie discussion générale qui reprend et intègre les principaux résultats obtenus ainsi que leur projection en termes de perspectives de maîtrise des niveaux de contamination des céréales par des enniatiines.



# *Matériels et méthodes*



## I. Isolement de souches fongiques à partir de grain de blé et préparation de cultures monosporales

### 1. Méthode Ulster

L'isolement des souches fongiques a été effectué à partir de 23 échantillons de blé dur et tendre récoltés en 2017 et 2018 en Tunisie sur une parcelle expérimentale appartenant au Centre Régional des Recherches en Grandes Cultures CRRGC, Bèjà ; les grains de blé récoltés proviennent d'épis asymptotiques appartenant aux variétés détaillées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Variétés de blé tunisien échantillonnées et leurs années de récoltes

Variétés		Année de récolte	
		2017	2018
Blé dur	Khiar	*	*
	Karim	*	*
	Nasr	*	*
	Razzek	*	*
	Maali	*	*
	Om rabii	*	*
Blé tendre	Utique	*	*
	Vaga	*	
	Byrsa	*	*
	Tahent	*	
	Salambo	*	*
	Hidra	*	*
	Badii	*	

200 grains de blé ont été échantillonnés dans chaque lot. Les grains ont été désinfectés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10% (1 à 1,3 degré chlorométrique) durant 5 mn. Les grains ont été égouttés et rincés abondamment avec de l'eau distillée stérile. L'opération a été renouvelée 3 fois, puis les grains ont été séchés sur du papier absorbant stérile. 100 grains par lot ont été prélevés et déposés sur du Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, France) dans des boîtes de Pétri de 90 mm (10 grains par boîte). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C à l'obscurité pendant 3, 4 ou 5 jours jusqu'à l'apparition du mycélium.

Le mycélium apparu a été repiqué dans des boîtes de Pétri de 55 mm contenant du milieu gélosé PDA puis incubé à 25 °C à l'obscurité jusqu'à envahissement de la boîte. La culture obtenue a été utilisée pour l'identification ultérieure des champignons contaminant les grains testés.

## 2. Culture monospore

Dans des tubes stériles de 15 mL, dix mL d'eau distillée stérile ont été versés dans un tube (solution mère) et 9 mL dans quatre autres tubes. Un morceau de gélose avec du mycélium a été prélevé des cultures préparées précédemment et a été ajouté au premier tube (dilution  $10^{-1}$ ). Par la suite une agitation vigoureuse au vortex a été effectuée. Un mL de cette solution a été prélevé et ajouté au deuxième tube pour obtenir une dilution de  $10^{-2}$ . La solution a été homogénéisée par agitation. L'opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'une dilution de  $10^{-5}$ . Un mL de chaque solution a été prélevé pour ensemercer en surface le milieu PDA préparé dans une boîte de Pétri de 90 mm. Deux boîtes ont été préparées par dilution. Les boîtes ont été par la suite incubées à 25°C pendant 18 heures. Après le temps écoulé, les boîtes ont été observées au microscope et les spores ont été repérées avec un marquage avec un feutre fin sur le dos de la boîte en s'assurant de l'espacement entre les spores. Dans des conditions stériles, un morceau de gélose avec la spore marquée a été prélevé et repiqué sur du PDA dans une petite boîte de Pétri de 55 mm. Pour la germination de ces spores isolées, les boîtes ont été incubées à 25°C jusqu'à envahissement de la boîte par le mycélium.

## II. Préparation de l'inoculum

La souche de *F. avenaceum* I496 (collection INRAE-MycSA) et les souches isolées des échantillons de blé tunisien ont été conservées en chambre froide (4°C) dans de petites boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre contenant du PDA. Le milieu carboxyméthylcellulose (CMC) (15 g CMC, 1 g d'extrait de levure, 0,5 MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pour 1 L de milieu) (Sigma, France) est utilisé pour la production de spores. Avant expérimentation, plusieurs implants (4-5 plugs) sont prélevés, puis mis en culture dans le milieu CMC (50 mL) sous agitation (180 rpm, Infors™ Multitron Standard) pendant 48 heures minimum et à 25°C. Cette solution est ensuite filtrée en utilisant des filtres Sefar Nitex 100µm (Sefar Nitex® 100 µm, VWR) et centrifugée à 10000 rpm pendant 5 min. Le dépôt récupéré est ensuite rincé à l'eau distillée stérile, le nombre de spores est compté sur cellule de Malassez et dilué pour obtenir une concentration finale de  $10^6$  spores mL<sup>-1</sup>.

### III. Milieux et conditions de culture

Pour le dosage de la production des enniatines in-vitro, le milieu FDM liquide a été utilisé. En effet, ce milieu a démontré une stimulation de la production des enniatines par les *Fusarium*. Ce milieu contient 12,5 g de glucose, 4,25 g de NaNO<sub>3</sub>, 5 g de NaCl, 2,5 g de MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1,36 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0,0029 g de ZnSO<sub>4</sub> pour 1 L de milieu (Fanelli et al., 2014). Pour les cultures effectuées dans du FDM solide, 15 g d'agar ont été ajoutés dans la composition décrite précédemment.

Pour le dosage de la production de TCTB in-vitro dans un milieu liquide, le milieu MS (Minimum synthetic medium) a été utilisé suivant la composition suivante : 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,017 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 g glucose et 0,1 mL de solution d'éléments trace de Vogel pour 1 L de milieu (Merhej et al., 2011).

Les cultures sont réalisées en trois répliques. Dans le cas des cultures effectuées sur milieu solide, des boîtes de Pétri stériles (90 mm de diamètre, VWR) contenant 10 mL de milieu gélosé sont inoculées avec 100 µL de suspension de spores déposés au centre des boîtes. Ces cultures sont incubées à 25°C et à l'obscurité. L'évolution de la croissance des cultures a été mesurée par prise de photographies et analyse des surfaces à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ. Pour les cultures dans les milieux liquides, 8 mL de milieu de culture ont été versés dans des boîtes de Pétri de 55 mm et 100 µL de la solution de spores ont été ajoutés. Les cultures ont été incubées à 25 °C et à l'obscurité. A l'arrêt des cultures, les contenus des boîtes ont été transvasés dans des tubes pré-pesés (Eppendorf, 15 mL) et centrifugés pendant 10 min à 5000 rpm. Le surnageant a été récupéré pour effectuer les différents dosages de toxines. Le culot contenant la masse fongique est congelé à -80°C pendant 24 h avant d'être lyophilisé pendant 48 h (Cryotec®). Le mycélium lyophilisé a été pesé dans le tube et la biomasse fongique a été déterminée en soustrayant la masse du tube pré-pesé de la masse du tube contenant le mycélium lyophilisé.

### IV. Extraction des TCTB et des enniatines

#### 1. A partir de grain

Les grains de lots de céréales tunisiens ont été broyés finement. Cinq grammes de la poudre ont été transvasés dans un tube de 50 mL. Par la suite 20 mL d'une solution acétonitrile/eau (84 :16, v/v) y a été ajoutée. Le mélange a été agité pendant 1 h à 50 rpm et centrifugé par la suite à 4700 rpm pendant 10 minutes. Dix mL du surnageant ont été récupérés et filtrés sur une colonne

trichothecene P® (RBiopharm, Darmstadt, Germany) pour l'extraction des TCTB. Cette étape n'était pas réalisée pour l'extraction des enniatines. Quatre mL du filtrat ont été évaporés à sec à 45°C sous flux d'azote.

## 2. En milieu liquide

Cinq mL de milieu de culture sont extraits avec 10 mL d'acétate d'éthyle (VWR, USA). Après 15 min d'agitation à 50 rpm (type vortex Multi reax, Grosseron), les échantillons ont été vortexés vigoureusement pendant 2 minutes. Après la décantation, 5 mL de la phase organique sont récupérés et évaporés à sec à 45 °C sous flux d'azote.

## 3. En milieu gélosé

Le contenu gélosé d'une boîte de pétri (10 mL) a été coupé en petits morceaux et récupéré dans un tube de 50 mL. 35 mL d'acétate d'éthyle et 20 billes de verres sont ajoutés dans le tube. Le tout est vortexé vigoureusement pendant 30 secondes et agité par la suite à 150 rpm pendant 10 min. Le contenu du tube a été filtré sur un papier Whatman 2V positionné sur un entonnoir en verre. Dix mL du filtrat ont été prélevés et évaporés à sec à 45 °C sous flux d'azote.

# V. **Dosage des TCTB et des enniatines**

L'extrait sec est repris dans 200 µL de méthanol/eau (50:50, v/v) (VWR, USA) puis filtré sur un filtre seringue (0,22 µm) avant d'être analysés par UPLC-DAD (Ultra High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector) ou HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector).

La chaîne UHPLC Shimadzu Prominence est équipée d'un échantillonneur automatique SIL-30AC et d'un détecteur à barrettes de diodes SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, France).

La chaîne HPLC Agilent Technologies 1100 series est équipée d'un détecteur à barrettes de diodes (Agilent) et d'un logiciel de traitement des chromatogrammes ChemStation.

## 1. Enniatines

La quantification est effectuée par UPLC-DAD avec un étalonnage externe en utilisant des étalons commerciaux d'enniatives de type A, A1, B et B1 (Sigma-Aldrich, France). A partir d'une



solution mère à 100 µg/mL, six dilutions, soient six points de gamme sont préparées dans du méthanol/eau (50:50, v/v) pour obtenir une gamme d'étalonnage allant de 1 µg mL<sup>-1</sup> à 100 µg mL<sup>-1</sup>. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Kinetex C18 (150 x 4,6 mm ; 3,5 µm) (Phenomenex, USA) maintenue à 45°C.

Les phases mobiles sont constituées d'eau ultra pure (solvant A, Biopure Romer) et d'acétonitrile (solvant B, VWR), et le gradient d'élution est présenté dans le Tableau 2. Le volume d'injection est de 5 µL. Le débit est maintenu à 1.4 mL min<sup>-1</sup>. Les spectres UV-visibles sont enregistrés de 190 à 450 nm et les aires de pic sont mesurées à 205 nm. Après calcul, les concentrations en mycotoxines sont exprimées en µg g<sup>-1</sup> de masse sèche de grain extrait, en µg g<sup>-1</sup> sec de mycélium extrait, ou en µg cm<sup>-2</sup> de mycélium. Elles sont présentées individuellement selon le type d'enniatines (A, A1, B ou B1).

**Tableau 2 :** Gradient d'élution pour l'analyse des enniatines par UPLC-DAD (solvant A : d'eau ultra pure, solvant B : acétonitrile)

<b>Temps (min)</b>	<b>% Solvant (A)</b>	<b>% Solvant (B)</b>
0	70	30
2,5	70	30
7,5	1	99
11	1	99
11,5	70	30
14	70	30

## 2. TCTB

La quantification des TCTB est effectuée par HPLC-DAD, avec un étalonnage externe en utilisant des étalons commerciaux de TCTB : DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV, FX et ZEA (Romer Labs, France). A partir d'une solution mère à 100 µg mL<sup>-1</sup>, cinq dilutions sont préparées dans du méthanol/eau (50:50, v/v) pour obtenir des gammes d'étalonnage allant de 2,5 µg mL<sup>-1</sup> à 100 µg mL<sup>-1</sup>. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Kinetex C18 (150 x 4,6 mm ; 3,5 µm) (Phenomenex, USA) maintenue à 45°C.

Les phases mobiles sont constituées d'eau ultra pure MilliQ /acide o-phosphorique pH 2,6 (solvant A, Biopure Romer) et d'acétonitrile (solvant B, VWR) et le gradient d'élution est présenté dans le Tableau 3. Le volume d'injection est de 5  $\mu\text{L}$ . Le débit est maintenu à 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Les spectres UV-visibles sont enregistrés de 220 à 550 nm et les aires de pic sont mesurées à 225 nm pour les TCTB et à 230 nm pour la ZEA. Les concentrations en toxines sont exprimées en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de grain.

**Tableau 3:** Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des TCTB par HPLC-DAD (solvant A : d'eau ultra pure, solvant B : acétonitrile)

<b>Temps (min)</b>	<b>% Solvant (A)</b>	<b>% Solvant (B)</b>
0	93	7
10	70	30
15	10	90
20	10	90
22	93	7
27	93	7

## **VI. Extraction de l'ADN et PCR**

L'extraction d'ADN a été effectuée par séparation magnétique à l'aide du robot MagMAX Express et le kit Nucleo Mag 96Plant Marcherey-Nagel. A partir d'une culture de 6 à 7 j sur un milieu PDA dans une boîte de Pétri de 55 mm, 50 mg du mycélium ont été récupérés dans un tube de 2 mL (Eppendorf) et lyophilisés. Deux billes en inox ont été ajoutées dans le tube et l'ensemble a été passé au broyeur (Precellys). 500  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse MC1 et 10  $\mu\text{L}$  de RNase ont été ajoutés dans le tube et agités vigoureusement par Vortex. Le tube a été incubé pendant 30 mn à 56°C et par la suite centrifugé à 16000g pendant 20 mn. Entre temps une plaque 96 puits a été préparée en déposant les différents tampons de lavage et d'élution selon les recommandations du fabricant. 100  $\mu\text{L}$  récupéré du tube de lyse et 15  $\mu\text{L}$  de billes magnétiques (NucleoMag c-Beads) sont ajoutés dans la ligne de la plaque équivalente. L'ADN s'attache aux billes magnétiques qui sont spécialement conçues pour le récupérer. Les billes sont récupérées du milieu grâce à un peigne magnétique et passées dans les autres puits de lavage un à un pour les déposer à la fin dans les puits d'élution. La qualité et la quantité d'ADN est vérifiée par dosage au spectrophotomètre

(Nanodrop 1000/2000) à 230, 260 et 280 nm ; la qualité de l'ADN extrait a été vérifié en calculant les rapports 260/280 et 260/230.

Pour l'identification des souches isolées, des PCR ont été effectuées sur des gènes ciblés avec l'ADN extrait. En effet, une PCR du gène de la  $\beta$ -tubuline en utilisant les primers  $\beta$ tub F261/ $\beta$ tub R536 et de la région ITS avec les primers universels ITS1/ITS4 a été effectuée (tableau 5). Le mix du PCR utilisé est de la composition suivante : 15.25  $\mu$ l d'eau, 5 $\mu$ l de tampon KAPA HIFI (5X); 0.75  $\mu$ l de mix dNTP KAPA (10mM), 0.75  $\mu$ l de primer sens, 0.75  $\mu$ l de primer antisens, 2  $\mu$ l de l'ADN et 0.5  $\mu$ l de l'ADN polymérase KAPA HIFI (1 U/ $\mu$ l) pour un volume total de 25  $\mu$ l. Le cycle PCR a été effectué selon le tableau 4.

**Tableau 4:** Paramètres d'amplification de la PCR

Etape	Nombre de cycle	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	1	95	3 minutes
Dénaturation	1	98	20 secondes
Hybridation	35	58	45 secondes
Élongation	1	72	60 secondes
Elongation finale	1	72	2 minutes

**Tableau 5:** Caractéristiques des amorces utilisées pour les gènes de références

Gène de référence		Amplicon (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	T° d'hybridation (°C)	Référence
$\beta$ -tubuline	$\beta$ -tub 261F	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	248	58	Pinson-Gadais et al. (2007)
	$\beta$ -tub 536R	GATTGACCGAAAACGAAGTTG			
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500-600	58	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

## VII. Extraction des huiles essentielles

Pour cette étude, huit plantes aromatiques originaires de la Tunisie ont été sélectionnées (*Ammoides pusilla* (AP) *Thymus capitatus* (TC) *Artemisia absinthium* (AA) *Carum carvi* (CC) *Myrtus communis* (MC) *Origanum vulgare* (OV) *Schinus terbenfonius* (ST) *Mentha spicata* (MS)). Les plantes de AP, TC, AA, CC, MC, OV et ST ont été achetées à l'état sec au marché local des plantes médicinales à Tunis. D'autres lots de AP, de TC et de MS ont été récoltés manuellement sur champs et séchés pendant 2 semaines à l'air ambiant et à l'abri du soleil.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation par le système de Clevenger. Les parties aériennes des plantes séchées ont été pesées et déposées dans le ballon du système. De l'eau a été ajoutée en fonction de la masse des plantes à extraire et portée à ébullition. L'huile essentielle obtenue a été récoltée et conservée au froid à 4°C en présence de sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$EY = EOW/DMW \times 100$  avec EY: rendement d'extraction, EOW: masse de l'huile essentielle, DMW: masse de matière végétale sèche

## VIII. Caractérisation des huiles essentielles

L'analyse du profil chimique des huiles essentielles par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890, couplé à un spectromètre de masse Agilent 5975C avec ionisation par impact électronique (70 eV), en utilisant une colonne HP-5 (30 m × 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm). Les conditions opératoires pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse étaient comme suit : la température du détecteur a été fixée à 280 °C ; la température de l'injecteur à 210 °C ; le gradient de température du four variait de 180 °C (1 min) à 200 °C (15 min) puis de 220 °C (3 min) à 300 °C (10 min). Le dihydrogène (H<sub>2</sub>) a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 0,9 mL min<sup>-1</sup> ; un rapport de split de 1:100 et la plage spectrale de masse a été enregistrée à partir de 50-550 amu (m/z). Le volume injecté de la solution d'huile essentielle diluée à 1 % dans l'hexane (Pureté 97 %) (Merck, Darmstadt, Allemagne) était de 1 µL. L'identification des composants des huiles essentielles a été établie par comparaison de leurs spectres MS avec ceux rapportés dans la littérature et par appariement informatique avec la bibliothèque de spectres de masse Wiley (Onzième édition/NIST 2009).

## **IX. Evaluation de l'activité des huiles essentielles**

L'évaluation de l'activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles et du thymol a été effectuée selon 3 designs expérimentaux différents et complémentaires (les différentes concentrations testées seront précisées dans les parties expérimentales correspondantes de ce manuel) :

### **1. Dans le milieu liquide**

Dans des plaques de 24 puits, 1,96 mL du milieu FDM liquide ont été déposés dans chaque puits. Les quantités d'huiles essentielles (ou de thymol) définies à tester ont été diluées dans de l'éthanol absolu. 40 µL des solutions d'EtOH/ huile essentielle ont été ajoutés dans les puits correspondant à chaque concentration pour avoir la concentration finale en huile essentielle désirée dans un volume total de 2 mL par puits, avec une concentration en EtOH à 2%. Dans les puits tests, 10 µL de la solution de spores préalablement préparée ( $10^6$  spores/mL) ont été ensemencés dans chaque puits (sauf les puits 'Blancs').

Les plaques ensemencées sont incubées par la suite à 25°C pendant 10 j. Le suivi de croissance est fait par turbidimétrie avec un spectrophotomètre à 630 nm. A la fin de la culture, le mycélium est récupéré, lyophilisé et pesé. Le milieu liquide est récupéré pour procéder au dosage des enniatines.

### **2. Dans le milieu gélosé**

Les quantités des huiles essentielles (ou de thymol) sont définies selon les concentrations finales désirées à tester et la quantité de milieu de culture (FDM/agar) à utiliser. Le milieu de culture a été préparé, autoclavé et par la suite mis dans un bain marie pour qu'il refroidisse à 50°C. Dans des conditions stériles, l'huile essentielle est ajoutée au milieu sous agitation à la quantité nécessaire de milieu FDM. La solution huile essentielle/milieu est immédiatement dispatchée dans les boites de pétri de 90 mm pour un volume total de 10 mL par boite. Dans le cas du thymol, les quantités calculées ont été diluées dans de l'EtOH absolu et ajoutées au milieu de culture comme décrit précédemment pour obtenir la concentration finale définie en thymol pour le volume total du milieu, en veillant à ce que concentration d'EtOH ne dépasse pas 2%. Trois répétitions par condition ont été effectuées. Quand le milieu de culture est complètement solide et froid, les boites sont ensemencées par 100 µL de la solution de spores préalablement préparée ( $10^6$  spores/mL). Les cultures sont par la suite incubées à 25 °C pendant 10 j.

### 3. En fumigation

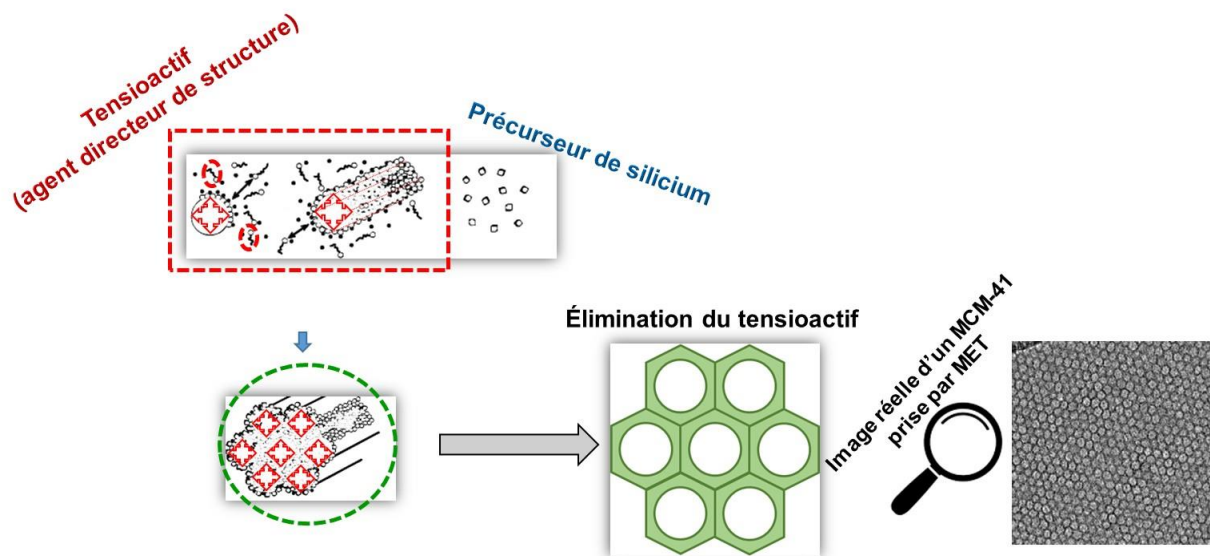
Dix mL de FDM/agar ont été déposés dans des boîtes de Pétri de 90 mL dont le dos a été gradué selon deux axes perpendiculaires. Le milieu refroidi, 100 µL de la solution de spores préalablement préparée ( $10^6$  spores/mL) ont étéensemencés par boîte. Dans des conditions stériles, trois boîtes de Pétri ont été placées (sans couvercles) dans un bocal fermant hermétiquement. La quantité d'huile essentielle à tester a été déposée sur un  $\text{cm}^2$  de papier filtre stérile posé à son tour sur un couvercle de boîte de pétri de 55 mm. Le couvercle avec le papier filtre est immédiatement placé dans le bocal avec les trois boîtes de Pétriensemencées, le bocal est fermé et le tout a été mis en incubation pour 10 jours à 25°C. Dans le cas des tests effectués avec le thymol, ce dernier a été dissout dans de l'éthanol absolu et 50 µL de la solution finale a été déposé sur le papier filtre comme décrit précédemment.

## **X. Synthèse, imprégnation et enrobage des nanosupports**

### 1. Synthèse de la silice mésoporeuse

Pour la synthèse du nanosupport, deux tensioactifs, ou encore agents directeurs de structure, ont été employés, ils sont connus commercialement sous les noms CTAB et P123. Le CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) est un tensioactif de type cationique (il va jouer le rôle d'un co-surfactant) et le P123 est de type non-ionique. Le tétraéthylorthosilicate (TEOS),  $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$ , a été utilisé comme précurseur de silicium. La synthèse est basée sur le procédé sol-gel et a été menée en milieu acide. Une solution contenant 1,16 mL d'eau distillée, 20 mL de chlorure d'hydrogène (HCl), 0,2g de CTAB, 10 mL d'EtOH absolu et 1,2 g de P123 a été préparée et chauffée pendant 45 min à 40 °C sous agitation. Quatre mL de TEOS ont été ajoutés et le tout chauffé pour 45 min de plus à 40 °C sous agitation. La solution obtenue a été passée en bain d'ultrasons pendant 15 min puis séchée dans un four à 70 °C pendant 16 h. La nanopoudre a été récupérée et le tensioactif a été éliminé par Soxhlet pendant 48 h.

La polycondensation du précurseur de silicium autour des micelles formés par l'agent directeur de structure produit le réseau siliceux (silice amorphe). L'élimination des micelles permet de générer le réseau poreux avec des groupes hydroxyles à la surface. Le principe de la synthèse est illustré sur la Figure 1.



**Figure 1** : Mécanisme général de la synthèse d'une silice mésoporeuse de type MCM-41

La nanopoudre a été séchée à 70 °C pendant 18 h puis conservée à 4 °C.

## 2. Encapsulation des huiles essentielles

Deux voies d'encapsulation ont été essayées, l'incubation et l'imprégnation. L'incubation a été réalisée par le mélange de la nanopoudre et l'huile essentielle, incubé à 40 °C pendant 24 h (à l'aide d'un agitateur-incubateur).

Pour l'imprégnation, une solution hydroalcoolique a été utilisée pour dissoudre l'huile essentielle : on dissout l'huile dans l'alcool et on ajoute de l'eau. La solution a été ensuite coulée sur le nanosupport goutte à goutte. Le solvant a été évaporé sous la hotte avant la récupération du système hybride poudre/huile.

## 3. Dépôt de la couche externe de chitosane

Afin de bloquer les pores et de prolonger le largage de l'huile, une couche de chitosane a été déposée sur la surface externe de la silice. D'abord, le chitosane a été dissout dans une solution d'acide acétique (10%). Puis, les nanoparticules de silice avec l'huile encapsulée ont été ajoutées et laissées sous agitation à température ambiante pendant 36 h.

## **XI. Caractérisation des nanoproduits et suivi du largage**

### **1. Caractérisation**

Les propriétés texturales de la silice synthétisée à savoir la surface spécifique, la taille des pores, la distribution de la taille des pores et le volume poreux ont été déterminées par manométrie d'adsorption-désorption d'azote à 77K à l'aide de Belsorp-MAX (Japan bel Co, Ltd., Japon). L'échantillon en poudre a été préalablement dégazé à 100 °C pendant 3 h afin d'éliminer les espèces adsorbées restant dans le réseau poreux. La surface spécifique a été déterminée par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET) et la distribution de la taille des pores a été évaluée par la méthode Barrett-Jorner-Halenda (BJH).

Une analyse thermogravimétrique (ATG) de la silice brute et de la silice mésoporeuse avec l'huile encapsulée a été réalisée à l'aide de l'instrument Setaram (set sys evolution 16 model) en chauffant les poudres à partir d'une température ambiante jusqu'à 800°C à une vitesse de chauffage linéaire de 10 °C.min<sup>-1</sup> sous air.

### **2. Suivi du largage de l'huile essentielle**

Deux méthodes de suivi de largage de l'huile essentielle ont été effectuées :

Le suivi de la diffusion de la libération de l'huile essentielle a été fait selon le protocole décrit par Qiu et al. (2017). 45 mL d'une solution de tampon PBS à pH 7,6 ont été préparés à partir d'une solution mère 10x et du méthanol y a été ajouté pour une concentration finale de 20%. Des suspensions d'huiles essentielles ou des huiles essentielles encapsulées dans les nanopoudres ont été préparées dans 4 mL de tampon PBS (12,5 µL d'huile essentielle ou 25 mg de nanopoudre). Les suspensions préparées ont été mises dans des tubes de dialyse en cellulose plongés dans la solution de PBS/méthanol. Les solutions ont été placées à 25 °C avec une légère agitation. Des mesures en spectrophotométrie UV ont été effectuées jusqu'à 168 h d'observation. Pour procéder à ces mesures, 3 mL sont prélevés à chaque fois. Ces 3 mL sont remplacés par 3 mL de solution PBS/méthanol. L'effet de dilution est pris en considération lors des mesures suivantes.

Le suivi de la diffusion des huiles essentielles dans l'air à température ambiante a été fait en plaçant des suspensions d'huiles essentielles ou des huiles essentielles encapsulées dans les nanopoudres dans des coupelles laissées à température ambiante et pesées régulièrement pour évaluer la perte de masse.



## **XII. Evaluation de l'activité des nanoproducts**

L'évaluation de l'activité antifongique et antimycotoxines des nanoproducts préparés a été faite par contact dans le milieu solide et par fumigation en suivant les protocoles établis pour les tests avec les huiles essentielles et décrits précédemment (IX.2 et IX.3).



# *Chapitre 1*



# Chapitre I : Isolement et identification de souches de *Fusarium* productrice d'enniatives

## I. Introduction

Ce premier chapitre du manuscrit présente les travaux effectués, lors de la première étape de ce projet de thèse, qui consiste en la sélection et la caractérisation de souches d'espèces de *Fusarium* productrices d'ENN's.

Une première souche de *Fusarium avenaceum* I496 a été sélectionnée pour cette partie des travaux. Cette souche fait partie de la collection de l'unité de recherche MycSA et été isolée à partir de grain de blé. Elle a fait objet d'un travail complet d'identification et de caractérisation et son profil mycotoxique a été préalablement déterminé. *F. avenaceum* I496 produit essentiellement les enniatives B et B1 et en plus faible quantité l'enniatine A1. Sa production d'enniatives est maximum à une température de 25°C et à pH du milieu entre 4 et 5.

Pour la sélection d'une souche de *Fusarium* productrice d'enniatives d'origine tunisienne, un travail d'isolement à partir d'échantillons de blé tunisien, d'identification et de caractérisation a été effectué. Les résultats de ce travail est présenté dans ce chapitre sous format d'un article scientifique publié dans la revue Journal of Fungi.

Article

# Characterization of *Fusarium acuminatum*: A Potential Enniatins Producer in Tunisian Wheat

Yasmine Chakroun <sup>1,2</sup>, Souheib Oueslati <sup>2</sup>, Laetitia Pinson-Gadais <sup>1</sup>, Manef Abderrabba <sup>2</sup>  
and Jean-Michel Savoie <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> INRAE, UR1264 Mycology and Food Safety, MycSA, F-33882 Villenave d'Ornon, France; yasminechakroun@gmail.com (Y.C.); laetitia.pinson-gadais@inrae.fr (L.P.-G.)

<sup>2</sup> IPEST—Laboratory Molecules Material and Applications, LMMA, University of Carthage, Tunis 2070, Tunisia; souheibo@yahoo.fr (S.O.); manef.abderrabba@ipest.rnu.tn (M.A.)

\* Correspondence: jean-michel.savoie@inrae.fr; Tel.: +33-557-122-496

**Abstract:** *Fusarium* Head Blight (FHB), caused by multiple species of *Fusarium* in small grain cereals, is a significant and long-standing problem anywhere in the world. Knowing regional *Fusarium* spp. present on non-symptomatic grains and their potential for mycotoxin production is of concern for identifying novel actions for FHB and mycotoxin management, such as treatments with essential oils. Analyzing the mycotoxin content of grains from non-symptomatic ears of different wheat varieties cultivated in Tunisia, we isolated *Fusaria* specimens identified as *F. culmorum* and *F. acuminatum* using analysis of the partial DNA sequence of the  $\beta$ -tubulin gene and ITS region. Two isolates of the latter species, uncommon in cereal grains in this region until now, were shown to be effective producers of enniatins in vitro, with 1390 and 3089  $\mu\text{g g}^{-1}$  mycelial biomass (dry) in 11-day-old cultures. The susceptibility of an isolate of *F. acuminatum* to the fungistatic and antimycotoxin effects of eight essential oils was measured. Essential oils from *Anmoides pusilla* and *Thymus capitatus* used at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  in an agar culture medium, affected the mycelial growth by 55% and 79%, respectively and reduced the accumulation of enniatins per unit of mycelial colony by 26% and 52%, respectively. Finally, *F. acuminatum* was shown to be a contaminant of wheat grains in Tunisia and it may contribute to the contamination in enniatins. Two essential oils of Tunisian plants could be used for developing a biofungicide limiting both its mycelial growth and its accumulation of mycotoxins in grains.

**Keywords:** mycotoxins; essential oils; molecular taxonomy; fungistatic activity



**Citation:** Chakroun, Y.; Oueslati, S.; Pinson-Gadais, L.; Abderrabba, M.; Savoie, J.-M. Characterization of *Fusarium acuminatum*: A Potential Enniatins Producer in Tunisian Wheat. *J. Fungi* **2022**, *8*, 458. <https://doi.org/10.3390/jof8050458>

Academic Editor: Kimiko Yabe

Received: 5 April 2022

Accepted: 27 April 2022

Published: 28 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cereal-based food crops are an important part of the culinary heritage of multiple cultures all over the world. In the Northern African region, food intakes are based mainly on cereals such as wheat, barley, maize, and sorghum consumed as raw grains, flours, or processed products. Furthermore, cereals are susceptible to fungal diseases such as Fusarium Head Blight (FHB) caused by *Fusarium* species. The disease reduces the yield of harvested cereals and impacts the quality of grains, which become starchy and inadequate for industrial processing.

The different *Fusarium* species causing this disease are mainly *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, and *F. poe*. These *Fusarium* species are able to produce mycotoxins defined as toxic secondary metabolites of low molecular weight, are thermally stable and have a high bioaccumulation ability in crops from sowing to harvesting in the field, but also at storage and during food processing [1]. Mycotoxins at high concentrations are potentially harmful to humans' and animals' health. The most known *Fusarium* mycotoxins in cereals are Type B Trichothecene (TCTB) including deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives, Type A Trichothecenes, Fumonisin, and Zearalenone (ZEA). They have a wide range of harmful effects such as carcinogenicity, teratogenicity, and mutagenicity [2]. A less known *Fusarium* mycotoxins group, called



“emergent mycotoxins”, is receiving increasing interest from researchers. Enniatins (ENNs), Beauvericin, and Moniliformin mainly make up this group [3]. Although no acute toxicity was reported from the exposure to these mycotoxins, *in vitro* studies demonstrated their cytotoxicity on different cell lines, their ability to impair cell cycle distribution, to cause mitochondrial dysfunction, and to induce apoptosis. Moreover, their presence in large amounts and their natural co-presence with other mycotoxins may induce synergistic effects [4]. Among the 29 identified ENNs, four analogs are the most detected in cereal grains, enniatin A (ENA), enniatin A1 (ENA1), enniatin B (ENB), and enniatin B1 (ENB1) [4]. Most of the *Fusarium* strains that have been reported to produce these ENNs in cereals are part of the *F. sambucinum* species complex (i.e., *F. venenatum* and *F. poae*) as well as the *F. tricinctum* species complex composed by *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. torulosum*, and *F. acuminatum* [5].

Several *Fusarium* species have been found in cereals cultivated or consumed in Tunisia. Studying FHB symptomatic heads at the filling stage from 11 wheat fields in Northern Tunisia during the 2004 and 2007 crop seasons, these were found as the main *Fusarium* species: *F. culmorum*, *F. avenaceum*, and *F. equiseti* [6]. In another study during the 2004 crop season on infested durum wheat spikes, it was reported that the most common species isolated were *Microdochium nivale* var *nivale* (63.5%), *F. culmorum* (26%), *F. pseudograminearum* (9%), and *F. avenaceum* (1.5%) [7]. When determining the mycoflora of wheat and barley grain samples consumed in Tunisia in 2011, Jedidi et al. [8] isolated *Fusarium* species from 18% of wheat and 50% of barley samples, with a mean percentage of infected grains per sample of 1.17% and 1.1% in wheat and barley grains, respectively. The main *Fusarium* species they isolated was *F. equiseti*. To the best of our knowledge, no report has been conducted about the isolation of *F. acuminatum* from cereals produced in Tunisia. It is obvious that the prevalent *Fusarium* species found in Tunisian wheat grains are producers of TCTB or ENNs. However, in a multi-mycotoxin analysis in 34 wheat and 5 barley samples of asymptomatic grains from Tunisian markets in 2009, Oueslati et al. [9] did not detect TCTB. In another study focused on the detection of emerging mycotoxins, it was shown that 96% of the analyzed wheat and barley samples were contaminated with different ENNs [10].

Key global actions for mycotoxin management in wheat and other small grains have recently been reviewed [11]. The use of fungicides is one of them. The efficiency depends on the active molecule, the application timing, method and rate, the cereal variety, and the populations and species of *Fusarium* present [11]. However, to limit the accumulation of pesticide residues in the environment and in food, and the dependency on the companies producing them, alternatives to synthetic fungicides using local resources are actively searched for in various countries. The use of non-toxic and eco-friendly plant essential oils (EOs) is one alternative. Some EOs have been shown to be effective against *Fusarium* species and their production of mycotoxins [12–15]. Finding alternatives to synthetic fungicides for controlling local populations of *Fusarium* spp. causing mycotoxin contamination of wheat and small grain cereals is of concern in Tunisia and other Mediterranean countries, as a contribution to the improvement in food safety.

The present work aimed at improving the knowledge on the contamination of non-symptomatic Tunisian wheat grains by *Fusarium* species and mycotoxins (both regulated and emerging groups), and to shed light on *F. acuminatum*, a rarely found species that had never been associated with ENNs production in Tunisian cereals before. A strain isolated from the studied Tunisian wheat grains was characterized as a potential source of ENNs contamination. Its susceptibility to EOs from eight Tunisian plants was assessed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Wheat Samples

Twenty-three samples of wheat grain from various varieties were randomly collected at harvest time at the locality of Béjà (North West Tunisia), representing six durum wheat varieties (Karim, Khia, Maâli, Nasr, Om Rabii, Razzek) and four bread wheat varieties (Byrsa, Hidra, Salambô, Utique) on two years, 2017 and 2018, and three additional bread wheat

varieties (Vaga, Tahent, Badii) in 2017. All the samples were stored in hermetic polyethylene bags at room temperature until mycotoxins analysis and isolation of *Fusarium* species.

## 2.2. Mycotoxin Extraction from Wheat Grains

Mycotoxin extraction from grains was adapted from a previously published method [16]. The homogenized grains were dried at 50 °C for 48 h, then ground into a fine powder (particles size <100 µm). Five g of powder were extracted with 20 mL acetonitrile/water (84:16, v/v) rotating end-over-end at 50 rpm for 60 min, followed by centrifugation (4 °C, 10 min at 3000× g) and the supernatant was collected. The fraction was either directly evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream for further analysis of ENNs or purified through a trichothecene P<sup>®</sup> column (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) and 4 mL of the eluate was collected before drying by evaporation for further analysis of TCTBs and ZEA.

## 2.3. Mycotoxin Analysis—TCTB and ZEA

The dried extracts were resuspended in methanol/water (1:1, v/v) and filtered through a 0.2 µm filter (Phenomenex, Le Peck, France) for the quantification of ZEA and TCTBs, including DON and its 15 and 3 acetylated derivatives (3-ADON and 15-ADON), Nivalenone (NIV), and its derivative, Fusarenon X (FUS-X), using an Agilent Technologies 1100 series HPLC chain, equipped with an Agilent photodiode array detector (DAD) and the ChemStation chromatography manager software (Agilent, Waldbronn, Germany). The injection volume was 10 µL. Separation was achieved on a Kinetex XB-C18 100 Å column (150 × 4.6 mm<sup>2</sup>, 2.6 µm) (Phenomenex, Le Peck, France) maintained at 45 °C. The mobile phase consisted of acidified water with ortho-phosphoric acid, pH 2.6 (solvent A), and acetonitrile (solvent B), and the following elution gradient was used: starting at 93% A and 7% B for 1 min, 93% to 70% A and 7 to 30% B in 10 min, 70 to 10% A and 30 to 90% B in 10 min, 10 to 93% A and 90 to 7% B in 2 min, and 5 min post-run equilibration with the initial conditions. The flow rate was kept at 1 mL min<sup>-1</sup> for a total run time of 27 min. UV-VIS spectra were recorded from 220 to 550 nm and peak areas were measured at 230 nm. Quantification was performed using external calibration ranging from 6.25 to 100 µg mL<sup>-1</sup> prepared with standard solutions (Romer Labs, Tulln, Austria). The limit of quantification was 0.1 µg g<sup>-1</sup> grain for each of the mycotoxins.

## 2.4. Mycotoxin Analysis—ENNs

For the quantification of ENNs, the dried extracts were resuspended in acetonitrile/water (85:15, v/v), vortexed, filtered through 0.45 µm filters, and 10 µL was injected in an Agilent Technologies 1100 series HPLC chain, equipped with an Agilent photodiode array detector (DAD) (Agilent, Waldbronn, Germany) for separation on a Zorbax Eclipse XDB-C8 (4.6 × 15 mm<sup>2</sup>, 5 µm) maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of MilliQ water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow was kept at 1 mL min<sup>-1</sup> for a total run time of 26 min. The elution gradient was: 30% A and 70% B for 5 min, 30 to 10% A and 70 to 90% B in 10 min, 10% A and 90% B for 5 min, 10 to 30% A and 90 to 70 % B in 1 min, 30% A and 70% B for 5 min. Absorbance spectra were recorded from 190 to 450 nm and peak areas were measured at 205 nm. Quantification was performed using external calibration ranging from 1 to 100 µg mL<sup>-1</sup> prepared with standard solutions of enniatin A (ENA), enniatin A1 (ENA1), enniatin B (ENB), enniatin B1 (ENB1) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier France). The limit of detection was 0.01 µg g<sup>-1</sup> of grain.

Alternatively, to check the presence/absence of the targeted mycotoxins measured with the HPLC/DAD method, five samples collected in 2018 were randomly selected for extractions and LC-MS/MS analysis performed as in Ducos et al. [16] using a QTrap 2000 system (AB Sciex, Courtaboeuf, France) equipped with an Electro Spray Ionization (ESI) source and an 1100 Series HPLC system (Agilent, Les Ulis, France), as an alternative to the HPLC-DAD analysis presented above. Calibration in the matrix was performed using pure standards of ENA, ENA1, ENB, ENB1 (Sigma-Aldrich, France) diluted at 10



to 250 ng mL<sup>-1</sup>. Retention times were 6.35, 6.28, 6.11, 6.20 min for ENA, ENA1, ENB, ENB1, respectively, and their precursor ions were 699.49, 685.48, 5657.44, and 671.46 m/z, respectively. The limit of detection was 0.8 ng g<sup>-1</sup> of grain

### 2.5. *Fusarium* Selection, Isolation and Microscopic Characterization

The sample's contamination with *Fusarium* species was after surface sterilization. A total of 100 grains alternatively selected from each sample were soaked in 10% sodium hypochlorite for 5 min and rinsed 3 times with sterile deionized water before being placed on potato dextrose agar (PDA) medium. After incubation for 3 to 5 days at 25 °C, the mycelial growth was examined and plugs from the different mycelial colonies were transferred to new PDA plates. Monosporic cultures were obtained by suspension dilutions followed by isolation under a stereomicroscope of one germinated spore per isolate. The monosporic cultures were morphologically identified according to Leslie and Summerell keys [17]. The macroscopic examination of the cultures of the fungal species was carried out on PDA and on FDM-agar medium the composition of which was: 12.5 g of glucose, 4.25 g of NaNO<sub>3</sub>, 5 g of NaCl, 2.5 g of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.36 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 g of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0029 g of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g of agar, 1 L of water [18]. The characteristics of micro- and macroconidia (appearance of the conidiophore, form, and size) were observed under an optical microscope (magnifications: 100×, 2000×).

### 2.6. Molecular Characterization and Taxonomy

Four monosporic isolates were grown on PDA for 7 days for collecting mycelium, which was freeze-dried and ground to a fine powder with the Tissue Lyser System<sup>®</sup> (Qiagen, Les Ulis, France). For the fungal DNA extraction, the NucleoMag 96 Plant Macherey-Nagel Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Germany) was used according to the supplier's instructions. Briefly, 500 µL of MC1 lyse buffer and 10 µL of RNase were added to 50 mg of ground mycelium, then vigorously vortexed. The samples were incubated for 30 min at 56 °C, centrifuged at 16,000× g for 20 min. Meanwhile, a plate was prepared within the first line, 100 µL of the binding buffer MC2 and 15 µL of the NucleoMag c-Beads were added into each well. In the wells of the second line, 200 µL of washing buffer MC3 was added. In the wells of third line, 200 µL of washing buffer MC4 was added. In the wells of the fourth line, 200 µL of an 80% solution of EtOH was added, 200 µL of washing buffer MC5 in the fifth line and, finally, 80 µL of MC6 elution buffer in the last line. In total, 100 µL of each sample solution was added in the wells of the first line of the plate and the latter was positioned into the MagMax<sup>™</sup> Express Robot (Applied Biosystems, Espoo, Finland). The extracted DNA was finally eluted in the last line of the plate. The quality and quantity of the extracted DNA were assessed both by 1% agarose gel electrophoresis and by UV spectrophotometry using a nanodrop<sup>®</sup> ND 1000 spectrophotometer (Labtech International LTD©, Uckfield, UK).

Further identification of *Fusarium* species was performed by PCR amplification targeting the nucleotide sequences of the transcribed spacer sites (ITS) and the β-tubulin (*β-tub*) gene. The amplification of these loci was carried out with the primers listed in Table 1. The PCR mix contained 15.25 µL of PCR-grade water, 5 µL of KAPA HIFI Buffer (5×); 0.75 µL of 10 mM KAPA dNTP Mix, 0.75 µL of each primer at 10 µM, 2 µL of the template DNA at 20 ng µL<sup>-1</sup>, and 0.5 µL of 1 U µL<sup>-1</sup> of KAPA HIFI DNA polymerase for a total reactional volume of 25 µL. The PCR cycle was conducted as follows: 3 min at 95 °C for the initial denaturation, followed by 25 cycles of 20 s at 98 °C for the denaturation phase, 45 s at the primer's annealing temperature (58 °C), 60 s at 72 °C for the elongation and, finally, 2 min at 72 °C for the final elongation.

**Table 1.** List of primers used in the work.

	Reference Gene	Primer Sequences (5'-3')	References
<i>β-tubulin</i>	β-tubulin 261F	GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC	[19]
	β-tubulin 536R	GATTGACCGAAAACGAAGTTG	
ITS	ITS1 F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG-	[20]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

The PCR product obtained was sequenced by the company GENEWIZ (Leipzig, Germany). Nucleotide sequences were aligned using the Clustal W algorithm in BioEdit 7.0 software. Sequence similarity searches were performed with BLAST (basic local alignment search tool) against NCBI public database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), 15 March 2022). Further, dendrograms were constructed using the MEGA-X program (MEGA-X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10.0.5 (Tamura, Stecher, and Kumar, 1993–2020) and original sequences of target species and nucleotide sequences (target and other species of the genus *Fusarium*) from the NCBI database were used: original nucleotide sequences of DNA sites (Beta Tubulin)—*F. acuminatum* (MH341248), *F. avenaceum* (EU357849), *F. tricinctum* (MK936369), *F. culmorum* (KP765705), and *F. graminearum* (MN416026). In addition, *Aspergillus carbonarius* (HE577803) was used as an outer group. The sequences of the four isolates from this study have the following numbers in GeneBank: 3T = ON128289, 4T = ON128290, 32T = ON128291, 33T = ON128292. The data are presented as a consensus phylogenetic tree using the unweighted pair group (UPGMA) method. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 10 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option).

### 2.7. In Vitro Growth and Production of Enniatins in Agar Media

Plugs were taken from each previously prepared monospore culture and incubated in liquid CMC medium (15 g carboxymethyl cellulose, 1 g yeast extract, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 L distilled water) for 48 h to induce sporulation. Ten μL of 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> spore suspension was inoculated on 10 mL of PDA or FDM-agar, which was previously described as an ENNs-inducing medium [18]. The FDM-agar medium composition was: 12.5 g of glucose, 4.25 g of NaNO<sub>3</sub>, 5 g of NaCl, 2.5 g of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.36 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 g of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0029 g of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g of agar, 1 L of distilled water. The cultures were incubated for 11 days and the growth was measured as the surface covered by the mycelium using ImageJ software. The mycotoxins were extracted on the last day of culture. The plate content (agar medium and mycelium) was sliced and placed into 35 mL ethyl acetate (VWR, Fontenay-Sous-Bois, France) for 15 min at room temperature rotating end-over-end at 250 rpm and filtrated on No 4 Whatman filter paper. Five mL were evaporated to dryness at 45 °C under a gentle nitrogen flow. The dried samples were resuspended with 200 μL of methanol/water (1:1, v/v) and filtered on 0.2 μm filter before ENNs' analysis using the HPLC-DAD method as in Section 2.4.

### 2.8. In Vitro Growth and Production of Enniatins in Liquid FDM

Alternatively, for assessing the production of ENNs, liquid cultures in FDM were also used as in Gautier et al. [4], with incubation for 11 d at 25 °C. After centrifugation at 5000× g and filtration, 4 mL was sampled and 8 mL of ethyl acetate was added in 15 mL PTFE tubes. The mixture was vortexed for 2 min and agitated for 15 min at 250 rpm as above. Then, 5 mL of the supernatant was evaporated to dryness at 45 °C under a nitrogen flow. The dried samples were dissolved with 200 μL of methanol/water (1:1, v/v)



and filtered on 0.2 µm filter before ENNs' analysis using the HPLC-DAD method as in Section 2.4. The mycelium collected after centrifugation was freeze-dried and weighted.

### 2.9. Assessment of the Fusarium Susceptibility to Essential Oils

The effects of EOs from eight Tunisian plants (*Ammoides pusilla*, *Artemisia absintum*, *Carum carvi*, *Mentha spicata*, *Myrtus communis*, *Origanum vulgare*, *Schinus terben-tonifolius*, *Thymus capitatus*) on the mycelial growth and production of ENNs by one of the isolates, *F. acuminatum* 33T, were measured in FDM-agar as described by Chakroun et al. [15] and in Section 2.7. Briefly, the EOs were diluted at 0.1 µL mL<sup>-1</sup> in FDM-agar medium poured into 90 mm Petri dishes. After central inoculation with a spore suspension and incubation for 10 d at 25 °C, the surface colonized by the mycelium was measured and the contents of the plates were collected for ENNs' extraction and analysis using the HPLC-DAD method.

### 2.10. Statistical Analyses

Mycelial growth and ENNs concentrations were analysed by ANOVA and Duncan's multiple range tests using SAS Software (Statistical Analysis System, version 9, Cary, NC, USA). Differences were considered at a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Mycotoxin Contamination of the Wheat Grain Samples

None of the following mycotoxins were detected in the 23 analyzed grain samples, ZEA, NIV, FUS-X, 3-ADON, and 15-ADON, while DON was detected in only one sample, the Khiar variety collected in 2018, at a concentration of 320 µg Kg<sup>-1</sup>. This variety was shown to be highly susceptible to FHB [6].

No ENA1 nor ENB were detected, but all the samples were positive for ENA and ENB1 analyzed with HPLC-DAD. The ENA level measured was 10-fold higher than the ENB1 level (Table 2). No significant differences between the collection years and the type of wheat were observed for both ENA and ENB1 (5%, *t*-test).

**Table 2.** Levels of enniatin analogues (mg Kg<sup>-1</sup>) in Tunisian wheat grains from different varieties comparing crop years (2017 vs. 2018) and cultures (Durum vs. Bread varieties).

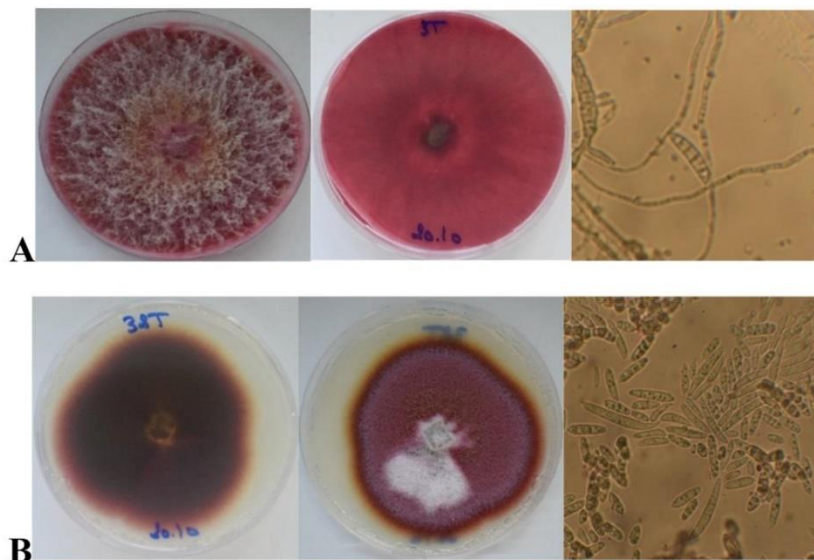
	Years			
	2017	2018	2017	2018
Number of varieties	13	10	13	10
	Enniatin A		Enniatin B1	
Mean	549 ± 147	551 ± 193	33 ± 6.1	43 ± 16.3
Maximum	716	930	47	77
Minimum	ND	ND	26	26
	Wheat Varieties			
	Durum Wheat	Bread Wheat	Durum Wheat	Bread Wheat
Number of samples	15	8	15	8
	Enniatin A		Enniatin B1	
Mean	618 ± 209	505 ± 97.4	35 ± 5.8	43 ± 17.8
Maximum	931	618	43	77
Minimum	259	340	25.1	18

± standard deviation, ND: Not detected. Enniatins were analysed by HPLC/DAD with LOD = 0.01 mg Kg<sup>-1</sup> of grain and LOQ = 0.5 mg Kg<sup>-1</sup> of grain.

None of the samples were positive for ENA or ENB1 when analysed with HPLC-MS/MS.

### 3.2. *Fusarium* Strains Isolated from Grains of Tunisian Wheat Varieties

In agreement with the encountered TCTB contamination, *Fusarium* sp. were isolated from grains of the durum wheat variety Khیار harvested in 2018 but not from the other samples. Most of the samples were contaminated with *Alternaria* sp. Seven *Fusarium* sp. colonies were obtained and purified using monospore cultures. On PDA, two types of *Fusarium* mycelial colonies were observed (Figure 1).

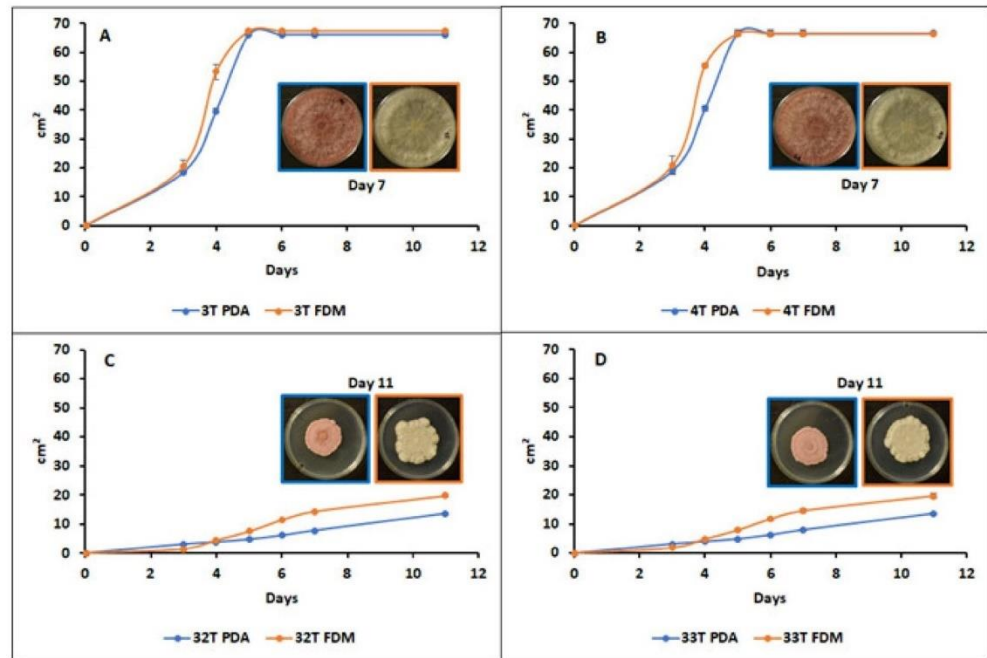


**Figure 1.** Morphological characteristics of *Fusarium* sp. isolated from asymptomatic Tunisian durum wheat grains. Observation of mycelial colonies and macroconidia grown on PDA. (A) 3T isolate representing the first morphotype after incubation at 25 °C for 7 days. (B) 32T isolate representing the second morphotype, after incubation at 25 °C for 11 days. Spores were observed under an optical stereomicroscope (Magnification 2000×).

Five isolates shared the first morphotype characterized by a pigmented mycelium that invaded the total surface of the 90 mm Petri dishes after 5 d of incubation at 25 °C and an aerial light mycelium with the presence of a brown/orange colored region in the center (sporodochia). The microscopic observation showed the presence of macroconidia widest at the midpoint of the macroconidium. The apical cell was rounded and blunt and the basal cell was notched and without a distinct foot shape. Four to five septa were observed. No microconidia were observed.

The two other isolates showed a compact flat red pigmented mycelium with no fluffy aerial parts. The observation was conducted for 11 days and the mycelium colonies did not invade the total surface of the Petri dishes, with the appearance of a red to brownish pigment in the agar. The spore observation showed an abundant production of oval microconidia with one to two septa. Some observed macroconidia presented three to four septa. It was also observed that when cultivated on FDM-agar, both morphotypes did not produce red pigments as on PDA, but their differences in mycelial aspects and colonization abilities were obvious (Figure 2).



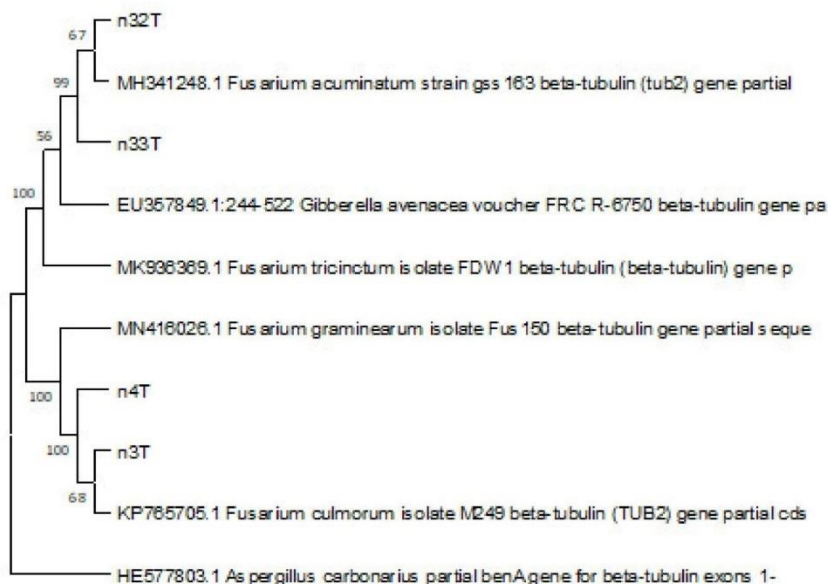


**Figure 2.** Growth kinetics and mycelial colony aspects of four isolated *Fusarium* strains ((A) = 3T, (B) = 4T, (C) = 32T, and (D) = 33T) on PDA and FDM-agar media. Values are means of 3 replicates. Error bars are  $\pm$  standard deviation.

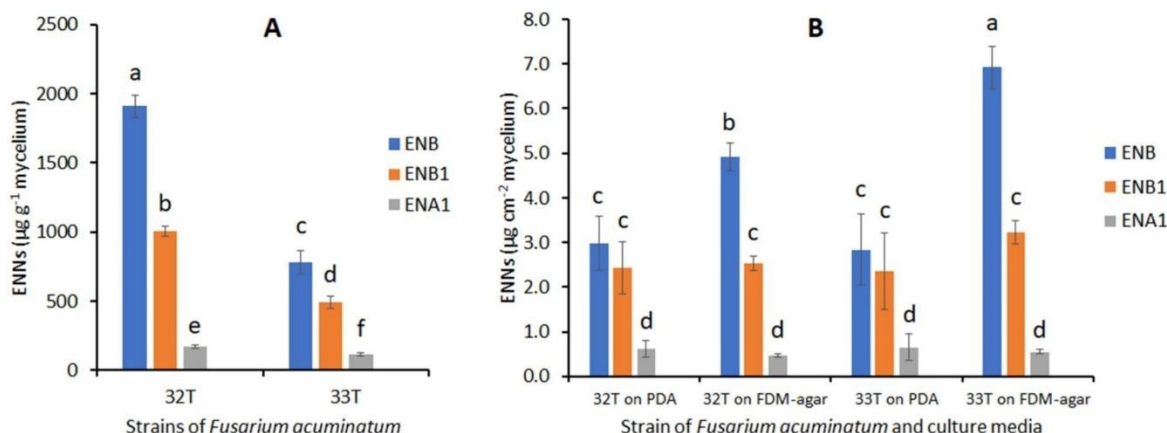
The mycelial growth rates on both culture media helped to discriminate between the two sets of strains. It can be observed that 3T and 4T covered the plates after 5 days of incubation at 25 °C, both on FDM-agar and PDA (Figure 2A,B). The two other isolates, 32T and 33T, showed slower growth. Furthermore, almost a 30% higher growth was observed on FDM-agar than on PDA after 11 days, the colonies reached 19.7 cm<sup>2</sup> on FDM-agar and 13.5 cm<sup>2</sup> on PDA (Figure 2C,D).

Based on cultural and morphological characteristics of the colonies and conidia, and the growth rates, the group of isolates composed by 3T and 4T were identified morphologically as *F. graminearum* or *F. culmorum*. Molecular analyses based on ITS and  $\beta$ -*tub* gene sequences confirmed the identification of the isolates. They are members of the *F. sambucinum* species complex (152 hits each for the  $\beta$ -*tub* partial sequence) and were identified either as *F. culmorum* with the  $\beta$ -*tub* gene sequences, or as *F. graminearum* with ITS sequences that were identical (Table S1). Concerning the isolates 32T and 33T, using both their phenotypes and molecular analyses, they were identified as *F. acuminatum*, belonging to the *F. tricinctum* species complex with both ITS and  $\beta$ -*tub* gene sequences (Table S1). Their ITS sequences were identical, whereas their  $\beta$ -*tub* gene sequences varied.

The multiple sequence alignment and the data in a phylogenetic tree for  $\beta$ -*tub* gene partial sequences of the four studied strains and referenced sequences (Figure 3) showed two distinct clusters with high support of the bootstrap test. It confirmed that 3T and 4T clustered with *F. culmorum* and to a lesser extent with *F. graminearum*. Combining data, the isolates 3T and 4T were determined as *F. culmorum*. Figure 4 also confirmed the clustering of 32T and 33T with members of the *F. tricinctum* species complex and their identity as *F. acuminatum*. The GenBank accession numbers of the sequences used are *F. culmorum* 3T—ON128289, *F. culmorum* 4T—ON128290, *F. acuminatum* 32T—ON128291, *F. acuminatum* 33T—ON128292. To the best of our knowledge, *F. acuminatum* has rarely been reported on cereals in Tunisia.



**Figure 3.** Dendrogram of similarity and difference of  $\beta$ -*tub* gene fragment sequences of the studied *Fusarium* species (species name and sample number are given) constructed using the UPGMA method. Stability was determined by bootstrap analysis (100 alternative dendrograms), the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (100 replicates) are shown next to the branches.



**Figure 4.** Accumulation of enniatins by *F. acuminatum* 32T and 33T in different culture media measured after 11 days of culture at 25 °C. (A) = culture in FDM liquid medium, (B) = culture on PDA and FDM-agar medium. Values are means of triplicates. Error bars are  $\pm$  standard deviation. Means with the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Production of Enniatins by the Isolates of *F. acuminatum*

The ENNs’ analysis was performed on the liquid FDM, FDM-agar, and PDA at the end of the incubations for 11 days at 25 °C. Both *F. acuminatum* 32T and 33T were able to produce ENB, ENB1, and ENA1 (Figure 4). No ENA was produced. ENB was the major ENN produced in liquid FDM (1910 and 782.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  of biomass for 32T and 33T, respectively) followed by ENB1 (1007 and 491.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  of biomass for 32T and 33T, respectively) and lower ENA1 levels were recorded (172.5 and 116  $\mu\text{g g}^{-1}$  of biomass for 32T and 33T, respectively). The ENB levels of 61% and 56% of total ENNs were recorded for 32T and 33T, respectively. While, ENA1 recorded 6% and 9% of total ENNs for *F. acuminatum* 32T and 33T respectively. The total production of ENNs in cultures of 32T, 3089  $\mu\text{g g}^{-1}$  mycelial

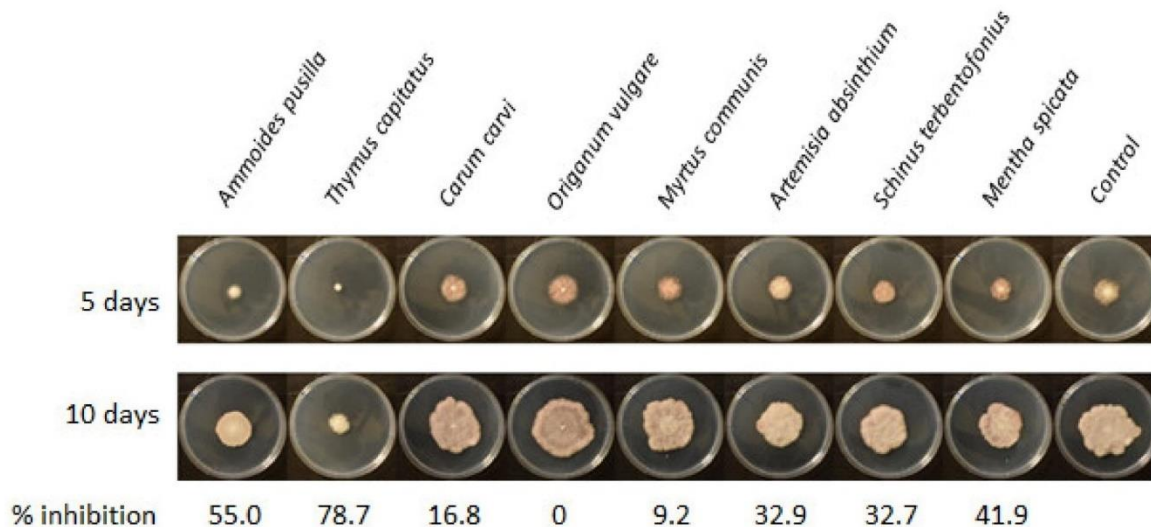


biomass, was 2.2-fold that in cultures of 33T,  $1390 \mu\text{g g}^{-1}$ . For each ENN, the concentrations in *F. acuminatum* 32T cultures in liquid FDM were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in 33T cultures.

In FDM-agar medium and PDA, ENA was always produced at the lowest concentrations, but the differences between ENB and ENB1 were not significant in PDA. In FDM-agar the ENB levels counted for 62% and 65% of total ENNs for 32T and 33T, respectively. *Fusarium acuminatum* 33T produced a significantly higher amount of total ENNs in the FDM-agar than in the PDA medium ( $10.7 \mu\text{g cm}^{-2}$  and  $6.0 \mu\text{g cm}^{-2}$  respectively). Due to its higher production of ENB1, the total ENNs' production of *F. acuminatum* 33T in FDM-agar ( $10.7 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) was significantly higher than the total ENNs' production of 32T in the same medium ( $7.9 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Consequently, *F. acuminatum* 33T was chosen for assessing the effect of EOs on the production of ENNs.

### 3.4. Susceptibility of *F. acuminatum* to Essential Oils

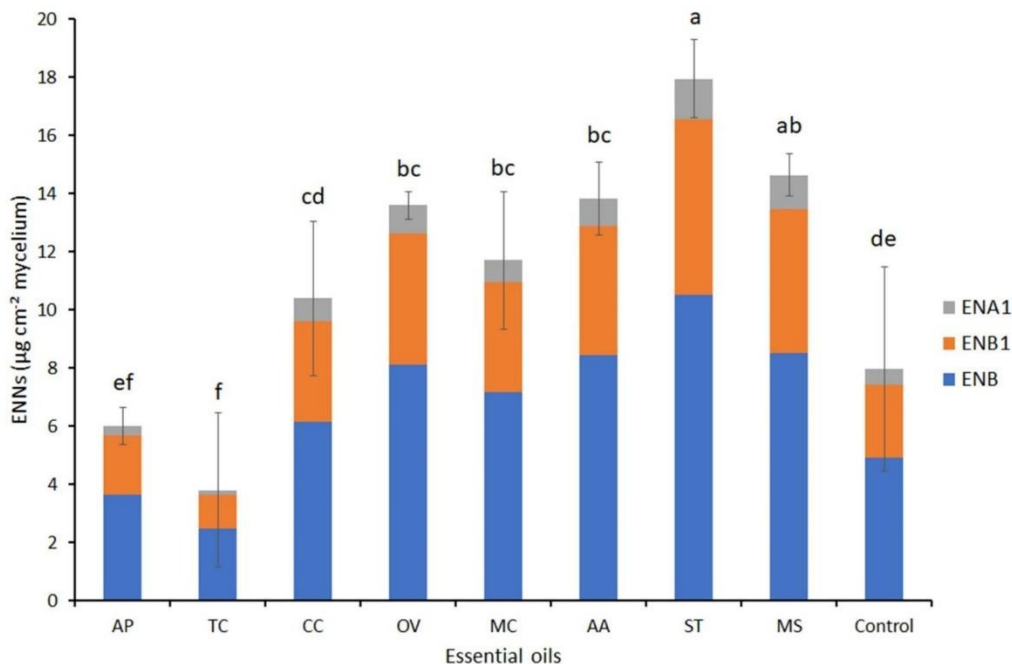
The susceptibility of the isolate *F. acuminatum* 33T to different EOs was assessed in the FDM-agar medium. It was observed above that the strain produced a dense mycelial colony with a relatively low growth rate. This mycelial growth was susceptible to the antifungal activity of EOs, but at different levels, depending on the EO (Figure 5). It was recorded that two out of eight EOs diluted at  $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$  in FDM-agar induced more than 50% inhibition of mycelial growth at 10 days, those being *Ammoides pusilla* EO (AP) and *Thymus capitatus* EO (TC) with 55% and 79% inhibition, respectively. The other EOs tested in this experiment showed no or lower effects ( $<10\%$  inhibition) (Figure 5). Using AP EO concentrations from 0.05 to  $0.15 \mu\text{L mL}^{-1}$  in FDM-agar medium, the inhibition of mycelial growth of *F. acuminatum* 33T was 18.9% and 94.8% at 0.05 to  $0.15 \mu\text{L mL}^{-1}$ , respectively, and the IC<sub>50</sub> was evaluated at  $0.06 \mu\text{L mL}^{-1}$ . The effect of TC EO on 33T was studied previously and the IC<sub>50</sub> was evaluated to be  $0.01 \mu\text{L mL}^{-1}$  [14].



**Figure 5.** Susceptibility of *F. acuminatum* 33T to the antifungal activity of a set of essential oils from eight Tunisian plants diluted at  $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$  in FDM-agar, incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 10 days.

As in Figure 4B, the isolate 33T did not produce ENA in the FDM-agar medium (control) and 62% total ENNs were ENB; less than 10% were ENA1 (Figure 6). The ratios between the ENNs were not significantly affected by the EO treatments but the produced levels varied. Significant induction of the production of ENNs was observed with EOs having no or low effects on mycelial growth rates (inhibition  $< 40\%$ ), except *C. carvi* EO, which did not differ from the control (Figure 6), while a significant decrease in ENNs' accumulation was observed when *F. acuminatum* 33T was exposed to TC EO treatments

with a reduction level reaching 52%. With AP EO, the reduction level was 26%, but the difference with the control was not significant (Figure 6).



**Figure 6.** Effect of essential oils (EO) extracted from eight Tunisian plants, diluted at  $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$  FDM-agar, on the production of enniatins by *F. acuminatum* 33T. Values are means of triplicates. Error bars are  $\pm$  standard deviation. Means with the same lowercase letters are not significantly different ( $p < 0.05$ ). ENB1 = Enniatin B1, ENB = Enniatin B, ENA1 = Enniatin A1, ENA = Enniatin A. AP = *Anmoides pusilla*, TC = *Thymus capitatus*, CC = *Carum carvi*, OV = *Origanum vulgare*, MC = *Myrtus communis*, AA = *Artemisia absintum*, ST = *Schinus terbenetofonius*, MS = *Mentha spicata*.

#### 4. Discussion

The dry climatic conditions around the anthesis period of the years 2017 and 2018 in Northern Tunisia (Béjà) were not conducive to the development of FHB, and no symptoms were recorded on the experimental parcels used for characterizing the 13 wheat cultivars sampled in this study. In our attempt to isolate *Fusarium* sp. from these asymptomatic harvested grains, only one sample was positive, and isolates of *F. culmorum* and *F. acuminatum* were obtained. This sample was also the only one containing DON contamination. The presence of TCTB in asymptomatic grains is currently observed. In a Spatio-temporal model of the multifaceted virulence strategy deployed by the advancing *F. culmorum*, it was proposed that asymptomatic infection occurs with high induction of the TRI genes involved in DON biosynthesis and accumulation [21]. The obtained strain of *F. culmorum* was probably responsible for the DON accumulation in the grains studied in the present work.

The colonization of spikes by at least two FHB pathogens producing the same or different mycotoxins is a common observation. Audenaert et al. [22] reported a clear association between *F. poae* producing NIV and *F. avenaceum* producing ENNs in symptomatic ears collected in Flanders in 2007. However, the co-occurrence of *F. acuminatum* with *F. culmorum* in wheat grains is not a common observation since *F. acuminatum* is infrequently found in wheat grains. *Fusarium* species have been divided into 23 informal multispecies lineages, termed species complexes [23]. *Fusarium acuminatum* is a member of the *F. tricinctum* species complex along with *F. avenaceum* and *Fusarium toluosum* as well as other species. The members of the *F. tricinctum* species complex have a wide geographic distribution and can occur on extremely diverse plants, often without causing severe disease [5]. They are



classified as FHB contributors but also as causing agents of *Fusarium* foot rot. *Fusarium acuminatum* is known to determine significant reductions in the germination ratio and vegetative vigor of durum wheat seedlings [24] and as one of the causing agents of dryland root rot of winter wheat in Colorado [25]. It exhibited weak aggressiveness on wheat seedlings and had a mean crown rot activity in China where significant correlations of its occurrence in diseased wheat stems with global climatic variables were observed [26]. *Fusarium acuminatum* isolates were weakly pathogenic in an FHB pathogenicity assessment on different durum wheat varieties in Tunisia [6].

The obtained isolates were identified by both morphological and molecular tools (Figures 1–3). Overall, the  $\beta$ -*tub* gene site was more effective in distinguishing and identifying the species under study than the ITS. The morphologic identification of two isolates of *F. acuminatum* conducted in this work was in line with the findings of Logrieco et al. [27] who identified a slow-growing type of *F. acuminatum* with carmine-red pigmentation and the production of heterogeneous macroconidia (mostly three to four septa). Lesli and Summerell [17] also described *F. acuminatum* as a relatively slow-growing species and mentioned the formation of red pigments, sometimes brown, in the agar and that the presence of macroconidia with three and four septa was not uncommon [18]. The pigment formation was confirmed by Burgess and Forbes [28]. The abundant production of microconidia was also described in the work of Rabie et al. [29].

*Fusarium acuminatum* has been recovered from cereals in Canada, North Carolina, and Mediterranean countries, but at a lower frequency compared to *F. avenaceum* and *F. tricinctum* [30–32]. In Italy, *F. acuminatum* was reported to be among the most harmful *Fusarium* species for durum wheat production causing *Fusarium* foot rot. It was detected within 50% of the analyzed soils in Sicily and seemed not to be affected by the suppressive effects of biofumigation with brassicaceous green manures [33]. Studying *Fusarium* species colonizing the lower stems (crowns) of bread and durum wheat from different regions of Turkey, Gebremariam et al. [34] isolated *F. acuminatum* with a frequency of 14%, mostly related to crown rot. The members of the *F. tricinctum* species complex are also contributors to FHB. *Fusarium acuminatum* has been isolated from Italian durum wheat grains from three cultivation areas [31], and from symptomatic wheat and barley grains [32]. In this latter study, the authors identified *F. acuminatum* isolates from Italy (growing season 2017–2018), using molecular tools. In a previous study, when collecting wheat grains on FHB symptomatic spikes at the filling stage from 11 fields in Northern Tunisia during the 2004 and 2007 crop seasons, *F. acuminatum* was found in four different fields with always low percentages compared to the most common *Fusarium* species, these being *F. culmorum*, *F. avenaceum*, and *F. equiseti* [6]. *Fusarium acuminatum* was not detected in other studies dealing with Tunisian wheat grains [6–8]. It was rarely found in other Tunisian grains such as sorghum in a study where 1 out of 53 *Fusarium* sp. isolates identified was related to *F. acuminatum* [35]. Due to the scarcity of information about *F. acuminatum* in wheat grains in Tunisia, its potential as a harmful *Fusarium* species was highlighted by observations in the Mediterranean conditions in Sicily [33], and its capacity to produce emerging mycotoxins (Beauvericin, ENNs, Fusaproliferin, and Moniformin) [5], it was of concern to characterize the production of at least one of these mycotoxins by the isolates we obtained from a Tunisian durum wheat sample.

In our study, ENA and ENB1 co-occurred with DON in the wheat sample from which the strains of *F. acuminatum* were isolated. However, ENNs were detected in all the wheat cultivars in the two growing seasons (Table 1), and the highest ENNs levels were found in the sample of the Khlar variety contaminated with DON, these being 524 and 41 mg Kg<sup>-1</sup> for ENA and ENB1, respectively. When investigating the presence of ENNs, BEA, and FUS in cereals and derived products from Tunisia, Oueslati et al. [10] found also that all the analyzed wheat samples were contaminated with ENNs, at a maximum concentration of 532 mg Kg<sup>-1</sup>. Using the same extraction procedure and LC-DAD analysis on breakfast and infant cereals from Morocco, Mahnine et al. [36] found a maximum total ENNs value of 1264 mg Kg<sup>-1</sup>. Studies on ENNs' contamination in wheat grains and wheat products



published recently were most of the time performed using quantification by LC-MS/MS in multi-mycotoxin analysis and reported quite lower levels than in works using LC-DAD analysis. Investigating 470 bread wheat and 260 durum wheat samples from the French harvests of 2012, 2013, and 2014, and using a quantification by LC-MS/MS, Orlando et al. [37] found an occurrence of ENNs ranging from 53% (2014) to 91% (2012), and mean values ranged from 47 to 142  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  for bread wheat and from 55 to 596  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  for durum wheat. In a long-term field survey using HPLC-QqQ-MS/MS in The Netherlands, ENA1, ENB, and ENB1 were detected in 14.2%, 46.6%, and 26.2% of the analyzed samples, respectively [38]. In Algeria, 21 out of 30 (70%) wheat samples were contaminated with ENB1 at concentrations from 19 to 4569  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , and seven samples were contaminated with ENA at concentrations ranging from 8 to 88  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  [39]. ENA1 and ENB were also detected in many samples. In the present study on asymptomatic grains, no ENNs were detected using quantification by LC-MS/MS in samples showing concentrations of ENA ranging from 320 to 930  $\text{mg Kg}^{-1}$  when the LC-DAD method was used. This agrees with the absence of *Fusarium* sp. isolation. Metabolites extracted from grains may have interfered with the quantification of ENNs, and data have to be used with caution.

Despite the uncertainty of the accumulation of ENNs in the grains, the studied isolates identified as *F. acuminatum* proved to be able to produce three ENNs in vitro, ENA1, ENB, and ENB1 but not ENA (Figure 4). The difference in distribution between the four ENNs in naturally contaminated grains and in liquid or agar culture media may be due to differences in the regulation of the synthesis in various environments. In different works, *F. acuminatum* has been reported to be capable of producing ENA, A1, B, B1, B2, B3, B4, P1, and P2 [40]. Our results on ENNs' production agree with those of Senatore et al. [32] who studied five strains of *F. acuminatum* from a culture collection and four new ones isolated in 2017–2018 from symptomatic wheat and barley grains in Italy. When incubated in vitro on rice for 10–12 days in the dark at 25 °C, ENB and ENB1 were detected at similar concentrations, and ENA1 at lower concentrations (1/3 that of ENB or ENB1 for six strains), but no ENA was detected. The results we obtained with two Tunisian strains of *F. acuminatum*, 32T and 33T, agree with this distribution of ENNs, both in liquid and agar media. In a previous work where *F. acuminatum* 33T was cultivated on FDM-agar medium, its level of ENNs' production was 10-fold higher than for a strain of *F. avenaceum* cultivated under the same conditions [14]. Comparing the single *F. acuminatum* strain with 30 *F. avenaceum* they isolated in a survey of barley and wheat fields in Paraná state, Brazil, Peirera et al. [41] found *F. acuminatum* to be the strongest producer of ENNs. Despite its low occurrence, *F. acuminatum* has to be considered as a significant source of mycotoxin contamination of crops, due to its high potential for ENNs' production.

The antifungal activity of the same eight EOs from Tunisian plants used (Figure 5) here was previously tested against a strain of *F. avenaceum*, which was significantly more affected by AP and TC EOs than by the other EOs [15], as *F. acuminatum* 33T was in the present study (Figure 5). The mycelial growth inhibiting effect of TC EO was higher than that of AP EO for both species. The same level of inhibition of ENNs' accumulation in the FDM-agar medium by *F. acuminatum* 33T was observed here for both EOs, whereas AP EO was more effective than TC EO for *F. avenaceum* [15]. The effectiveness of AP and TC EOs on two members of the *F. tricinctum* complex is a strength for their putative use for controlling these ENN producers and limiting the accumulation of the mycotoxins in plant products. The EOs represent promising biosourced products for the development of natural and eco-friendly alternatives to synthetic fungicides that are currently used. However, practically, the application of crude EOs in the field or at grain storage faces several limits. The production of EOs is limited by the extraction yield from aromatic plants and scaling-up would involve the production of large amount of plant material. New extraction methods with higher yields are now available. Subcritical water extraction (SWE) avoids the loss and degradation of volatile and thermolabile compounds, is low cost, and has favorable environmental impacts [42]. Another limit is that essential oils are very volatile substances and are sensitive to the exposure to oxygen in the air and to UV light [43]. The development

of a system that protects the EOs from the oxidation and increases the evaporation time is necessary to potentialize them as biofungicides. Encapsulation of the essential oils in different matrixes has been studied to reach this aim. This method can improve their antifungal activity and increase the release period [44,45]. Thus, nanoencapsulation enables the use of lower doses of EOs to obtain the same results as the EOs on a free state. The latter point is primordial for the development of different formulations to potentialize the EOs as the scale-up of their production in the aim of field application is a complicated task. Finally, the determination of the contribution of different compounds constituting an EO in its biological activity provides a better understanding of the different interactions among the compounds and their activity [15,44]. Hence, formulations focusing on the mixture of the main active compounds in their synthetic form is a promising area of investigation to provide biofungicide alternatives.

It is worth mentioning that, as with other cyclodepsipeptide analogs, ENNs are involved in plant–pathogen interactions, and they are detected in a range of foods or feeds originating from many countries. As they belong to the mycotoxin group, they may be dangerous for human health, but they also possess antimicrobial, insecticidal, antifungal, and antibiotic activities, which may help to develop new drugs, and due to their cytotoxicity, they may be applied in anticancer future therapies [40]. *Fusarium acuminatum* 32T and 33T are good candidates for producing ENNs in large quantities for medical applications.

## 5. Conclusions

*Fusarium acuminatum*, a member of the *F. tricinctum* species complex was shown to be a co-contaminant, with *F. culmorum*, of asymptomatic wheat grains in Tunisia. This may contribute to the co-accumulation of ENNs and TCTB in cereal crops. The isolates we obtained were able to produce significant quantities of ENB and ENB1 in vitro. This *Fusarium* species should be carefully considered in future works on grain mycotoxin contamination in Tunisia and other Mediterranean countries and the development of strategies for its control is a challenge. In this study, two strains of *F. acuminatum* were susceptible to the antifungal activities of essential oils extracted from different Tunisian plants, but those limiting less than 50% of the mycelial growth under the condition of the experiment tended to stimulate the production of ENNs and are not recommended for the control of *F. acuminatum*. However, the essential oils extracted from *T. capitatus* significantly inhibited both the mycelial growth and the production of ENNs. It could be used for developing a biocontrol product against *F. acuminatum*.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof8050458/s1>, Table S1: Molecular identification of the *Fusarium* sp. isolates based on ITS and  $\beta$ -tubulin sequence analysis.

**Author Contributions:** Investigation, Y.C.; methodology, Y.C., L.P.-G. and S.O.; supervision, S.O., M.A. and J.-M.S.; writing—original draft, Y.C., S.O. and J.-M.S.; writing—review and editing, L.P.-G. and M.A.; funding acquisition, M.A. and J.-M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the PHC-Utique program, project CMCU 18G0913/Campus France 39198RK.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank Vessela Atanasova and Sylvain Chereau for their support in mycotoxin analyses.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

- Pitt, J.I.; Taniwaki, M.H.; Cole, M.B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control* **2013**, *32*, 205–215. [CrossRef]
- Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microb. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [CrossRef] [PubMed]
- Jestoi, M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Crit. Rev. Food Sci.* **2008**, *48*, 21–49. [CrossRef] [PubMed]
- Gautier, C.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. *Fusarium* mycotoxins enniatins: An updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 4788–4798. [CrossRef] [PubMed]
- Munkvold, G.P.; Proctor, R.H.; Moretti, A. Mycotoxin production in *Fusarium* according to contemporary species concepts. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2021**, *59*, 373–402. [CrossRef] [PubMed]
- Fakhfakh, M.M.; Yahyaoui, A.; Rezgui, S.; Elias, E.M.; Daaloul, A. Identification and pathogenicity assessment of *Fusarium* spp. sampled from durum wheat fields in Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 6529–6539. [CrossRef]
- Kammoun, L.G.; Gargouri, S.; Hajlaoui, M.R.; Marrakchi, M. Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *J. Phytopathol.* **2009**, *157*, 546–551. [CrossRef]
- Jedidi, I.; Soldevilla, C.; Lahouar, A.; Marín, P.; González-Jaén, M.T.; Said, S. Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25*, 868–874. [CrossRef]
- Oueslati, S.; Romero-González, R.; Lasram, S.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 2376–2381. [CrossRef]
- Oueslati, S.; Meca, G.; Mliki, A.; Ghorbel, A.; Mañes, J. Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control* **2011**, *22*, 1373–1377. [CrossRef]
- Leslie, J.F.; Moretti, A.; Mesterházy, Á.; Ameye, M.; Audenaert, K.; Singh, P.K.; Richard-Forget, F.; Chulze, S.N.; Ponte, E.M.D.; Chala, A.; et al. Key global actions for mycotoxin management in wheat and other small grains. *Toxins* **2021**, *13*, 725. [CrossRef] [PubMed]
- Kalagatur, N.K.; Nirmal Ghosh, O.S.; Sundararaj, N.; Mudili, V. Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 610. [CrossRef] [PubMed]
- Perczak, A.; Gwiazdowska, D.; Gwiazdowski, R.; Juś, K.; Marchwińska, K.; Waśkiewicz, A. The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. *Pathogens* **2020**, *9*, 23. [CrossRef] [PubMed]
- Chakroun, Y.; Atanasova, V.; Jallouli, S.; Oueslati, S.; Abderrabba, M.; Savoie, J.-M. Tunisian thyme essential oil for controlling enniatins producing *Fusarium* species. *J. Int. Sci. Publ. Agric. Food* **2021**, *9*, 221–230.
- Chakroun, Y.; Oueslati, S.; Atanasova, V.; Richard-Forget, F.; Abderrabba, M.; Savoie, J.-M. *Ammoides pusilla* essential oil: A potent inhibitor of the growth of *Fusarium avenaceum* and its enniatin production. *Molecules* **2021**, *26*, 6906. [CrossRef]
- Ducos, C.; Pinson-Gadais, L.; Chereau, S.; Richard-Forget, F.; Vásquez-Ocmín, P.; Cerapio, J.P.; Casavilca-Zambrano, S.; Ruiz, E.; Pineau, P.; Bertani, S.; et al. Natural occurrence of mycotoxin-producing fusaria in market-bought peruvian cereals: A food safety threat for Andean populations. *Toxins* **2021**, *13*, 172. [CrossRef]
- Leslie, J.F.; Summerell, B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*, 1st ed.; Blackwell Pub: Ames, IA, USA, 2006.
- Fanelli, F.; Ferracane, R.; Ritieni, A.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 390–399. [CrossRef]
- Pinson-Gadais, L.; Barreau, C.; Chaurand, M.; Gregoire, S.; Monmarson, M.; Richard-Forget, F. Distribution of toxigenic *Fusarium* spp. and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 53–62. [CrossRef]
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322.
- Brown, N.A.; Evans, J.; Mead, A.; Hammond-Kosack, K.E. A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection. *Mol. Plant Pathol.* **2017**, *18*, 1295–1312. [CrossRef]
- Audenaert, K.; Van Broeck, R.; Bekaert, B.; De Witte, F.; Heremans, B.; Messens, K.; Höfe, M.; Haesaert, G. Fusarium head blight (FHB) in Flanders: Population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *Eur. J. Plant Pathol.* **2009**, *125*, 445–458. [CrossRef]
- Geiser, D.M.; Al-Hatmi, A.M.S.; Aoki, T.; Arie, T.; Balmas, V.; Barnes, I.; Bergstrom, G.C.; Bhattacharyya, M.K.; Blomquist, C.L.; Bowden, R.L.; et al. Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. *Phytopathology* **2021**, *111*, 1064–1079. [CrossRef] [PubMed]
- Hill, J.P.; Blunt, D.L. Wheat seedling response to root infection by *Cochliobolus sativus* and *Fusarium acuminatum*. *Plant Dis.* **1994**, *78*, 1150–1152. [CrossRef]
- Mergoum, M.; Hill, J.P.; Quick, J.S. Evaluation of resistance of winter wheat to *Fusarium acuminatum* by inoculation of seedling roots with single, germinated macroconidia. *Plant Dis.* **1998**, *82*, 300–302. [CrossRef] [PubMed]



26. Xu, F.; Yang, G.; Wang, J.; Song, Y.; Liu, L.; Zhao, K.; Li, Y.; Han, Z. Spatial distribution of root and crown rot fungi associated with winter wheat in the north China plain and its relationship with climate variables. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1054. [[CrossRef](#)]
27. Logrieco, A.; Altomare, C.; Moretti, A.; Bottalico, A. Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycol. Res.* **1992**, *96*, 518–523. [[CrossRef](#)]
28. Burgess, L.W.; Forbes, G.A. Characterization and Distribution of *Fusarium acuminatum* subsp. *Armeniacum* subsp. nov. *Mycologia* **1993**, *85*, 119–124. [[CrossRef](#)]
29. Rabie, C.J.; Sydenham, E.W.; Thiel, P.G.; Lübben, A.; Marasas, W.F. T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52*, 594–596. [[CrossRef](#)]
30. Marín, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 218–237. [[CrossRef](#)]
31. Beccari, G.; Prodi, A.; Senatore, M.T.; Balmás, V.; Tini, F.; Onofri, A.; Pedini, L.; Sulyok, M.; Brocca, L.; Covarelli, L. Cultivation area affects the presence of fungal communities and secondary metabolites in Italian durum wheat grains. *Toxins* **2020**, *12*, 97. [[CrossRef](#)]
32. Senatore, M.T.; Ward, T.J.; Cappelletti, E.; Beccari, G.; McCormick, S.P.; Busman, M.; Laraba, I.; O'Donnell, K.; Prodi, A. Species diversity and mycotoxin production by members of the *Fusarium tricinctum* species complex associated with Fusarium head blight of wheat and barley in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *358*, 109298. [[CrossRef](#)]
33. Campanella, V.; Mandalà, C.; Angileri, V.; Miceli, C. Management of common root rot and Fusarium foot rot of wheat using *Brassica carinata* break crop green manure. *Crop Prot.* **2020**, *130*, 105073. [[CrossRef](#)]
34. Shikur Gebremariam, E.; Sharma-Poudyal, D.; Paulitz, T.C.; Erginbas-Orakci, G.; Karakaya, A.; Dababat, A.A. Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018**, *150*, 387–399. [[CrossRef](#)]
35. Lahouar, A.; Crespo-Sempere, A.; Marín, S.; Saïd, S.; Sanchis, V. Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *J. Stored Prod. Res.* **2015**, *63*, 57–62. [[CrossRef](#)]
36. Mahnine, N.; Meca, G.; Elabidi, A.; Fekhaou, M.; Saoiabi, A.; Font, G. Further data on the levels of emerging Fusarium mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in breakfast and infant cereals from Morocco. *Food Chem.* **2011**, *124*, 481–485. [[CrossRef](#)]
37. Orlando, B.; Grignon, G.; Vitry, C.; Kasheffard, K.; Valade, R. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Res.* **2019**, *35*, 369–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Van der Fels-Klerx, V.; Focker, M.; De Rijk, T.; Liu, C. Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: Results from eight years of field surveys. *Mycotoxin Res.* **2021**, *37*, 183–192. [[CrossRef](#)]
39. Mahdjoubi, C.K.; Arroyo-Manzanares, N.; Hamini-Kadar, N.; García-Campaña, A.M.; Mebrouk, K.; Gámiz-Gracia, L. Multi-mycotoxin occurrence and exposure assessment approach in foodstuffs from Algeria. *Toxins* **2020**, *12*, 194. [[CrossRef](#)]
40. Urbaniak, M.; Waśkiewicz, A.; Stępień, Ł. *Fusarium* cyclodepsipeptide mycotoxins: Chemistry, biosynthesis, and occurrence. *Toxins* **2020**, *12*, 765. [[CrossRef](#)]
41. Pereira, C.B.; Ward, T.J.; Del Ponte, E.M.; Mara Moreira, G.; Busman, M.; McCormick, S.P.; Feksa, H.R.; De Almeida, J.L.; Tessmann, D.J. Five-year survey uncovers extensive diversity and temporal fluctuations among fusarium head blight pathogens of wheat and barley in Brazil. *Plant Pathol.* **2021**, *70*, 426–435. [[CrossRef](#)]
42. Asbahani, A.E.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Addi, E.H.A.; Casabianca, H.; Mousadik, A.E.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F.N.R.; et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *483*, 220–243. [[CrossRef](#)]
43. Tisserand, R.; Young, R. Essential oil composition. In *Essential Oil Safety*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 5–22. [[CrossRef](#)]
44. Janatova, A.; Bernardos, A.; Smid, J.; Frankova, A.; Lhotka, M.; Kourimská, L.; Pulkrabek, J.; Kloucek, P. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *67*, 216–220. [[CrossRef](#)]
45. Valencia Junca, M.A.; Valencia, C.; Flórez López, E.; Delgado-Ospina, J.; Zapata, P.A.; Solano, M.; Grande Tovar, C.D. Chitosan Beads Incorporated with Essential Oil of *Thymus capitatus*: Stability Studies on Red Tilapia Fillets. *Biomolecules* **2019**, *9*, 458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Table S1:** Molecular identification of the *Fusarium* sp. isolates based on ITS and  $\beta$ -tubulin sequence analysis

Isolates	$\beta$ -tub sequence				ITS sequence			
	Lineage organism	Nb of hits	Lineage organism *	Nb of hits	Lineage organism	Nb of hits	Lineage organism	Nb of hits
3T	<i>F. sambucinum</i> species complex	152	<i>F. pseudo graminearum</i>	78	Sordariomycetes	101	<i>F. graminearum</i>	49
4T	<i>F. sambucinum</i> species complex	152	<i>F. pseudo graminearum</i>	78	Sordariomycetes	101	<i>F. graminearum</i>	56
32T	<i>F. tricinctum</i> species complex	66	<i>F. acuminatum</i>	55	<i>F. tricinctum</i> species complex	72	<i>F. acuminatum</i>	54
33T	<i>F. tricinctum</i> species complex	64	<i>F. acuminatum</i>	51	<i>Fusarium</i>	95	<i>F. acuminatum</i>	49
Best nr database similarity hit								
	Taxon	E value	ID %	GenBank Accession No.	Taxon	E value	ID %	GenBank Accession No.
3T	<i>F. culmorum</i>	4e-100	100	LT598662.1	<i>F. graminearum</i>	0	99.76	MT598163.1
4T	<i>F. culmorum</i>	5e-99	99.04	LT598662.1	<i>F. graminearum</i>	0	99.75	MT598163.1
32T	<i>F. acuminatum</i>	5e-68	96.88	MH341248.1	<i>F. acuminatum</i>	0	100	MT635295.1
33T	<i>F. acuminatum</i>	8e-92	98.48	MH341248.1	<i>F. acuminatum</i>	0	100	MT635295.1

\* Species with the highest number of hits

### III. Synthèse

Dans de ce chapitre, 4 souches de *Fusarium* ont été isolées à partir d'échantillons de grain de blé tunisien en suivant la méthode ULSTER et identifiées après séquençage de régions variables de deux gènes (voir les séquences dans le Tableau 4). Les souches font partie de deux groupes distincts. Les souches 3T et 4T appartiennent à l'espèce *F. culmorum*, quant aux souches 32T et 33T, elles appartiennent au complexe d'espèces *F. tricinctum* et à l'espèce *F. acuminatum*.

La caractérisation morphologique des souches 32T et 33T a été en accord avec les descriptions de l'espèce *F. acuminatum* dans la littérature (Rabie et al., 1986; Logrieco et al., 1992; Burgess and Forbes, 1993; Leslie and Summerell, 2006). En effet, ces souches ont présenté une croissance fongique relativement lente par rapport à d'autres espèces de *Fusarium*. Leur mycélium est compact et de couleur rouge foncé avec libération de pigment dans le milieu gélosé.

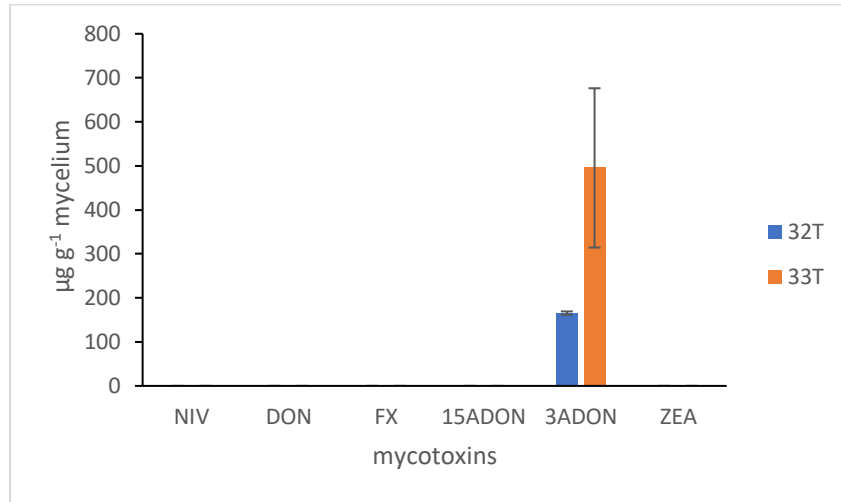
Il est à noter que la détection de la présence de *F. acuminatum* dans les céréales tunisiennes n'a pas été signalée précédemment.

La caractérisation du profil mycotoxique de ces deux souches a montré deux profils très similaires. Les deux souches sont de fortes productrices d'enniatives B et B1 (allant jusqu'à 1900  $\mu\text{g g}^{-1}$  de biomasse fongique pour l'enniatine B, et en moindre importance, d'enniatine A1 (172  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), conformément à d'autres travaux conduits avec *F. acuminatum*. 32T et 33T se distinguent simplement par leurs niveaux de production d'enniatives.

Un dosage des TCTB produites par ces deux souches en milieu liquide a été réalisé (non montré ci-dessus). Il a révélé une production de 3ADON, mais à de faibles niveaux dans les deux cas (Figure 7). Des études ont précédemment décrit une production possible de DON par *F. acuminatum* (Marín et al., 2012), mais ces résultats ont été contestés par Munkvold et al., 2021 qui soulignent que l'absence de gènes du cluster de synthèse des trichothécènes (gènes TRI) dans le génome de référence de *F. acuminatum* rend cette conclusion impossible. La recherche de gènes TRI par PCR avec des amorces spécifiques et séquençages des éventuels amplicons dans les souches 32T et 33T pourrait permettre de trancher la question de leur réelle capacité à produire du 3ADON.

..

Les résultats sur la sensibilité de la souche de *F. acuminatum* 33T aux huiles essentielles seront discutés ultérieurement de façon à être intégrés avec ceux des autres études présentées dans le Chapitre II



**Figure 7** : Résultats de l'analyse de la production des TCTB par les deux souches 32T et 33T

**Tableau 4** : Résultats du séquençage génétique des souches 3T, 4T, 32T et 33T avec les différentes amorces.

Souches	Couples d'amorces	Séquences obtenues
3T	B-tub	GGGTTGGAATCCTCTGGGCGAGCACGGTCTCGACAGCAATGGTGTTTACAACGGCACCTCCG AGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTTTACTTCAACGAGGTTTGTTCAGTCACTCCTGCTACG AAAAACACAAGCTCACGCGTTTAGGCCTCTGGTAACAAGTACGTTCCTCCGTCCTCGT CGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGACAGCTTTCCGAC CCGACAACCTTCGTTTTCCGGTCAATCTA
4T	B-tub	ATATTTATTCTTCTTGGCGAGCCGGTCTCGACAGCAATGGTGTTTACAACGGCACCTCCGAG CTCCAGCTCGAGCGCATGAGCGTCTCCTTCAACGAGGTTTGTTCAGTCACTCCTGCTACGAA AAACACAAGCTCACGCGTTTAGGCCTCTGGTAACAAGTACGTTCCTCCGTCCTCGTGC ATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGACAGCTTTCCGACCC GACAACCTTCGTTTTCAGGTCATCTA
32T	B-tub	GTCCTCCATGACTGGCCCTTGACAGCAATGGTGTCTTACAACGGCCACCTCGGAGCTTTAGC TCGAGCGCATGAGCGTATACTTTCAACGAGGTATGTTGCAGGCAGTTAATTCCAAGAAAAC GTAGGCTGACGCAATAGGCTTCCGGCAACAAGTACGTCCCTCGTGCCGTCTCGTGCATTT



		GGAGCCCGGTACCATGGATGCCGTCCGCGCTGGTCCTTTTCGGTCAGCTTTTCCGACCCGACA ACTTCGTAACGGTCAATCAA
33T	B-tub	TTTGACAGCATGGTGTCTACAACGGCACCTCGGAGCTTCAGTCCGAGCGATGAGCGTATAC TTCAACGAGGTATGTTGCAGGCAGTTAATTCCAAGAAAAGTGTAGGCTGACGCAAATAGGC TTCCGGCAACAAGTACGTCCCTCGTGCCGTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGGATG CCGTCCGCGCTGGTCCTTTCGGTCAGCTTTTCCGACCCGACAACCTCGTTTTCGGTCAATCTA A
3T	ITS	AAATAACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCG CAGGAACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT CTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCT GCAGTCTGCTGCACTCCCAAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAAT TTACACATCGTTACTGGCAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCATCTTCTGAATGTTGA CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
4T	ITS	GGGGCCTTCGGGGTTCACTCCAACCCCTGTGACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCC CGGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCCGAGGAACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACTT CTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGA TGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTC ACCCCAAGCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCTGCTGCACTCCCAAAATACATTGGC GGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGCAATCGTCGCGGCCA CGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
32T	ITS	CCCCCGGTTTCCGGGTTTCACTCCTACCCCTGTGACATACCTTAATGTTGCCTGCGGCGGA TCAGCCCGCGCCCGTAAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTAT TGTAACCTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCT GGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTGAGCG TCATTTCAACCCTCAAGCCCGGGTTTGGTGTGGGATCGGCTCTGCCCTTCTGGGCGGTG CCGCCCCGAAAATACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCG CAACTGGAACGCGCGCGTTTTATGTTTGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGAT CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGAAA
33T	ITS	GGCCTGGGTGGAACATACCTTAATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCAGCCCCGTAAAAACGG GACGGCCCGCCAGAGGACCCAAACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTCTGAGTAAAACAAAC AAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCA AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCGCTGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCCCCCG GGTTTGGTGTGGGGATCGGCTCTGCCCTTCTGGGCGGTGCCGCCCGGAAATACATTGGCG GTCTCGCTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGGGCCA TGCCGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA



# *Chapitre 11*



## **Chapitre II : Evaluation de l'activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles originaires de la Tunisie**

### **I. Introduction**

Dans cette partie du manuscrit, nous détaillons l'étude qui a été menée pour la détermination de l'activité antifongique et antimycotoxines d'huiles essentielles extraites à partir de différentes plantes aromatiques tunisiennes sur des souches de *Fusarium* productrices d'enniatives (*F. avenaceum*, *F.av* I496 et *F. acuminatum* *F.ac* 33T).



Un screening d'un panel de 8 huiles essentielles a été tout d'abord réalisé sur les deux souches. En fonction des résultats obtenus sur la croissance fongique et l'impact sur la production des enniatives par les différentes souches, les deux huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Thymus capitatus* ont été sélectionnées pour la suite du projet.

Les résultats de cette partie sont présentés sous format d'articles scientifiques et s'articulent comme suit :

- Le premier article détaille les résultats du screening des huiles essentielles ainsi que les résultats du travail ciblé sur l'huile essentielle d'*Ammoides pusilla*
- Le deuxième article présente les résultats obtenus suite au travail effectué avec l'huile essentielle de *Thymus capitatus*

Article

# *Ammoides pusilla* Essential Oil: A Potent Inhibitor of the Growth of *Fusarium avenaceum* and Its Enniatin Production

Yasmine Chakroun <sup>1,2</sup> , Souheib Oueslati <sup>2</sup>, Vessela Atanasova <sup>1</sup> , Florence Richard-Forget <sup>1</sup>, Manef Abderrabba <sup>2</sup> and Jean-Michel Savoie <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> UR1264 Mycology and Food Safety Research Unit (MycSA), INRAE, F-33882 Villenave d'Ornon, France; yasminechakroun@gmail.com (Y.C.); vessela.atanasova@inrae.fr (V.A.); florence.forget@inrae.fr (F.R.-F.)  
<sup>2</sup> Laboratory Molecules, Material and Applications (LMMA), Preparatory Institute of Scientific and Technical Studies of Tunis (IPEST), University of Carthage, Sidi Bou Said road, La Marsa B.P. 51 2070, Tunisia; souheibo@yahoo.fr (S.O.); abderrabbamanef@gmail.com (M.A.)  
 \* Correspondence: jean-michel.savoie@inrae.fr; Tel.: +33-557-122-496

**Abstract:** Enniatins are mycotoxins produced by *Fusarium* species contaminating cereals and various agricultural commodities. The co-occurrence of these mycotoxins in large quantities with other mycotoxins such as trichothecenes and the possible synergies in toxicity could lead to serious food safety problems. Using the agar dilution method, *Ammoides pusilla* was selected among eight Tunisian plants for the antifungal potential of its essential oil (EO) on *Fusarium avenaceum* mycelial growth and its production of enniatins. Two EO batches were produced and analyzed by GC/MS-MS. Their activities were measured using both contact assays and fumigant tests (estimated IC<sub>50</sub> were 0.1 μL·mL<sup>-1</sup> and 7.6 μL·L<sup>-1</sup>, respectively). The *A. pusilla* EOs and their volatiles inhibited the germination of spores and the mycelial growth, showing a fungistatic but not fungicidal activity. The accumulation of enniatins was also significantly reduced (estimated IC<sub>50</sub> were 0.05 μL·mL<sup>-1</sup> for the contact assays and 4.2 μL·L<sup>-1</sup> for the fumigation assays). The most active batch of EO was richer in thymol, the main volatile compound found. Thymol used as fumigant showed a potent fungistatic activity but not a significant antimycotoxigenic activity. Overall, our data demonstrated the bioactivity of *A. pusilla* EO and its high potential to control *F. avenaceum* and its enniatins production in agricultural commodities.

**Keywords:** *Ammoides pusilla*; *Fusarium avenaceum*; mycotoxins; fungistatic activity; volatiles; GC/MS-MS; thymol



**Citation:** Chakroun, Y.; Oueslati, S.; Atanasova, V.; Richard-Forget, F.; Abderrabba, M.; Savoie, J.-M.

*Ammoides pusilla* Essential Oil: A Potent Inhibitor of the Growth of *Fusarium avenaceum* and Its Enniatin Production. *Molecules* **2021**, *26*, 6906. <https://doi.org/10.3390/molecules26226906>

Academic Editor: Carmen Formisano

Received: 18 October 2021

Accepted: 11 November 2021

Published: 16 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Global food safety and sufficiency are facing increasing threats due to climate changes and the consequences on crop production yield, distribution and exposure to pests and diseases [1], to demography growth (United Nations, s.d.) and biodiversity decreases [2]. One of the major hazards that have been threatening food safety during the last decades is mycotoxins contamination [3]. Indeed, mycotoxins are poisonous secondary metabolites with a low molecular weight (0.3–0.7 kDa) and high bioaccumulation ability [4] produced by several filamentous fungal genera such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* and *Fusarium* [5,6]. The contamination of crops by these fungi causes an important economic loss and the contamination by their mycotoxins is an important hazard on the animal and human health [7]. Zearalenone (ZEA), type B trichothecenes including deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and their acetylated derivatives, ochratoxin A and aflatoxins have been proven to have immunosuppressive, carcinogenic, teratogenic, mutagenic impacts on both animals and humans [5–7].

Strict measures were implemented to face this hazard worldwide. WHO and FAO have regulated the allowed amount of several of these toxins in multiple food matrixes [8]. Locally, multiple countries have adopted several laws and norms that regulate these



occurrences such as EU legislation (EC No 1881/2006) in Europe [9,10]. Furthermore, an increase in the occurrence of “emergent mycotoxins” was recorded worldwide in the last decade. The term includes mycotoxins that are neither routinely monitored nor subjected to regulation [11]. Enniatins (ENNs) are a main group of emergent mycotoxins produced by several *Fusarium* species such as *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum* that have been detected in various foodstuffs in large amounts [6,11]. Up to now, no evidence of an acute mycotoxicosis has been reported but the increasing frequency of the occurrence of ENNs detected, their bioaccumulation ability and their possible toxicological synergy with other mycotoxins could lead to serious food security concerns. [6,11].

Different strategies are set in place to reduce the *Fusarium* spp. and mycotoxins contamination in the crops worldwide going from the application of different chemical synthesized fungicides to soil tilling and to crop rotation [12]. However, several studies have demonstrated the limits of these strategies because of the deterioration of soil quality and the resistance of the pathogens to the traditional treatments [13]. Face to the global ecological context, the consumer’s awareness has increased, and its alimentation habits had become more natural and bio-oriented [13]. Moreover, the negative effects of chemically-synthesized fungicides on the environment had been proven. Thus, the development of more ecofriendly alternatives has become a major priority. One of the important lines of research is the investigation of the fungicidal potential of essential oils. The use of plant essential oils (EOs) for the elaboration of ecofriendly plant preservatives has various advantages: relatively high volatility, ephemeral biodegradable nature, and consumer tolerance [14]. They are extracted from more than 17,000 aromatic plants belonging to angiosperm families: Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae and Asteraceae [14], and they have multiple antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitical, insecticidal, medicinal and cosmetic applications [15]. At least 16 different publications [16–31] presented data on EOs antifungal activities from 35 plants against *F. avenaceum* (Table 1). All the authors used either agar diffusion methods (paper discs or wells), or an agar dilution method. Only one recent paper reported a method for testing the effects of the volatile components [16]. In the application of EOs for controlling the phytopathogens, the bioactivity of volatiles should widely contribute to the fungicidal or fungistatic effect and it is worthy to measure it. However, none of the published work reported the consequences of EO treatments on the production of ENNs by *F. avenaceum*.

Thymol is a component of many essential oils, and it has been shown to be a promising chemosensitizing agent for various pathogenic and opportunistic fungi. It synergistically enhanced the ability of fungicidal formulations intended to inhibit the fungal growth [32] or of citronella and garlic EOs containing monoterpenes and phenols to inhibit *Penicillium corylophilum* [33].

The aim of the present work was to select new EOs having both antifungal and antimycotoxigenic properties. The effect of eight essential oils extracted from Tunisian aromatic plants was evaluated on *F. avenaceum* and its enniatins production. *Ammoides pusilla* EO of thymol chemotype was selected and studied for its composition and activity of its volatiles. Thymol was efficient to limit the growth of *F. avenaceum* but did not inhibit the production of ENNs. *Ammoides pusilla* EO proved to have the potential to control *F. avenaceum* and its production of ENNs.

**Table 1.** Published article with data on the effect of essential oils (EOs) on the mycelial growth of *F. avenaceum*.

Plants	Origin	Extraction Yield	Major Components **	Methods ***	Inhibition of Growth	Reference
<i>Abies sibirica</i>	Com.*/Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (27 °C, 5 d)	11 mm diameter	[17]
<i>Asarum heterotropoides</i>	Roots and rhizomes/China	1.6%	Methyleugenol (38.7–43.8%), Safrol (12.9–15.3%)	BD, (26 °C, 72 h)	MIC <sub>50</sub> = 0.61 mg·mL <sup>-1</sup>	[18]
<i>Carum carvi</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (26 °C, 72 h)	89 mm diameter	[17]
Cinnanom	Com./Pakistan	-	Eugenol (75.5%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 0.5 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]

Table 1. Cont.

Plants	Origin	Extraction Yield	Major Components **	Methods ***	Inhibition of Growth	Reference
Cinnanom	Com./Pakistan	-	Eugenol (75.5%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium, (20 °C, 6 d)	84% Inhibition	[16]
Citronella	Com./Pakistan	-	Geraniol (53.6%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 0.5 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]
Citronella	Com./Pakistan	-	Geraniol (53.6%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium, (20 °C, 6 d)	84% Inhibition	[16]
<i>Citrus paradisi</i> Grapefruit	Com./Germany	-	Linalyl acetate (1.87%), $\alpha$ -Terpineol (1.83%), Nootkatone (1.37%)	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	12% Inhibition	[19]
Clove	Com./Pakistan	-	Eugenol (80.9%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 0.5 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]
Clove	Com./Pakistan	-	Eugenol (80.9%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium, (20 °C, 6 d)	86% Inhibition	[16]
<i>Cymbopogon citratus</i> (Lemongrass)	Com./Germany	-	$\alpha$ and $\beta$ -Citral (68.9%)	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	MIC = 0.12 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[19]
<i>Eucalyptus globus</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (27 °C, 5 d)	28 mm diameter	[17]
<i>Hyssopus officinalis</i>	Fresh flowering tops/Italy	2.3 mL·kg <sup>-1</sup>	Pinocamphone (34%), $\beta$ -Pinene (10.5%), $\alpha$ -phellandrene (7.4%)	AD, (22 °C, 7 d)	MIC = 1.5 mg·mL <sup>-1</sup>	[20]
<i>Hyssopus officinalis</i>	Fresh flowering tops/Italy	3.1 mL·kg <sup>-1</sup>	Isopinocamphone (29%), Pinocamphone (18.5%), $\beta$ -Pinene (10.8%)	AD, (22 °C, 7 d)	MIC = 1.2 mg·mL <sup>-1</sup>	[20]
<i>Lavandula hybrida</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (27 °C, 5 d)	12 mm diameter	[17]
Lemon	<i>Citrus</i> rind/Nigeria	-	$\alpha$ -Terpineol (31.2%), L-Limonene (14.4%), $\beta$ -Pinene (12.4%)	AWD, (25 °C, 48 h)	MIC = 100 mg·mL <sup>-1</sup>	[21]
Lime	<i>Citrus</i> rind/Nigeria	-	d-Limonene (27.8%), $\beta$ -Pinene (25.2%),	AWD, (25 °C, 48 h)	MIC = 100 mg·mL <sup>-1</sup>	[21]
Lemongrass	Com./Pakistan	-	Geraniol (40.8%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 0.5 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]
Lemongrass	Com./Pakistan	-	Geraniol (40.8%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium, (20 °C, 6 d)	84% Inhibition	[16]
<i>Lupulia javanica</i>	Com./USA	-	$\alpha$ and $\beta$ -Citral (36.0%), $\alpha$ -Terpineol (18.3%)	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	MIC = 0.12 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[19]
<i>Litsea cubeba</i>	Com./Germany	-	$\alpha$ and $\beta$ -Citral (68.9%)	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	MIC = 0.12 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[19]
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Com./Germany	-	$\alpha$ -Terpineol (6.88%), Cadinene (3.86%), $\beta$ -Gurjunene (1.23%)	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	MIC = 0.5 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[19]
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (27 °C, 5 d)	22 mm diameter	[17]
<i>Melaleuca leucadendron</i>	Com./Germany	-	$\alpha$ -Terpineol (36.57%), Caryophyllene (2.60%), $\alpha$ -Caryophyllene (1.70%)	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	MIC = 0.1 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[19]
<i>Mentha pulegium</i>	Fresh aerial parts/Tunisia	1.84%	Menthol (39.2%), 1,8-Cineole (17.1%),	AD, 0.5 mg EO mL <sup>-1</sup> , (24 °C, 7 d)	32.5% Inhibition	[22]
<i>Mentha spicata</i>	Com./USA	-	-	AWD, 100 $\mu$ L pure EO, (18 °C, 7 d)	100% Inhibition	[23]
<i>Monothotaxis littoralis</i>	Fresh leaves/Uganda	1.97%	-	APD, 10 $\mu$ L EO, (25 °C, 7–10 d):	MIC = 103 mg·mL <sup>-1</sup>	[24]
Oregano	Dried leaves/Algeria	-	Carvacrol (59.03%)	AD, (25 °C, 72 h)	MIC = 0.078 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[25]
Oregano	Com./Pakistan	-	Carvacrol (63.8%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 0.125–0.25 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]
Oregano	Com./Pakistan	-	Carvacrol (63.8%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium, (20 °C, 6 d)	100% Inhibition	[16]



Table 1. Cont.

Plants	Origin	Extraction Yield	Major Components **	Methods ***	Inhibition of Growth	Reference
<i>Origanum vulgare</i>	Air-dried leaves, 21 accessions/Lithuania	-	Sabinene (0.3–25.1%), $\beta$ -Caryophyllene (4.7–20.1%), Germacrene D (2.1–20.1%), Caryophyllene oxide (0.7–24.4%)	AWD, 100 $\mu$ L 0.5% EO, (18 °C, 7 d)	3.8–19.5 mm diameter	[25]
<i>Origanum vulgare</i>	Air-dried inflorescences, 21 accessions/Lithuania	-	Sabinene (0.9–18.3%), $\beta$ -Caryophyllene (5.4–24.5%), Germacrene D (1.5–12.2%), Caryophyllene oxide (0.7–24.4%)	AWD, 100 $\mu$ L 0.5% EO, (18 °C, 7 d)	9.9–22 mm diameter	[25]
<i>Origanum vulgare</i>	Fresh aerial parts/Tunisia	0.90%	Thymol (29.6%), <i>p</i> -Cymene (29.4%)	AD, 0.5 mg EO mL <sup>-1</sup> , (24 °C, 7 d)	77.4% Inhibition	[22]
Palmarosa	Com./Pakistan	-	Geraniol (72.26%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 1.0 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]
Palmarosa	Com./Pakistan	-	Geraniol (72.26%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium (20 °C, 6 d)	87% Inhibition	[16]
<i>Pimpinella anisum</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (27 °C, 5 d)	30 mm diameter	[17]
<i>Pinus halepensis</i>	Fresh needles/Tunisia	0.30–0.87%	(Z)-Caryophyllene (16–28.9%), $\beta$ -Myrcene (8.5–22.9%), $\alpha$ -Pinene (11.7–13.14%)	AD, 4 $\mu$ L EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	41.9–51.8% Inhibition	[26]
<i>Pinus pinea</i>	Fresh needles/Tunisia	0.40%	Limonene (54.1%),	AD, 4 $\mu$ L EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	61.1% Inhibition	[27]
<i>Piper capense</i>	Fresh whole plant/Kenya	0.20%	$\delta$ -Cadinene (16.82), $\beta$ -Pinene (7.24%), $\beta$ -Bisabolene (5.65%),	APD, 10 $\mu$ L EO, (25 °C, 7–10 d)	MIC = 66.3 mg·mL <sup>-1</sup>	[28]
<i>Pistacia lentiscus</i>	Fresh leaves/Tunisia	0.14%	$\alpha$ -Pinene (20.6%), Limonene (15.3%), $\beta$ -Pinene (9.6%)	AD, 4 $\mu$ L EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	44.4% Inhibition	[29]
<i>Pistacia terebintus</i>	Fresh leaves/Tunisia	0.24%	$\alpha$ -Terpinene (41.3%), $\alpha$ -Pinene (19.2%)	AD, 4 $\mu$ L EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	68.0% Inhibition	[29]
<i>Pistacia vera</i>	Fresh leaves/Tunisia	0.27%	$\alpha$ -Terpinene (32.4%), Limonene (25.1%)	AD, 4 $\mu$ L EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	63.2% Inhibition	[29]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Fresh aerial parts/Tunisia	0.60%	1,8-Cineole (40.9%), $\alpha$ -Pinene (24.2%),	AD, 0.5 mg EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	21.8% Inhibition	[22]
<i>Syzygium aromaticum</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO (27 °C, 5 d)	90 mm diameter	[17]
Thyme	Dried leaves/Algeria	0.85%	Thymol (46.97%), Linalool (3.94%)	AD, (25 °C, 72 h)	MIC = 0.156 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[25]
Thyme	Com./Pakistan	-	Linalool (64.0%)	AD, (20 °C, 10 d)	MIC = 0.5 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[16]
Thyme	Com./Pakistan	-	Linalool (64.0%)	Volatiles, 10 $\mu$ L EO, Agar medium (20 °C, 6 d)	100% Inhibition	[16]
<i>Thymus capitatus</i>	Fresh aerial parts/Tunisia	2.85%	Carvacrol (69.15%)	AD, 0.5 mg EO mL <sup>-1</sup> , (24 °C, 7 d)	89.9% Inhibition	[22]
<i>Thymus capitatus</i>	Fresh aerial parts/Tunisia	1.9 to 3.15%	Carvacrol (69.69 to 83.86%)	AD, 0.4 $\mu$ L EO mL <sup>-1</sup> , (25 °C, 7 d)	4 to 93% Inhibition	[30]
<i>Thymus pilegioides</i>	Com./Lithuania	-	-	APD, 10 $\mu$ L pure EO, (27 °C, 5 d)	33 mm diameter	[17]
<i>Thymus vulgaris</i>	Com. Austria	-	Thymol (45.75%), Limonene (15.15%),	AD, 2% EO, (25 °C, until control covered plates)	MIC = 0.025 $\mu$ L·mL <sup>-1</sup>	[19]
<i>Vepris macrophylla</i>	Leaves/Madagascar	-	Citral (56.3%)	AD, (22 °C, 6 d)	MIC = 130.4 $\mu$ g·mL <sup>-1</sup>	[31]

\* Com. = commercial EO. \*\* Three first abundant components, or sum of components reaching 50%. \*\*\* Abbreviations of methods: AD = agar diffusion, APD = agar and impregnated paper disc, AWD = agar well diffusion, BD: broth dilution.

## 2. Results

### 2.1. Effect of Eight EOs on Mycelial Growth and Production of Enniatins by *F. avenaceum*

EOs were produced by hydrodistillation of aerial parts from eight Tunisian plants. The extraction yields varied according to the plant species from 0.45 to 2.5% (Table 2).

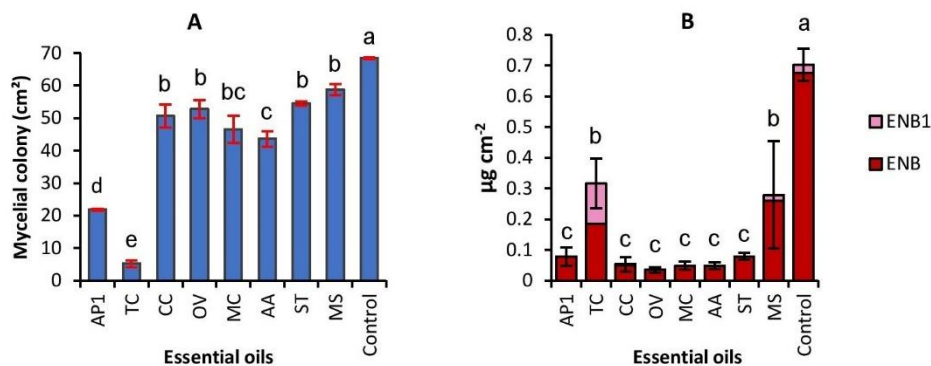
Whatever the considered EO, supplementation of FDM-Agar medium with  $0.1 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  led to a significant inhibition of *F. avenaceum* mycelial growth (Figure 1A). The inhibition percentages ranged between 14.1% and 92.4%. Two EOs, AP2 and TC, were proved as particularly efficient, with inhibition percentages of 68.1% and 92.4% respectively.

The *F. avenaceum* strain INRA 496 used throughout this study produced enniatin B and B1 but not enniatin A and A1. This production expressed as  $\mu\text{g}$  per  $\text{cm}^2$  of the mycelial colony was inhibited by most of the tested EOs at  $0.1 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figure 1B). MS and TC were the less efficient EOs with an inhibition percentage of 60.4% and 55.1% (ENB + ENB1), respectively. An induction of the production of ENB1 was observed with TC.

Based on its extraction yield higher than the mean of the other EOs we produced, its significant antifungal activity and its high inhibition of ENN production, *A. pusilla* EO was selected for a more in-depth study on its potential to control *F. avenaceum* and its production of mycotoxins.

**Table 2.** Extraction yield of essential oils from eight Tunisian aromatic plants.

Plant	EO Extraction Yield (%)
<i>Ammoides pusilla</i> (AP2)	1.64
<i>Thymus capitatus</i> (TC)	2.45
<i>Carum carvi</i> (CC)	1.57
<i>Origanum vulgare</i> (OV)	0.46
<i>Myrtus communis</i> (MC)	0.45
<i>Artemisia absintum</i> (AA)	0.96
<i>Schinus terbenetofonius</i> (ST)	2.50
<i>Mentha spicata</i> (MS)	1.10



**Figure 1.** Effect of essential oils extracted from eight Tunisian plants used at  $0.1 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  on the mycelial growth (A) and the accumulation of enniatins (ENNs) (B) by *F. avenaceum*. Values are means of 3 replicates. Error bars are  $\pm$  standard deviation. Means with the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ). ENB1 = enniatin B1, ENB = enniatin B. AP1 = *Ammoides pusilla*, TC = *Thymus capitatus*, CC = *Carum carvi*, OV = *Origanum vulgare*, MC = *Myrtus communis*, AA = *Artemisia absintum*, ST = *Schinus terbenetofonius*, MS = *Mentha spicata*.

### 2.2. Chemical Composition of *A. pusilla* EO

Two different batches of *A. pusilla* were used to produce EOs; the extraction yields for AP1 and AP2 were 1.60% and 1.64% respectively. Their chemical compositions are reported in Table 3. The main identified components were thymol,  $\gamma$ -terpinene, *p*-cymene and thymol-methyl-ether. They represented 34.70, 27.03, 19.89, 9.18% in AP1 and 53.55, 16.82, 14.59, 8.07% in AP2, respectively. AP2 was more concentrated in oxygenated monoterpenes

with thymol accounting for half of the components whereas thymol accounted only for a third in AP1.

**Table 3.** Chemical composition (%) of essential oils of *A. pusilla* using GC-MS.

Compounds	RT <sup>1</sup>	% in AP1	% in AP2
<i>Monoterpene hydrocarbons</i>			
$\alpha$ -thujene	5.69	0.37%	0.24%
$\alpha$ -pinene	5.86	0.21%	0.36%
Sabinene	6.76	0.57%	----
$\beta$ -myrcene	7.12	0.48%	0.30%
$\alpha$ -terpinene	7.80	----	0.19%
<i>p</i> -Cymene	8.00	19.89%	14.59%
$\alpha$ -thujene	5.69	0.37%	0.24%
$\gamma$ -terpinene	8.89	27.03%	16.82%
<i>o</i> -Allyltoluene	9.72	0.25%	----
<i>Oxygenated monoterpenes</i>			
Borneol	11.86	0.18%	----
Terpinen-4-ol	12.17	0.67%	0.58%
Thymol methyl ether	13.56	9.18%	8.07%
Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)	13.69	0.73%	0.52%
Thymol (isomere)	15.08	1.70%	2.88%
Thymol	15.26	34.70%	53.55%
NI	15.36	0.25%	0.29%
Carvacrol	15.59	0.41%	0.68%
2-( <i>t</i> -butyl)-5,6-dihydro-4 <i>H</i> - cyclopenta[ <i>b</i> ]thiophene	17.74	0.61%	0.53%
1-Methoxy-2- <i>tert</i> -butyl-6-methylbenzene	18.87	2.48%	0.20%
Identified compounds		97.27%	99.51%
Monoterpene hydrocarbons		48.83%	32.70%
Oxygenated monoterpenes		47.82%	66.58%
Extraction yield		1.6%	1.64%

<sup>1</sup> RT: Retention time; AP1 = EO of *A. pusilla* obtained from the batch of plant 1. AP2 = EO of *A. pusilla* obtained from the batch of plant 2. Calculated percentage (%) of each identified compound is based on the total detected compounds.

### 2.3. Effect of *A. pusilla* EOs on Mycelial Growth and Production of Enniatins by *F. avenaceum*

#### 2.3.1. In Vitro Contact Assays in Agar Media

Linear growth indexes were calculated from mycelial areas measured daily for 7 days with different dilutions of AP1 in FDM-agar medium (Table 4). No growth was observed with concentrations equal or higher than  $0.75 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  of AP1 EO, and an index close to 0 at  $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  was determined. The minimum inhibitory concentration (MIC), defined as the lowest concentration of the EO which completely prevented visible fungal growth, was estimated to be nearly  $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . At this concentration, a 99.2% inhibition of fungal growth was observed after 7 days of incubation. Using a linear regression of the data in Table 4, excluding 0.75 and  $1 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0.92$ ), the concentration leading to 50% growth inhibition (IC50) was calculated to be  $0.23 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The accumulation of ENNs per unit of mycelial area was inhibited by 65, 76 and 100% at AP1 concentrations of 0.1, 0.25 and  $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Using a linear regression ( $R^2 = 0.91$ ), IC50 of ENNs accumulation was estimated equal to  $0.12 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Table 4.** Linear growth index of *F. avenaceum* and ENNs accumulation in presence of different concentrations of AP1 EO.

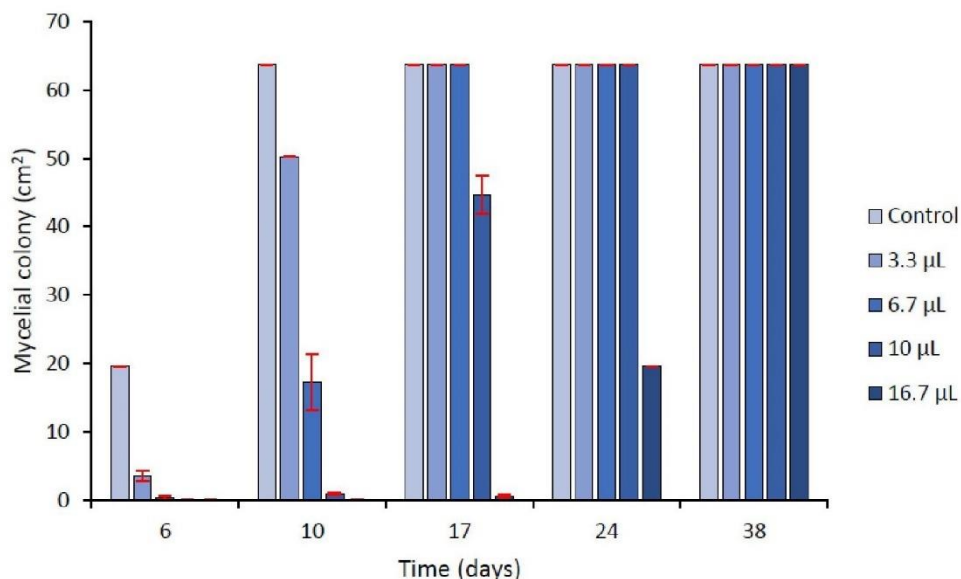
	Concentrations of Essential Oil (mL·L <sup>-1</sup> )					
	0 (Control)	0.1	0.25	0.5	0.75	1
Linear growth index	16.22	10.65	3.34	0.19	0.00	0.00
µg enniatins/cm <sup>2</sup> mycelium	2.06	0.72	0.49	0.00	0.00	0.00

Mycelial areas were measured every day for 7 days.

When considering AP2, MIC and IC<sub>50</sub> calculated for 10-day old cultures were 0.25 µL·mL<sup>-1</sup> and 0.10 µL·mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.99) respectively. A 92% reduction of ENN accumulation was induced by a concentration of 0.15 µL·mL<sup>-1</sup> of AP2 while this inhibition percentage was 57% at 0.05 µL·mL<sup>-1</sup>. Using a linear regression (R<sup>2</sup> = 0.99), IC<sub>50</sub> for the reduction of ENN accumulation was estimated to be 0.048 µL·mL<sup>-1</sup>. Altogether, the previous data support the high inhibitory efficiency of *A. pusilla* EO, AP2 being more than 2-fold more effective than AP1.

### 2.3.2. Effect of Volatiles Components

Fumigation assays have evidenced significant antifungal effects of the volatiles contained in AP EOs. Increasing quantities of EO led to slow-down of fungal growth kinetics, due to increased lag phases and decreased of linear growth indexes. In control conditions, the maximum area (full invasion of the plates) was reached after 10 days of incubation. With 16.7 µL·L<sup>-1</sup> of EO diffusing in a closed jar, an important fungal growth reduction was observed up to 17 days. After 38 days, the mycelium reached the border of the plates (Figure 2).

**Figure 2.** Mycelial growth of *F. avenaceum* in presence of different quantities of volatile compounds of *A. pusilla* EO (AP1). The volumes in µL are the quantity of EO per L of air. Means of 3 replicates. Errors bars are ± standard deviations.

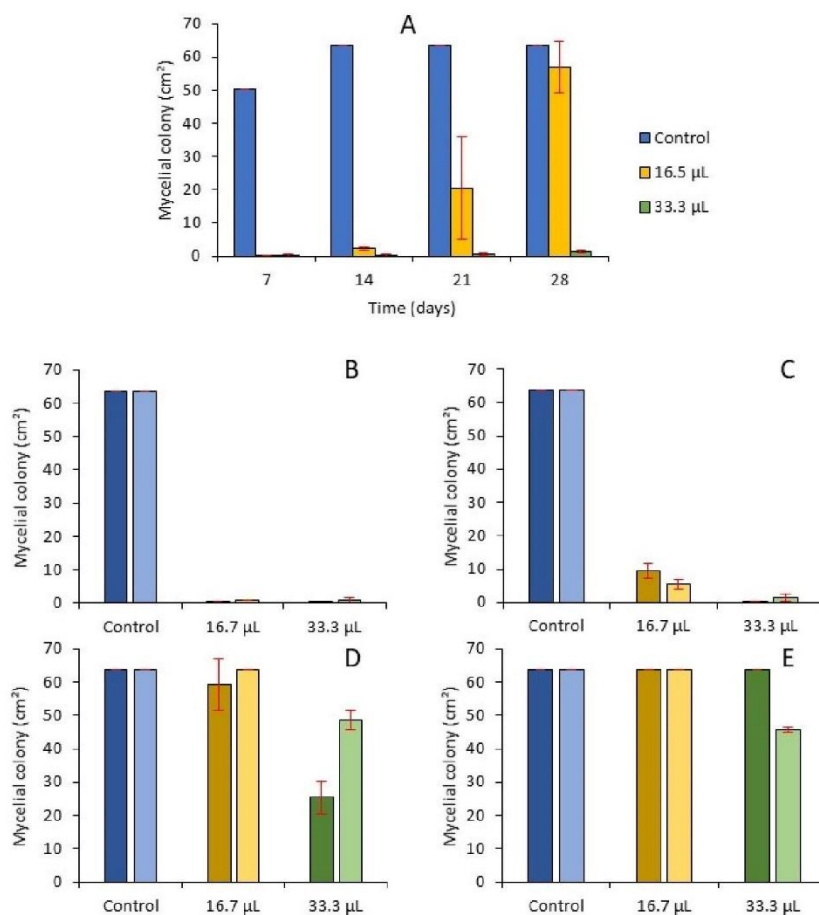
Linear growth index until 24 days and inhibition percentages calculated at day 10 are presented in Table 5. The IC<sub>50</sub> value determined using a linear regression was 7.58 µL·L<sup>-1</sup>. Volatile compounds were also shown to induce a significant inhibition of ENN accumulation (Table 5). Using a linear regression (R<sup>2</sup> = 0.97), IC<sub>50</sub> of ENN accumulation was estimated to be 4.2 µL·L<sup>-1</sup>.

**Table 5.** Linear growth index of *F. avenaceum* and ENNs accumulation after 10 days in presence of different quantities of *A. pusilla* EO (AP1) volatile components.

	$\mu\text{L EO L}^{-1}$ Air				
	0 (control)	3.3	6.7	10	16.7
Linear growth index	16.02	15.68	12.11	10.10	2.97
% growth inhibition at 10 d	0	21.97	72.83	98.40	100
$\mu\text{g ENNs cm}^{-2}$ mycelium (10 d)	1.34	0.44	0.26	<LOQ*	<LOQ

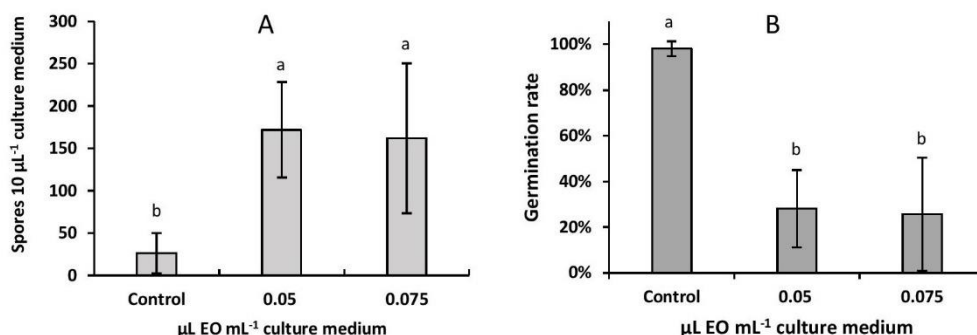
\* LOQ = limit of quantification.

The behavior of the mycelial growth over a long exposure was assessed with a second assay using two concentrations of EO (16.66 and 33.3  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 28 days (Figure 3A). The inhibition recorded at day 21 with 16.7  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  (68%) was not different from the value recorded at day 24 in the previous assay (Figure 2) whereas a non-significant inhibition (10%) was recorded at day 28. Using the highest quantity of EO (33.3  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 98% of mycelial growth was still inhibited at day 28.



**Figure 3.** Mycelial growth of *F. avenaceum* in presence of volatile compounds from 16.7 or 33.3  $\mu\text{L EO L}^{-1}$  in consecutive cultures. (A) First exposure to volatiles. (B,C) second exposure with the same quantity of EO as in the first exposure of fungal material coming from (A) as spore suspension (dark bars) or plugs (light bars) (second culture-EO). (D,E) second culture without EO of fungal material coming from (A) as spore suspension (dark bars) or plugs (light bars);  $\mu\text{L}$  are those of the first exposure (second culture-control). (B,D) are measures at 10 days, (C,E) are measures at 28 days. Means of 3 replicates. Error bars are  $\pm$  standard deviations.

After this first 28 day-long exposure time to EO volatile components ( $16.7$  or  $33.3 \mu\text{L EO L}^{-1}$ ), either plugs or spores were collected and used for inoculation of new plates placed either under the same conditions as the controls without EO (second culture-control) or in the presence of the volatiles in the same quantity of EO than in the first culture (second culture-EO). The second culture-control recovered their ability to grow, with a low remaining inhibition effect for the exposure to volatiles from  $33.3 \mu\text{L EO L}^{-1}$ , whatever plugs or spore suspensions were used as inoculum (Figure 3D,E). In the case of the second culture-EO, the inhibitory effects were improved (Figure 4B,C). At 28 days, during the second exposure at  $16.7 \mu\text{L EO L}^{-1}$  for 28 days, the mycelial surface was 83% lesser than in the first exposure.



**Figure 4.** Changes in sporulation capacity (A) and rate of spore germination (B) after treatment with two concentrations of *A. pusilla* EO for 24 h. Means of 3 replicates. Errors bars are  $\pm$  standard deviations. Means with the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

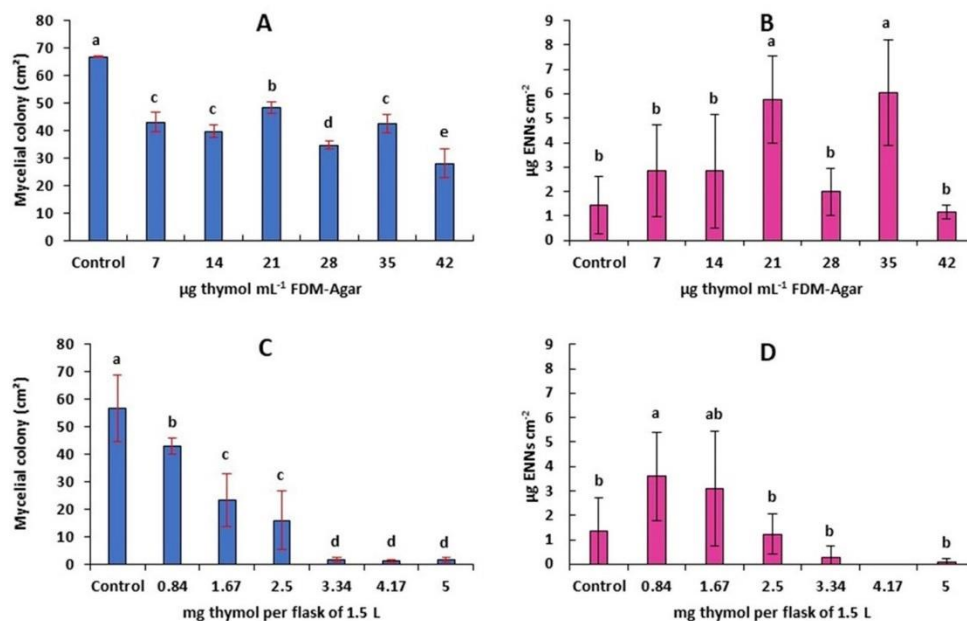
#### 2.4. Effect of *A. pusilla* EO on the Sporulation and Spore Germination of *F. avenaceum*

As shown in Figure 4, the ratio of germinated spores after contact of *F. avenaceum* for 24 h with  $0.05$  or  $0.075 \mu\text{L A. pusilla EO L}^{-1}$  decreased significantly compared to controls. On the opposite side, the exposure to the EO increased spore production (Figure 4).

#### 2.5. Antifungal and Antimycotoxigenic Activity of Thymol on *F. avenaceum*

As thymol was shown to be the main component of *A. pusilla* EO, we tested its biological activity against *F. avenaceum*. When diluted in the agar medium, a significant inhibition (25%) of the mycelial growth was observed at the lowest concentration tested,  $7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . This inhibition did not increase with higher concentrations (Figure 5A). When thymol was used as a fumigant (Figure 5C), a dose-dependent activity was observed. Both with *in vitro* contact assay and fumigation assay, stimulation of ENNs production was observed in several samples but none of the decreases in concentrations due to treatment was significant (Figure 5B,D).





**Figure 5.** Effect of thymol on the mycelial growth rate (A,C) and production of ENNs (B,D) by *F. avenaceum*. Thymol was either diluted in the culture medium (A,B) or use as a fumigant (C,D). Values are means of 6 replicates. Error bars are  $\pm$  standard deviation. Means with the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3. Discussion

In order to find an EO with a high potential for inhibiting both the mycelial growth and ENN production by *F. avenaceum*, eight different Tunisian aromatic plants were collected and their EOs were produced by hydrodistillation. All EOs were efficient for limiting the mycelial growth with different levels of antifungal activity. EOs of four of the species had been previously tested for their antifungal activity against *F. avenaceum*: *C. carvi*, *M. spicata*, *O. vulgare*, *T. capitatus* [16,17,22,25,30]. Due to the different ways in which the antifungal activities were measured and reported in the different previous works (see Table 1), it was difficult to compare the efficiency of the EOs. *Carum carvi* EO was one of the two most effective among the 6 commercial EOs tested by Paškevičius et al. [17] whereas a low activity was observed here. For *O. vulgare* EO, the previous work reported MICs of 0.08 to 0.25  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  [16,25] and 77% inhibition of the mycelial growth at 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  [22]. In the same study *T. capitatus* EO inhibited up to 90% of the mycelial growth [22]. In the present study with a lower concentration (0.1  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) the *T. capitatus* EO had the highest antifungal activity (92% inhibition).

To the best of our knowledge, this article shows for the first time the antifungal activity against *F. avenaceum* of EOs extracted from *A. absintum*, *M. communis*, *S. terbenfonius* and *A. pusilla*. In a recent overview of the published studies on the antifungal properties of EOs, these four species were not listed [34]. *Ammoides pusilla* EO was the second-best EO for inhibiting mycelial growth and is a candidate, along with *T. capitatus* EO, for the control of *F. avenaceum* in cereals.

Mycotoxin production was suspected to be part of the adaptive response of fungi to stressful conditions such as an exposure to antifungal compounds [35,36]. It was commonly observed with molecules, such as phenolic acids, active on both fungal growth and mycotoxin production by *Fusarium* species that the fungal response is strain and concentration-dependent. For instance, ferulic acid can either activate the production of *Fusarium* mycotoxins at low concentrations or inhibit them at higher concentrations [37–39]. No correlation between antifungal and antimycotoxigenic effects was also observed with some EOs. In maize samples inoculated with *F. graminearum*, treatment with Fennel EO greatly reduced the fungal biomass (81%) as assessed by the amount of ergosterol in the

grains, while no more than a 7% decrease in ZEA concentration was found [40]. This suggested an induction of ZEA production in the remaining mycelium in very unsuitable growth conditions. To select effective EOs, the antimycotoxigenic activities or at least the absence of risk of induction of the production of mycotoxins under certain conditions must also be studied. It is interesting to note that all EOs tested in the present work significantly inhibited the production of ENNs by *F. avenaceum*. These activities had not been reported before. Both EOs from *T. capitatus* and *M. spicata* were less efficient. Consequently, *A. pusilla* EO appeared as the best candidate to control *F. avenaceum* and its ENNs production.

*Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. is a halophilic annual herbaceous *Apiaceae*, that is found widely in arid and semi-arid Mediterranean regions and is used as a traditional medicine [41]. The extraction yield of EOs and their composition depended on the plant part used, the extraction method, the plant stage of development, the harvesting season and the geographical origin. Eight plants of *A. pusilla* from eight Algerian localities showed that flower parts gave higher percentages of extraction by hydrodistillation than leaf parts [42]. Oxygenated monoterpenes were the main components of the *A. pusilla* EOs, except for the EO extracted from leaves originated from Ain Kihal and the EO extracted from the flower part originated from Fehoul [43]. In a previous study, the same authors found 57% of oxygenated terpenes in aerial part EO [39]. A significant antioxidant activity of *A. pusilla* EO has been attributed to their high content in phenolic terpenes, especially thymol [41,42].

In the present study *A. pusilla* plants were collected fresh in Tunisia at the flowering stage and air-dried (AP1) or purchased as dry material on a market (AP2). The yields of EO extraction agreed with a previous work reporting that aerial parts of Tunisian *A. pusilla* yielded 1.6% EO by hydrodistillation and leaves and flowers were more productive (2.7%) [43]. The composition of the two EOs we obtained differed. Oxygenated terpenes were dominant (66.6%) in AP2 as in [41] whereas monoterpene hydrocarbons dominated (48.8%) in AP1. The composition of AP1 was close to that of the EO studied by Souhail et al. [43] in which the main components for the aerial parts were thymol (33.0%),  $\gamma$ -terpinene (28.2%), *p*-cymene (15.3%) and thymol-methyl-ether (8.9%). The difference in composition between AP1 and AP2 is a new example of variation in composition with the batch of plants used for EO extraction. However, both EOs were of the thymol chemotype, as in most published compositions of *A. pusilla* EOs, although in rare studies thymol was not the main component [41].

The difference in EOs' chemical composition may affect their antifungal activity. Using dilutions of EOs in an agar medium, the MIC and the IC<sub>50</sub> of AP2 were two times lower than those of AP1. Thymol was the main component of the EOs accounting for 53.6% and 34.7% of volatile components in AP2 and AP1 respectively. This result led us to propose that the higher activity of AP2 was due to its higher concentration in thymol. This phenol is known to have strong antifungal activities on twelve different strains of mycotoxigenic fungi, belonging to different species and involved in several plant diseases [44]. We observed it was active also against *F. avenaceum*, both in agar dilution assay or as a fumigant. Its hydrophobicity allows it to accumulate in the lipids of the cell membranes reacting with cell proteins and finally drastically affecting the membrane integrity [45]. Thymol functions also as a redox-active compound, inducing generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in fungal cells [46] and inhibiting genes involved in cell membranes synthesis [47]. In this way, it acts as a chemosensitizing agent for various pathogenic and opportunistic fungi [32,33]. Thus, the richness of *A. pusilla* EO in thymol acting in synergy with other components may be at the origin of its antifungal potential.

No negative effect of *A. pusilla* EO was observed on the sporulation rate of *F. avenaceum*, in contrast to the 100% inhibition recorded with a thyme EO of thymol chemotype diluted at 0.04  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  [25] and the significant effect of thymol on *F. verticillioides* [48]

We measured the antifungal activity of the *A. pusilla* EO against *F. avenaceum* after inoculation of an agar medium with spore suspensions placed at the center of the Petri dishes. The inhibitions we measured finally resulted from both negative effects on the germination of spores and decreases in the mycelial growth rates. We measured that *Ammoides pusilla*



EO diluted at  $0.05 \mu\text{L EO mL}^{-1}$  inhibited 71% of conidia germination. It was previously reported that thymol was effective against *Fusarium* spp conidia germination. For instance,  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$  inhibited 100% of germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthia* after conidia after contact for 24 h [49], and 1 mM inhibited 81% germination of *F. verticillioides* conidia after contact for 12 h [48]. Furthermore, volatiles of commercial EOs of cinnamon, citronella, clove, lemongrass, oregano, thyme inhibited the sporulation of *F. avenaceum* at rates ranging from 71 to 100% [16]. Among the tested commercial EOs, an oregano EO of carvacrol chemotype was the least efficient and a thyme of linalool chemotype was the most potent one [16].

Actually, testing the effect of volatile compounds identifies indirect activity of EOs as opposed to direct contact in the agar dilution methods in which non-volatile components may contribute to the overall antifungal effect [15]. Surprisingly, the bioactivity of EO volatiles on *F. avenaceum* had been tested in only one recent paper (Table 1). In this study, 10  $\mu\text{L}$  of pure EO was added to an inverted Petri dish [16], which resulted in higher concentrations of volatiles than in the present work where 3 to 33  $\mu\text{L EO L}^{-1}$  air were used. In addition, the colony diameters were measured after 10 days while incubations lasted 24–28 days in our study. Consequently, we did not observe the fungicidal effect reported for all the EOs tested by Parikh et al. [16], but only fungistatic effects. Furthermore, EO concentrations leading to 100% inhibition during the first two weeks did not block but only slowed down the mycelial growth with a longer exposure (38 days). This may be attributed to the decrease in concentrations of active compounds over time due to EO degradation that was responsible for the loss of inhibition activity. EOs are known to be sensitive to conversion and degradation reactions modulated by temperature, light, and oxygen availability [24,50]. These effects on mycelial growth tended to disappear after transfer of both mycelium and spores to fresh agar medium under fresh air without EO vapors, but they were amplified when the transfer was made under conditions where volatiles from a new EO application were provided. There were no residual properties of EO and maintaining exposure to concentrations of EO volatiles having a fungistatic effect would be a prerequisite from the use of *A. pusilla* EO to control *F. avenaceum*.

Clearly, it is important to ensure that any antifungal compound used to control *F. avenaceum* provides no significant induction of ENN production when applied at doses below the lowest concentration inhibiting 100% of mycelial growth. Thymol and other redox-active compounds inducing oxidative stress were reported to activate the biosynthesis of trichothecenes production in some *Fusarium* species [35,51]. However, in other studies treatment of fungal cultures by thymol did not boost DON and ZEA production and did not up-regulate key toxin biosynthetic genes in *F. culmorum*, at the concentration used [32]. Overall, treatments having both antifungal and antimycotoxigenic effects are expected when searching for a potent EO. This was the case here with *A. pusilla* EO. In contact assays, the IC50 for ENN accumulation was half the IC50 for mycelial growth. The volatiles compounds from two amounts of EOs inhibiting 22 and 73% of the mycelial growth and decreased the concentration of ENNs by 67 and 80%, respectively. Hydroxycinnamic acids were shown to interfere with both the growth of *F. avenaceum* and its production of ENNs [52]. However, in certain situations, a significant reduction in ENNs yield and a drastic transcriptional down-regulation of two genes involved in ENNs biosynthesis were observed while *F. avenaceum* growth was not or weakly affected, corroborating the occurrence of a regulatory mechanism that specifically targeted the production of ENNs [52]. With *A. pusilla* EO also, the antifungal and antimycotoxigenic activities could be partly the results of independent regulation mechanisms that need to be elucidated. Nothing is known regarding the effect of oxidative stress on the production of ENNs, but as proposed for ferulic acid [52], the capacity of the EO to alleviate oxidative stress [38,39] could explain its inhibiting activity on ENNs production.

This first investigation on the antimycotoxigenic effect of *A. pusilla* EO had shown that this EO could be used to decrease the accumulation of ENNs by *F. avenaceum* in cereals, ensuring improved food security for this sector.



## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material and EOs

*Ammoides pusilla* (AP<sub>2</sub>), *Thymus capitatus* (TC), *Carum carvi* (CC), *Origanum vulgare* (OVEO), *Myrtus communis* (MC), *Artemisia absintum* (AA) were purchased from a local medicinal plant market in Tunisia at a dry state of the plant aerial parts. *Mentha spicata* aerial part (MS), *Schinus terbenthifolius* fruits and leaves (ST) and a second lot of *Ammoides pusilla*, aerial parts at the flowering stage (AP<sub>1</sub>) were gathered by LMMA laboratory members, air-dried under dark conditions. The samples were stored under dry and dark conditions before extraction of EOs. EOs extracted from these plant batches had previously been tested for their potential bioactivities [43,53].

All the essential oils were extracted through hydrodistillation using a conventional glass Clevenger-type apparatus. Anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was added to the extracted oils to eliminate eventual residual water. The extraction yield was measured as the percentage of oil weight based on the dry plant material weight, following the equation:  $EY = EOW/DMW \times 100$  where EY: extraction yield, EOW: essential oil weight, DMW: dry plant material weight. The essential oils were stored at 4 °C until being used.

### 4.2. Fusarium Strain and Media

The strain of *F. avenaceum* I496 used throughout this study has been isolated from maize in France, in 2007, and stored in the fungal collection of the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE/MycSA collection). A stock culture maintained at 4 °C on potato dextrose agar (PDA) slants under mineral oil was sub-cultivated on PDA medium in 55 mm Petri dishes and kept at 4 °C until being used in the different tests.

When inoculum was required, *F. avenaceum* was grown on PDA plates for 3–5 days at 25 °C, and conidia suspensions (10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) were prepared as in Gautier et al. [52].

Assays on growth inhibition and production of mycotoxins were performed on FDM-Agar medium in Petri dishes (diameter 90 mm) supplemented with EOs and inoculated at the center with 10 µL of conidia suspension or alternatively with an agar plug from a previous culture on FDM-Agar. FDM is a synthetic medium promoting the production of ENNs by *F. avenaceum* [54]. The EOs were diluted in ethanol and added to the FDM-agar culture medium cooled to 55 °C (still liquid) after autoclaving, stirred for 5 min and poured into 9 cm diameter Petri dishes, 10 mL per plate. Controls with diluting solvent were prepared.

### 4.3. Agar Dilution Assays

#### 4.3.1. Comparison of Eight EOs

The EOs were diluted at 0.1 µL·mL<sup>-1</sup> FDM-Agar medium and the plates were inoculated with conidia suspensions. The plates containing the different essential oils and the control were put in different hermetically sealed preservation jars with an internal volume of 1.5 L and incubated at 25 °C for 10 days. Mycelial growth was assessed at day 5 and day 10 after inoculation by measuring the area covered by the mycelial colony on the plates using pictures analyzed with the ImageJ software. The inhibition rates were calculated by comparisons with controls without EO. Three plates were measured at each incubation time for each EO. Immediately after taking the picture, the plates were stored at −20 °C before extraction and qualification of ENNs.

#### 4.3.2. Activity of *A. pusilla* EO on *F. avenaceum* in Contact Assay

The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) is defined as the minimum concentration that inhibits 100% of the mycelial growth and the IC<sub>50</sub> as the concentration that inhibits 50% of the mycelial growth. Two different extractions of *A. pusilla* EO were used: AP1 and AP2. AP2 was diluted in the FDM-Agar medium at 0 (control), 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 and 0.5 µL·mL<sup>-1</sup> and AP1 dilutions were 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 and 5 µL·mL<sup>-1</sup>. Each treatment was triplicated and each set of triplicates was incubated in different hermetically

closed jars at 25 °C for 10 days. Pictures of the plates were taken every 2 days and the areas covered by the mycelial colonies measured. The growth index of *F. avenaceum* at each concentration was calculated as in Krzyśko-Łupicka et al. [55]:  $T = A/D + b1/d1 + \dots + bx/dx$ , where: T = index of linear growth; A = average measurement value of mycelial surfaces (cm<sup>2</sup>); D = duration of the experiment; b1 ... bx = mycelial surfaces (cm<sup>2</sup>); d1 ... dx = number of days since last measurement. Straight linear regression equations defining the relationship between the decimal logarithms of EO concentrations and the growth index or the mycelial area at the end of the experiment (10 days) were used to calculate the IC50. On day 10, the plates were conserved at −20 °C until their use for ENNs analysis of ENNs.

#### 4.4. Effect of Volatile Compounds of *A. pusilla* EO on *F. avenaceum*

The evaluation of the effect of the volatile compounds of *A. pusilla* EO was performed in fumigation assays by the exposure of *F. avenaceum* to a set of concentration of the AP2: 0 (control), 3.33, 6.66, 10 and 16.66 µL EO mL<sup>−1</sup> of air volume.

Petri dishes (90 mm) were marked with two perpendicular length scales. For each concentration, sets of three dishes were filled with 10 mL of FDM-agar medium and inoculated at the center part with 10<sup>4</sup> spores of *F. avenaceum*. The dishes without lids were put into preservation jars (3 dishes in each) of 1.5 L. One cm<sup>2</sup> of sterile filter paper was put in the center of open 55-mm Petri dishes. The appropriate amounts of the EO were deposited onto the filter papers, one Petri dish was put into each jar, and the jars were hermetically closed. The jars were incubated at 25 °C for 10 or 24 days. The mycelial growth was evaluated at 6, 10, 17 and 24 d of incubation thanks to the length rules without destruction of the dishes nor disturbing the incubation in jars. The mycotoxins were extracted in the culture medium of 3 dishes from a jar per concentration after incubation for 10 and 24 days.

In order to evaluate the persistence of the effect of a first treatment by the volatile compounds of AP<sub>2</sub> EO, two concentrations having high activities were selected: 16.67 and 33.33 µL·L<sup>−1</sup> air. Each treatment and control without EO were triplicated. The jars were incubated at 25 °C for 28 days and the mycelial growth was measured every week as above until 28 days of incubation at 25 °C. On day 28, either plugs (diameter 0.5 cm) or spores were collected from the mycelial colonies. Either a mycelial plug or 10<sup>4</sup> spores were reinoculated on new Petri dishes with FDM-agar culture medium. The Petri dishes with FDM-Agar culture medium inoculated with spores or plugs originating from the first exposure at 16.67 or 33.33 µL·L<sup>−1</sup> were incubated at 25 °C for 28 days in presence of 16.67 or 33.33 µL L<sup>−1</sup> AP<sub>2</sub> EO respectively, and in absence of EO. The Petri dishes with FDM-agar culture medium inoculated with spores or plugs originating from the first control without EO were incubated without EO.

#### 4.5. Effect *A. pusilla* EO on Production and Germination of Conidia by *F. avenaceum*

To study the effect of *A. pusilla* EO on conidia production and their ability to germinate, suspensions of *F. avenaceum* conidia were prepared as in 4.2 and used to inoculate CMC liquid medium. The cultures were incubated for 3 days at 25 °C, and EO was added at two concentrations, 0.05 µL and 0.075 µL EO mL<sup>−1</sup>. In the control, 2% of ethanol was added. After incubation for 24 h, the cultures were thoroughly mixed and three aliquots of suspension were filtered and collected. The number of total conidia in 10 µL of suspension was recorded under a microscope. The conidia suspensions were incubated for 24 h at 25 °C in liquid FDM medium and 10 µL were observed under a microscope to record the percentage of germinated conidia.

#### 4.6. Effect of Thymol on *F. avenaceum*

Pure thymol, 5-methyl-2-isopropylphenol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was used both in agar dilution assays and in fumigation as for the EO. Conidia suspensions were inoculated, and incubation set for 10 days at 25 °C. In the agar dilutions



assays, the concentrations used were 7, 14, 21, 28, 34, 43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In the fumigation assays, they were 0.84, 1.67, 2.5, 3.34, 4.17, 5  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### 4.7. Chemical Composition of *A. pusilla* EO

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of EOs was performed on an Agilent 7890 gas chromatograph, coupled to an Agilent 5975C mass spectrometer with electron impact ionization (70 eV) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), using an HP-5 column (30 m  $\times$  0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ). The operating conditions for gas chromatography analysis were as follows: the detector temperature 280  $^{\circ}\text{C}$ ; the injector temperature 210  $^{\circ}\text{C}$ ; the oven temperature program varied from 180  $^{\circ}\text{C}$  (1 min) to 200  $^{\circ}\text{C}$  (15 min) then from 220  $^{\circ}\text{C}$  (3 min) to 300  $^{\circ}\text{C}$  (10 min). Carrier gas was  $\text{H}_2$  (0.9  $\text{mL min}^{-1}$ ); split ratio of 1:100 and a linear velocity of 36.45  $\text{cm s}^{-1}$  was used as carrier gas and mass spectral range was recorded from  $m/z$  50–550 amu. The injected volume was 1  $\mu\text{L}$  of 1% EO solution in hexane (Purity  $\geq$  97%) (Merck, Darmstadt, Germany). The identities of the EO components were established by comparison of their MS spectra with those reported in literature and by computer matching with the Wiley mass spectra library (Eleventh Edition/NIST 2009).

#### 4.8. Extraction and Quantification of Enniatins

The content of a Petri dish (agar medium plus mycelium) was sliced and placed in 35 mL of ethyl acetate (VWR, Fontenay-Sous-Bois, France) for 15 min at room temperature with agitation at 250 rpm. After filtration on  $n^{\circ}4$  filter paper, 5 mL were evaporated to dryness at 45  $^{\circ}\text{C}$  under nitrogen flow. The dried samples were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of methanol/water (1:1,  $v/v$ ) and filtered on 0.2  $\mu\text{m}$  filters before analysis. Quantification of ENNs was performed on a Shimadzu Prominence UPLC chain, equipped with two pumps LC-30 AD, a degasser DGU-20A5R, an auto sampler SIL-30 AC and a DAD detector SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, Noisiel, France). Separation of 5  $\mu\text{L}$  of extract was achieved on a Kinetex 2,6U XB-C18—100  $\text{\AA}$  column (150  $\times$  4.6 mm; 2.6  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Le Pecq, France) maintained at 45  $^{\circ}\text{C}$ . An elution gradient of acetonitrile in water was used with a constant flow at 1.4  $\text{mL min}^{-1}$ : 30% acetonitrile for 2.5 min, 30–99% acetonitrile in 5 min, 99% acetonitrile for 3.5 min, and 2.5 min post-run equilibration with 30% acetonitrile. LC-grade methanol and acetonitrile were purchased from VWR (Fontenay-Sous-Bois, France). Absorbance spectra were recorded from 190 to 450 nm and peak areas were measured at 205 nm. External calibration with standard solutions of A, A1, B and B1 enniatins (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), allowed quantifications between 1 and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The limit of quantification was 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.9. Statistical Analyses

Results were given as mean values  $\pm$  standard deviation of three biological replications. Mycelial growth parameters and ENNs concentrations were subjected to ANOVA and differences between treatments were tested with Duncan's multiple range test. Student test (comparing the result of each condition with its respective control was used for the sporulation capacity and rate of spore germination. All the statistical analysis was performed using SAS Software (Statistical Analysis System, version 9, Cary, NC, USA).  $p$  values  $<$  0.05 were regarded as significant.

## 5. Conclusions

The present study evidenced for the first time the capacity of essential oils and their volatile parts to efficiently reduce the production of ENNs by a *F. avenaceum* strain, in addition to fungistatic activities. The data obtained with *A. pusilla* EO and pure thymol confirmed the contribution of thymol to the efficiency of the EO, but not to the EO capacity to reduce the production of ENNs. This supports the interest of EOs in their complexity for environmentally friendly treatments to control mycotoxigenic and plant pathogen fungi. To provide lasting effects, it would be interesting to develop formulae protecting the EOs

from alterations and favoring a progressive release within the environment of the targeted fungi. Confirming the activity of *A. pusilla* EO on a diversity of *F. avenaceum* strains and other *Fusarium* species producing ENNs would be necessary before proposing the practical use of this natural production for controlling ENNs in cereal-derived products.

**Author Contributions:** Funding acquisition, M.A. and J.-M.S.; Investigation, Y.C.; Methodology, Y.C., V.A. and J.-M.S.; Supervision, S.O., F.R.-F., M.A. and J.-M.S.; Writing—original draft, Y.C. and J.-M.S.; Writing—review & editing, S.O., V.A., F.R.-F. and M.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the PHC-Utique program, project CMCU 18G0913/Campus France 39198RK.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The raw data associated to the data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank Selim Jallouli from the Laboratory of Bioactive Substances, Biotechnology center of Borj Cédria (Tunisia) for helping in the GC/MS analysis of the essential oils.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Fungal strains, samples of plant material and tested EOs are available from authors.

## References

1. Medina, A.; Akbar, A.; Baazeem, A.; Rodriguez, A.; Magan, N. Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biol. Rev.* **2017**, *31*, 143–154. [CrossRef]
2. Jia, P.; Liang, J.; Yang, S.; Zhang, S.; Liu, J.; Liang, Z.; Li, F.; Zeng, Q.; Fang, Z.; Liao, B.; et al. Plant diversity enhances the reclamation of degraded lands by stimulating plant–soil feedbacks. *J. Appl. Ecol.* **2020**, *57*, 1258–1270. [CrossRef]
3. Pitt, J.I.; Taniwaki, M.H.; Cole, M.B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control* **2013**, *32*, 205–215. [CrossRef]
4. Oueslati, S.; Berrada, H.; Juan-García, A.; Mañes, J.; Juan, C. Multiple mycotoxin determination on Tunisian cereals-based food and evaluation of the population exposure. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 1271–1281. [CrossRef]
5. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [CrossRef]
6. Jestoi, M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 21–49. [CrossRef]
7. Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 218–237. [CrossRef] [PubMed]
8. Codex Alimentarius Commission. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed. CXS193-1995 Amended in 2019. Available online: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/> (accessed on 5 August 2021).
9. European Commission. European Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *364*, 5–24.
10. Cheli, F.; Battaglia, D.; Gallo, R.; Dell’Orto, V. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control* **2014**, *37*, 315–325. [CrossRef]
11. Gautier, C.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. *Fusarium* mycotoxins enniatins. An updated review of their occurrence, the producing *fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 4788–4798. [CrossRef]
12. Luo, Y.; Liu, X.; Li, J. Updating techniques on controlling mycotoxins—A review. *Food Control*. **2018**, *89*, 123–132. [CrossRef]
13. Schuenzel, K.M.; Harrison, M.A. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1909–1915. [CrossRef] [PubMed]
14. Prakash, B.; Kedia, A.; Mishra, P.K.; Dubey, N.K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food Control* **2015**, *47*, 381–391. [CrossRef]
15. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [CrossRef]
16. Parikh, L.; Agindotan, B.O.; Burrows, M.E. Antifungal activity of plant-derived essential oils on pathogens of pulse crops. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 1692–1701. [CrossRef]



17. Paškevičius, A.; Švedienė, J.; Levinskaitė, L.; Repečkienė, J.; Raudonienė, V.; Melvydas, V. The effect of bacteria and essential oils on mycotoxin producers isolated from feed of plant origin. *Vet. Med. Zoot.* **2014**, *65*, 52–60.
18. Xiao, Y.; Liu, Z.; Gu, H.; Yang, F.; Zhang, L.; Yang, L. Improved method to obtain essential oil, asarinin and sesamin from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* using microwave-assisted steam distillation followed by solvent extraction and antifungal activity of essential oil against *Fusarium* spp. *Ind. Crop. Prod.* **2021**, *162*, 113295. [[CrossRef](#)]
19. Krzyśko-Łupicka, T.; Sokół, S.; Piekarska-Stachowiak, A. Evaluation of fungistatic activity of eight selected essential oils on four heterogeneous fusarium isolates obtained from cereal grains in southern Poland. *Molecules* **2020**, *25*, 292. [[CrossRef](#)]
20. Fraternali, D.; Ricci, D.; Epifano, F.; Curini, M. Composition and antifungal activity of two essential oils of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 617–622. [[CrossRef](#)]
21. Ajayi-Moses, O.B.; Ogidi, C.O.; Akinyele, B.J. Bioactivity of Citrus essential oils (CEOs) against microorganisms associated with spoilage of some fruits. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2019**, *6*, 1–15. [[CrossRef](#)]
22. Hanana, M.; Mansour, M.B.; Algabr, M.; Amri, I.; Gargouri, S.; Romane, A.; Jamoussi, B.; Hamrouni, L. Potential use of essential oils from four Tunisian species of Liliaceae: Biological alternative for fungal and weed control. *Rec. Nat. Prod.* **2017**, *11*, 258–269.
23. Al-Mughrabi, K.I.; Coleman, W.K.; Vikram, A.; Poirier, R.; Jayasuriya, K.E. Effectiveness of essential oils and their combinations with aluminum starch octenyl succinate on potato storage pathogens. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2013**, *16*, 23–31. [[CrossRef](#)]
24. Chepkirui, C.; Matasyoh, J.C.; Wagara, I.N.; Nakuvuma, J. Antifungal activity of *Monothotaxis littoralis* essential oil against mycotoxigenic fungi isolated from maize. *Int. J. Microbiol. Res. Rev.* **2013**, *2*, 103–109.
25. Bounar, R.; Krimat, S.; Boureghda, H.; Dob, T. Chemical analyses, antioxidant and antifungal effects of oregano and thyme essential oils alone or in combination against selected *Fusarium* species. *Int. Food Res. J.* **2020**, *27*, 66–77.
26. Hamrouni, L.; Hanana, M.; Amri, I.; Romane, A.E.; Gargouri, S.; Jamoussi, B. Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: Chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Arch. Phytopath. Plant Protec.* **2015**, *48*, 145–158. [[CrossRef](#)]
27. Amri, I.; Gargouri, S.; Hamrouni, L.; Hanana, M.; Fezzani, T.; Jamoussi, B. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *J. Pest Sci.* **2012**, *85*, 199–207. [[CrossRef](#)]
28. Matasyoh, J.C.; Wagara, I.N.; Nakuvuma, J.L.; Chepkorir, R. Chemical composition and antifungal activity of *Piper capense* oil against mycotoxigenic *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2013**, *7*, 1441–1451. [[CrossRef](#)]
29. Ismail, A.; Lamia, H.; Mohsen, H.; Samia, G.; Bassem, J. Chemical composition and antifungal activity of three *Anacardiaceae* species grown in Tunisia. *Sci. Int.* **2013**, *1*, 148–154. [[CrossRef](#)]
30. Saoud, I.; Hamrouni, L.; Gargouri, S.; Amri, I.; Hanana, M.; Fezzan, T.; Bouzid, S.; Jamoussi, B. Chemical composition, weed killer and antifungal activities of Tunisian thyme (*Thymus capitatus* Hoff. et Link.) essential oils. *Acta Aliment.* **2013**, *42*, 417–427. [[CrossRef](#)]
31. Giamperi, L.; Bucchini, A.E.A.; Ricci, D.; Tirillini, B.; Nicoletti, M.; Rakotosaona, R.; Maggi, F. *Vepris macrophylla* (Baker) I. Verd essential oil: An antifungal agent against phytopathogenic fungi. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Mutlu-Ingok, A.; Devecioglu, D.; Dikmetas, D.N.; Karbancioglu-Guler, F.; Capanoglu, E. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules* **2020**, *25*, 4711. [[CrossRef](#)]
33. Ponts, N. Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1234. [[CrossRef](#)]
34. Martins, N.F.; Bresso, E.; Togowa, R.C.; Urban, M.; Antoniw, J.; Maignet, B.; Hammond-Kosack, K. Searching for novel targets to control wheat Head Blight Disease-I-Protein identification, 3D modelling and virtual screening. *Adv. Microbiol.* **2016**, *6*, 811–830. [[CrossRef](#)]
35. Boutigny, A.L.; Barreau, C.; Atanasova-Penichon, V.; Verdal-Bonnin, M.N.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol. Res.* **2009**, *113*, 746–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ponts, N.; Pinsons-Gadais, L.; Boutigny, A.L.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology* **2011**, *101*, 929–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ferrochio, L.; Cendoya, E.; Farnochi, M.C.; Massad, W.; Ramirez, M.L. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 215–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Perczak, A.; Gwiazdowski, D.; Gwiazdowski, R.; Juś, K.; Marchwińska, K.; Waśkiewicz, A. The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. *Pathogens* **2020**, *9*, 23. [[CrossRef](#)]
39. Tefiani, C.; Riazi, A.; Youcefi, F.; Aazza, S.; Gago, C.; Faleiro, M.L.; Megías, C.; Cortés-Giraldo, I.; Vioque, J.; Miguel, M.G. *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *J. Essent. Oil Res.* **2015**, *27*, 131–139. [[CrossRef](#)]
40. Tefiani, C.; Riazi, A.; Belbachir, B.; Lahmar, H.; Aazza, S.; Figueiredo, A.C.; Miguel, M.G. *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. from Algeria: Effect of harvesting place and plant part (leaves and flowers) on the essential oils chemical composition and antioxidant activity. *Open Chem.* **2016**, *14*, 343–350. [[CrossRef](#)]
41. Souhail, N.; Sifaoui, I.; Ben Hassine, D.; Bleton, J.; Bonose, M.; Moussa, F.; Piñero, J.E.; Lorenzo-Morales, J.; Abderrabba, M. *Ammoides pusilla* (Apiaceae) essential oil: Activity against *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Exp. Parasitol.* **2016**, *183*, 99–103. [[CrossRef](#)]



42. Morcia, C.; Malnati, M.; Terzi, V. In Vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Add. Contam. Part A* **2012**, *29*, 415–422. [[CrossRef](#)]
43. Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gao, T.; Zhou, H.; Zhou, W.; Hu, L.; Chen, J.; Shi, Z. The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis. *Molecules* **2016**, *21*, 770. [[CrossRef](#)]
45. Zhang, M.; Ge, J.; Yu, X. Transcriptome analysis reveals the mechanism of fungicidal of thymol against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Cur. Microbiol.* **2018**, *75*, 410–419. [[CrossRef](#)]
46. Shcherbakova, L.; Mikityuk, O.; Arslanova, L.; Stakheev, A.; Erokhin, D.; Zavrie, S.; Dzhavakhiya, V. Studying the ability of thymol to improve fungicidal effects of tebuconazole and difenoconazole against some plant pathogenic fungi in seed or foliar treatments. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ji, H.; Kim, H.; Beuchat, L.R.; Ryu, J.H. Synergistic antimicrobial activities of essential oil vapours against *Penicillium corylophilum* on a laboratory medium and beef jerky. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *29*, 104–110. [[CrossRef](#)]
48. Dambolena, J.S.; López, A.G.; Meriles, J.M.; Rubinstein, H.R.; Zygadlo, J.A. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure–property–activity relationship study. *Food Control.* **2012**, *28*, 163–170. [[CrossRef](#)]
49. Oukhouia, M.; Hamdani, H.; Jabeur, I.; Sennouni, C.; Remmal, A. In Vitro study of anti-Fusarium effect of thymol, carvacrol, eugenol and menthol. *J. Plant. Pathol. Microbiol.* **2017**, *8*, 1000423. [[CrossRef](#)]
50. Turek, C.; Stintzing, F.C. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 40–53. [[CrossRef](#)]
51. Gardiner, D.M.; Kazan, K.; Praud, S.; Torney, F.J.; Rusu, A.; Manners, J.M. Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. *BMC Plant. Biol.* **2010**, *10*, 298–302. [[CrossRef](#)]
52. Gautier, C.; Pinson-Gadais, L.; Verdal-Bonnin, M.N.; Ducos, C.; Tremblay, J.; Chéreau, S.; Atanasova, V.; Richard-Forget, F. Investigating the efficiency of hydroxycinnamic acids to inhibit the production of enniatins by *Fusarium avenaceum* and modulate the expression of enniatins biosynthetic genes. *Toxins* **2020**, *12*, 735. [[CrossRef](#)]
53. Jeribi, C.; Karoui, I.J.; Hassine, D.B.; Abderrabba, M. Comparative study of bioactive compounds and antioxidant activity of *Schinus terebinthifolius* RADDI fruits and leaves essential oils. *Int. J. Sci. Res.* **2014**, *3*, 453–458.
54. Fanelli, F.; Ferracane, R.; Ritieni, A.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 390–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Krzyśko-Łupicka, T.; Walkowiak, W.; Białoń, M. Comparison of the fungistatic activity of selected essential oils relative to *Fusarium graminearum* isolates. *Molecules* **2019**, *24*, 311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





## TUNISIAN THYME ESSENTIAL OIL FOR CONTROLLING ENNIATINS PRODUCING FUSARIUM SPECIES

Yasmine Chakroun<sup>1,2\*</sup>, Vessela Atanasova<sup>1</sup>, Selim Jallouli<sup>3</sup>, Souheib Oueslati<sup>2</sup>, Manef Abderrabba<sup>2</sup>, Jean-Michel Savoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRAE, UR1264 MycSA, CS2032, Villenave d'Ornon 33882, France

<sup>2</sup>IPEST- University of Carthage, Laboratory Molecules, Material and Applications (LMMA), La Marsa, Tunis 2070, Tunisia

<sup>3</sup>Laboratory of Bioactive Substances, Center of Biotechnology of Borj Cédria (CBBC), BP 901, Hammam-Lif 2050, Tunisia

### Abstract

Enniatins are emerging mycotoxins produced by *Fusarium* species. They are frequently found as contaminants in cereal grains in recent years. The synthesis of these secondary metabolites is often a response to biotic and abiotic stresses. Therefore, the introduction of fungicides into the environment of toxigenic fungi can lead to an increase in mycotoxin accumulation. The search for molecules with both antifungal and antimycotoxigenic activities is a challenge to preserve food safety. Essential oils (EOs) have a promising potential as natural fungicides and should be used both to control fungi and/or their mycotoxin production. In the present work, we extracted the essential oil of Tunisian *Thymus capitatus* and tested its effect *in vitro* on two enniatin-producing *Fusarium* strains when placed in contact with the mycelium in solid medium or used as a fumigant. In agar medium, contact tests measured with two different sets of EOs for a strain of *Fusarium avenaceum* provided an  $IC_{50}$  of  $0.05 \mu\text{L EO mL}^{-1}$ . For another strain of *Fusarium* sp. it was found an  $IC_{50}$  of  $0.08 \mu\text{L EO mL}^{-1}$ . Fungistatic activity induced no overproduction of enniatins and in contrast, decreases of 55% were found in some samples. Volatile components diffusing in a sealed container also had fungistatic activity that was both dose ( $5$  to  $25 \mu\text{L L}^{-1}$ ) and time ( $6$  to  $24$  days) dependent. No fungal acclimation to the EOs and no persistent effect of the EOs were observed, but the decrease in protective effect with increasing incubation time was probably due to EOs alterations.

**Keywords:** *Fusarium* head blight, mycotoxins, biocontrol, cereals

### 1. INTRODUCTION

*Fusarium* head blight (FHB), caused by more than 20 different *Fusarium* species, is one of the most widespread worldwide and devastating fungal diseases that results in yield and quality losses of wheat and other small grain cereals [1]. In addition to grain yield and quality reductions, some FHB fungi are also responsible for the contamination of grains with a variety of mycotoxins. Zearalenone (ZEA) and type B trichothecenes, including deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and their acetylated derivatives are mainly produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. In the European Union (EU), ZEA and DON are regulated mycotoxins with maximum levels set in a variety of foodstuffs [2]. Other mycotoxins that are neither routinely monitored nor subjected to a regulation are called emerging mycotoxins [3]. Enniatins (ENNs) are a main group of *Fusarium* emerging mycotoxins produced by various fungal species. Among the ENNs producing *Fusarium* species, *F. avenaceum* and *F. tricinctum* are the most common ones isolated from small grain cereals in Europe and were highlighted as the major contributors of grain contamination with these emerging mycotoxins [4]. ENNs have various biological activities with antibacterial, antifungal, herbicidal and insecticidal [5] which might contribute to their virulence in potato tubers [6]. In the case of wheat, exogenously applied enniatins can cause tissue necrosis, but these mycotoxins did not appear to be a key disease factor in an experiment with genetically modified *F. avenaceum* inactivated in its production of ENNs, but they may enhance disease pressure during interactions inside pathogen complexes [7].

ENNs alter the cellular membrane integrity of mammalian cells and interact synergistically with other mycotoxins, leading to toxicity increases. ENNs are the most widespread emerging mycotoxins, and European cereal crops are frequently contaminated, sometimes at high levels, regardless of the geographical latitude and the associated climatic conditions of their growing area [6]. In the Mediterranean regions of North Africa, populations can be exposed to very high doses of ENNs, with contamination levels in some foodstuffs reaching ten or even hundreds of milligrams per kilogram, and a specific risk in infant foods [8-10]. Therefore, strategies to control the levels of this group of mycotoxins in food and feed have to be developed [4].

Essential oils (EOs) are complex mixtures of volatile compounds biosynthesized by plants, characterized by low molecular weights and bioactivities in the vapors phase that are not remanant and they are generally recognized as safe (GRAS). They are a promising source of active compounds with antifungal and antimycotoxic activities that could replace synthetic fungicides used as protective agents during crop cultivation or storage. EOs of various plants collected in Tunisia were evaluated *in vitro* for their antifungal activity on several phytopathogenic fungi including *F. avenaceum*. The Tunisian plants tested were: *Mentha pulegium*, *Pinus alpeensis*, *Pinus pinea*, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebintus*, *Pistacia vera*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus capitatus* [11-15]. The latter showed the highest extraction yield (1.9 to 3.15 %) of EO and the strongest mycelial growth inhibition effect [13]. However, to the best of our knowledge, antifungal activity of volatile compounds with no contact of the EOs with the mycelium and the effect of EOs on ENNs production by *Fusarium* species have not been studied.

In this work, the antifungal and antimycotoxigenic potential of EOs from aerial parts of *T. capitatus* on two ENNs producing *Fusarium* spp. was evaluated by a) contact in the culture medium and b) fumigation using two different EO batches.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Plant material and isolation of essential oils

Two batches of EO were obtained from plants of different origins. *Thymus capitatus* 1 was collected in March 2016 from the region of Kbouch (36° 10' 56" North, 8° 42' 53" East) situated in the North-Ouest of Tunisia, and air dried [16]; *Thymus capitatus* 2 was bought in a medicinal plant market in Tunisia. The EOs were extracted by hydrodistillation using a classic Clevenger-type apparatus. Anhydrous sodium sulphate was added to the extracted oils to remove residual water. The EOs were stored in the dark at 4°C until their chemical analysis and their use in biological tests. The extraction yield was calculated as the percentage of the weight of oil collected (mg) to the weight of the dry plant processed (g).

#### 2.1.2. Fungal material

A strain of *F. avenaceum* (I496) isolated from maize in France in 2007 was selected from the fungal collection of the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE/MycSA collection). A stock culture maintained at 4°C on potato dextrose agar (PDA) slants under mineral oil was cultivated on PDA medium and kept at 4°C until the run of the different tests. A second strain of *Fusarium* sp (33T) was isolated as a monospore culture from wheat grains harvested in Tunisia in 2018.

All the cultures for the measurements of mycelial growth rates and production of ENNs were realized on FDM-agar, a synthetic medium promoting the production of ENNs by *F. avenaceum* [17]. For the inoculation of the FDM-agar, a preculture was performed on PDA plates at 25 °C in the dark for 4 to 6 days, and the inoculation of the FDM-agar was done either as spore suspensions prepared as described by Gautier *et al* [18] placed at the center of the plate, or plugs of 0.5 cm diameter that were cut and transplanted.



## 2.2. Methods

### 2.2.1. In vitro contact assay of the effect of *T. capitatus* EO

Essential oils were diluted in ethanol and added in the FDM-agar culture medium cooled to 50-55°C (still liquid) after autoclaving, stirred for 5 min and 10 mL were poured into 9 cm diameter Petri dishes. Controls with diluting solvent were prepared. Then, the plates were inoculated at the centre, either with plugs or spore suspensions (10 µL of 10<sup>6</sup> spores ml<sup>-1</sup>). The inoculated plates were incubated at 25°C for 10 days. Photos of the colonised plates were taken and the area covered by the mycelium on the agar medium was measured using Image J software package (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). At the end of the culture, the agar medium with the mycelium of each plate was collected and stored at -20°C for further ENNs analysis.

### 2.2.2. In vitro fumigation assay of the effect of *T. capitatus* EO

Hermetically sealed jars of 1.5 L were used as fumigation chambers. Three Petri dishes containing 10 mL of FDM-agar medium and inoculated at the centre with 10<sup>4</sup> spores in 10 µL of distilled water were placed uncovered in each jar. Treatments with EO volatiles were obtained by placing 1 cm<sup>2</sup> of sterile filter paper soaked with 0, 5, 10, 15 or 25 µL of EO. The jars were incubated at 25°C for 6, 10, 17, 24 days. A second series of experiments was performed using 0 or 25 µL of EO and incubation for 28 days. Further, either spores or 0.5 cm diameter plugs were collected from the 28 day old cultures and used to inoculate FDM-agar Petri dishes placed back into control jars or into jars containing 25 µL of EO. The colonisation of the Petri dishes was followed as mentioned above.

### 2.2.3. Extraction and analysis of enniatins

Ethyl acetate was used as a solvent for ENNs extraction from the entire content of an agar plate. The sliced agar was mixed with 35 mL of the solvent and stirred at 250 rpm for 15 min, filtered through filter paper and 5 mL was dried at 45°C under a nitrogen flow. Quantification of enniatin A (ENN-A), enniatin A1 (ENN-A1), enniatin B (ENN-B) and enniatin B1 (ENN-B1) was performed by LC/DAD as described in [18].

### 2.2.4. Gas Chromatography analysis of *T. capitatus* essential oil

EO composition was investigated by Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis conducted on Agilent 7890 gas chromatograph, coupled to an Agilent 5975C mass spectrometer with electron impact ionization (70 eV). HP-5 column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm) was used. The operating conditions were as follows: the detector temperature, 280 °C; the injector temperature, 210 °C; the oven temperature program varied from 180 °C (1 min) to 200 °C (15 min) then from 220 °C (3 min) to 300 °C (10 min). Carrier gas was H<sub>2</sub> (0.9 mL/min); split ratio of 1:100 and a linear velocity of 36.45 cm/s was used as carrier gas and mass spectral range was recorded from m/z 50-550 amu. The injected volume was 1 µL of 1% EO solution in Hexane (Purity ≥ 97%). The identities of the EO components were established by comparison of their MS spectra with those reported in literature and by computer matching with the Wiley mass spectra library (Eleventh Edition/ NIST 2009).

### 2.2.5. Statistical analysis

IC50 was calculated using linear regression method. Mycelial growth and ENNs concentrations were analysed by ANOVA and Duncan's multiple range tests using SAS Software (Statistical Analysis System, version 9, Cary, NC, USA).

## 3. RESULTS

### 3.1. Extraction yield of EO from *T. capitatus* aerial part and composition.

It was obtained 1.36 g of EO from 100 g of dried aerial part of *T. capitatus* from batch 1 (TC1) and 2.45 g per 100 g of dried aerial part from batch 2 (TC2). The table 1 shows the different compounds found in TC1 and TC2. The chemical profiles of the two batches of EO showed a similar proportion between the different terpene's chemical families. The oxygenated monoterpenes were the major

compounds of both EOs followed by monoterpenes hydrocarbons, sesquiterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes. Furthermore, it was found that both EOs were carvacrol chemotype. Amounts of 83.88% carvacrol were detected in the first batch of TC1, and 82.1% in the second batch. Moreover, p-Cymene was the second major compound present at 6.08% in the first batch and 5.69% in the second batch.

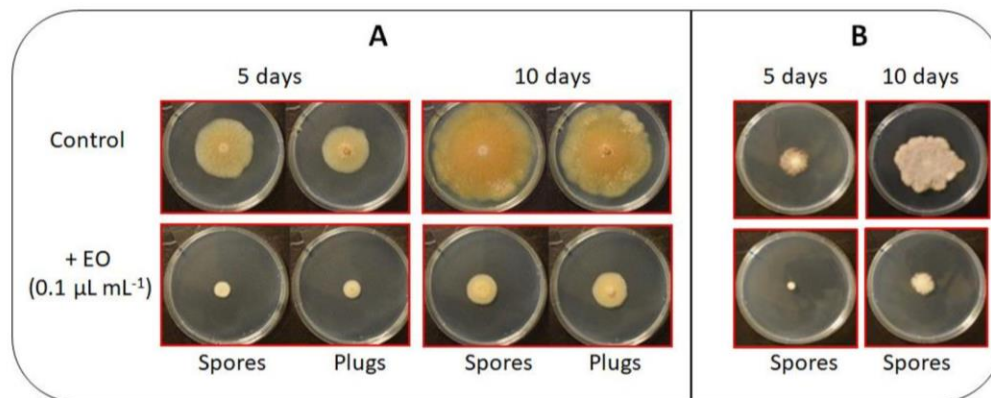
<b>Compounds</b>	<b>Ret Time</b>	<b>Ret index</b>	<b>TC1</b>	<b>TC2</b>
$\alpha$ -thujene	5.687	921	0.35	0.45
$\alpha$ -pinene	5.857	926	0.42	0.46
Camphene	6.202	938	0.16	0.14
$\beta$ -myrcene	7.115	975	0.66	0.84
$\alpha$ -phellandrene	7.494	995	0.08	0.17
3-Carene	7.651	1000	----	0.06
$\alpha$ -terpinene	7.800	1017	0.66	1.07
<b>p-Cymene</b>	8.004	1026	<b>6.08</b>	<b>5.69</b>
d-Limonene	8.116	1029	0.28	0.37
$\gamma$ -terpinene	8.893	1035	1.90	3.33
Trans-Sabinene hydrate	9.142	1037	0.09	0.07
$\alpha$ -Terpinolene	9.695	1064	0.11	0.14
Linalool	9.972	1074	0.89	0.87
Borneol	11.862	1134	0.71	0.52
Terpinen-4-ol	12.167	1148	0.72	0.70
$\alpha$ -terpineol	12.527	1159	0.13	0.14
Thymol (isomer)	15.081	1291	0.13	0.10
Thymol	15.255	1301	0.32	0.42
<b>Carvacrol</b>	15.585	1307	<b>83.88</b>	<b>82.10</b>
Caryophyllene	18.669	1421	1.11	1.51
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	20.889	1500	0.13	0.10
Caryophyllene oxide	22.667	1561	0.84	0.41
<b>Total identified compounds</b>			99.65	99.65
<b>Monoterpenehydrocarbons</b>			10.79	12.78
<b>Oxygenated monoterpene</b>			86.78	84.84
<b>Sesquiterpenehydrocarbons</b>			1.11	1.51
<b>Oxygenated sesquiterpene</b>			0.97	0.52
<b>Extraction yield %(w/w)</b>			1.36	2.45

**Table 1.** Chemical composition (%) of essential oils extracted from two batches of *T. capitatus* (TC1 and TC2) using GC-MS

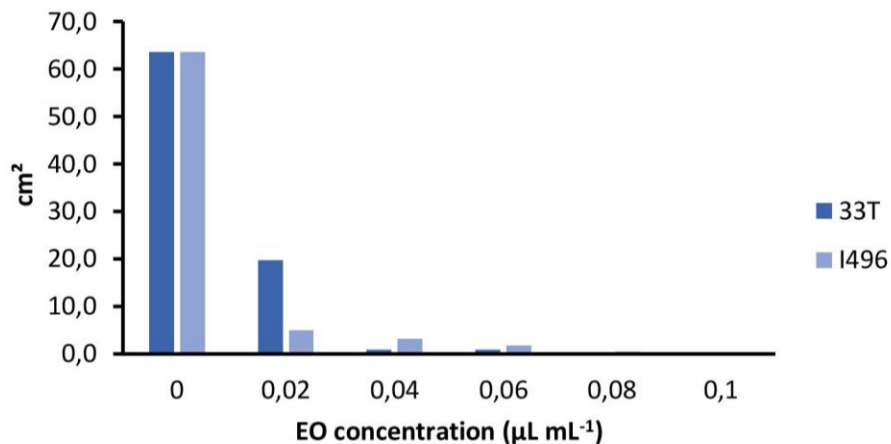
3.2. Inhibition of mycelial growth by EO of *T. capitatus* in the agar medium and effect on the accumulation of ENNs

The EO isolated from aerial parts of *T. capitatus* 1 significantly inhibited (86% inhibition at 10 days) the mycelial growth of *F. avenaceum* I496 in the *in vitro* contact test performed on agar medium containing 0.1  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$  medium, regardless of inoculation (plugs or spore suspensions) (Figure 1). When the experiment was repeated with different EO concentrations in the medium, for TC1, it was observed up to 95% inhibition after 7 days using 0.1  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$  and 100% (no growth) using 0.2  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$ , with the  $\text{IC}_{50}$  estimated to be 0.05  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$ . While with TC2, it was observed 95 and 99 % inhibition achieved at 0.04 and 0.08  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$ , respectively (Figure 2).

For the strain *Fusarium sp* 33T, the inhibition rate reached 79% after 10 days with 0.1  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$  (Figure 1) using TC1 and  $\text{IC}_{50}$  was 0.08  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$ . With TC2, the inhibition rate exhibited by 0.02 and 0.04  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$  was 70 and 98 %, respectively.



**Fig. 1.** Inhibition of the mycelial growth of *F. avenaceum* by EO of *T. capitatus*, batch 1. A- Photographs of Petri dishes, 5 and 10 days after inoculation in the centre with plugs or spore suspensions of *F. avenaceum* I496; B- Photographs of Petri dishes 5 and 10 days after inoculation by spore suspension of *F. sp.* 33T.



**Fig. 2.** Surface of mycelial colonies of two *Fusarium spp* strains on FDM-agar media supplemented with *T. capitatus*, batch 2, measured after incubation for 10 d at 25°C. Means of 3 replicates. 33T = *Fusarium sp.*, I496 = *F. avenaceum*



The ENN-A, ENN-A1, ENN-B, ENN-B1 levels were measured in the agar medium collected at 10 days (inoculation with spores). With TC1 at 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , the accumulation of total ENNs per biomass unit (surface area) of *F. avenaceum* I496 was significantly inhibited by 55% (Table 2) and the final concentration in the Petri dish decreased by 84 %. While no ENN-A nor ENN-A1 were found, the EO affected the distribution between ENN-B and ENN-B1 by increasing the concentration in ENN-B1 (Table 2). It was observed an inhibition rate of 65%, in a replicate in which the level of total ENNs in the control was higher: 2.058  $\text{g cm}^{-2}$ . With TC2 at the concentration of 0.04  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$  affecting the growth rate by 95%, the accumulation of total ENNs was not significantly inhibited (Table 2). It was also observed that *Fusarium* sp. 33T was a better producer of ENNs *in vitro* than *F. avenaceum* I496. This strain produced ENN-A1 in addition to ENN-B and ENN-B1 but no ENN-A, and accumulation of ENNs was also inhibited to 55 % by TC1. However, the effect was not significant and the distribution between ENN-B, ENN-B1 and ENN-A1 was not affected by the treatment. With TC2 at a concentration of 0.04  $\mu\text{L EO mL}^{-1}$ , the growth rate was affected by 99%. Overall, ENNs accumulation per ml of the agar medium was inhibited significantly by 96% compared to the control. However, the results calculated per  $\text{cm}^2$  of the biomass showed no inhibition of the ENNs accumulation.

Batch of EO	Treatment	<i>F. avenaceum</i> I496			<i>Fusarium</i> sp. 33T			
		ENN-B	ENN-B1	Total ENNs	ENN-B	ENN-B1	ENN-A1	Total ENNs
Batch 1	Control	0.676	0.026	0.702 (0.052)	4.912	2.518	0.544	7.974 (3.508)
	0.1 $\mu\text{L EO mL}^{-1}$	0.185	0.130	0.315 (0.081)	2.492	1.149	0.164	3.805 (2.657)
Batch 2	Control	0.028	0	0.028 (0.015)	0.111	0.0869	0.041	0.239 (0.123)
	0.04 $\mu\text{L EO mL}^{-1}$	0.029	0.009	0.039 (0.020)	0.480	0.196	0	0.676 (0.956)

**Table 2.** Concentrations of enniatins (ENNs) released in the medium ( $\mu\text{g}$  per units of mycelial colonies ( $\text{cm}^{-2}$ )), means of triplicates and (standard deviations).

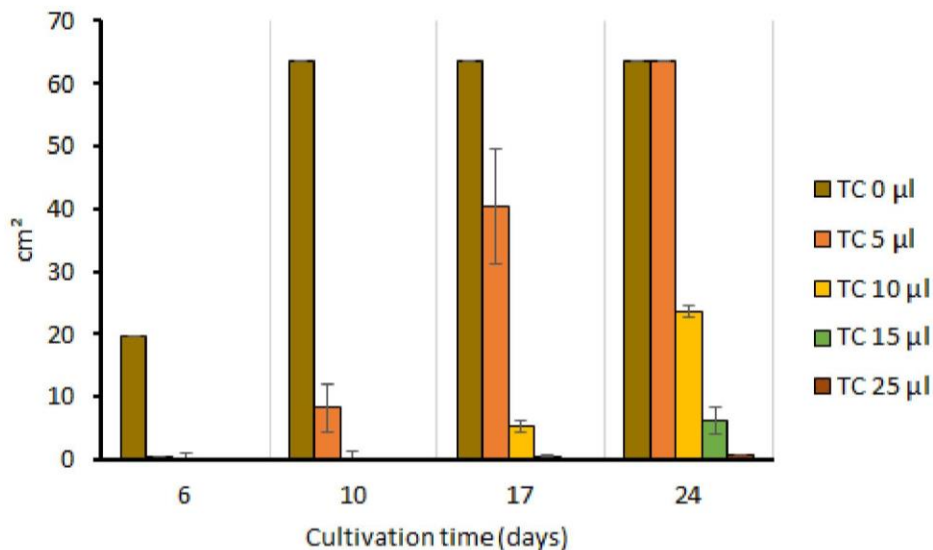
### 3.3. Inhibition of mycelial growth of *F. avenaceum* by volatile components of *T. capitatus* EO

The volatile components of TC2 had a significant inhibitory effect on the mycelial growth of *F. avenaceum* that was dose and time dependant (Figure 3). After 10 days, when the control reached the physical limit of the plate, only the lowest concentration (5  $\mu\text{L EO}$  difusing in 1.5  $\text{L}^{-1}$  air) showed a low myclial growth, reaching the limit of the plate 14 days later. The presence of volatiles compounds from the EO increased the lag phase and slowed down the mycelial growth rate. This is also illustrated with the increasingly higher concentrations. In this experiment, plates were collected at d 10 for the measurement of concentrations of total ENNs. The concentration was 1.34  $\mu\text{g cm}^{-2}$  and 1.02  $\mu\text{g cm}^{-2}$  in the control and the treatment, respectively. The difference corresponding to 24 % of inhibition was significant.

The mycelial growth experiment was replicated with 25  $\mu\text{L EO}$  in 1.5 L jars and an incubation for 28 days. The means of the mycelial surface was 11 (+/- 10)  $\text{cm}^2$ . Spores and plugs were collected from these cultures and used to inoculate FDM-agar plates which were placed either in control jars or in jars with 25  $\mu\text{L EO}$  in 1.5 L. After 10 days of cultures in jars without EO, the mycelia reached the border of the dishes in both treatment and control, regardless of the inoculation method. There was no consequence of previous contacts with EO volatiles. When placed again in presence of the same



concentration of EO, both plugs and spores produced only a very low quantity of mycelium after 28 days (<2.5 cm<sup>2</sup>). The difference with the first exposure to EO volatiles was not significant.



**Fig. 3.** Kinetics of the mycelial growth of *F. avenaceum* on FDM-agar in the presence of volatile components of *T. capitatus* EO (TC2) at different concentrations (0 to 25 µL of EO diffusing in 1.5 L jars). Means +/- standard deviations, 3 replicates.

#### 4. DISCUSSION

*Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns, a Lamiaceae endemic to the Mediterranean region, is used in traditional medicine to treat numerous diseases. With extraction yields above 2 mL per 100 g of dried aerial part obtained in the present work and previous studies [13, 15] *T. capitatus* is an excellent source of EO. Previous works on the effect of *T. capitatus* EO on *F. avenaceum* used *in vitro* contact assays on PDA, inoculation with mycelium plugs and incubation for 7 days at 24°C [13, 15]. Antifungal activities of essential oils of four thymes collected from different localities in Tunisia, ranged for 3 to 52 % inhibition of mycelial growth, with 0.1 µL EO mL<sup>-1</sup> and for 50 to 93 % with 0.4 µL EO mL<sup>-1</sup> [13]. In the present work, 95 to 99 % of inhibition was achieved with two batches of EO at 0.1 µL mL<sup>-1</sup>. This higher effect could be due to differences in the susceptibility of the *F. avenaceum* strain used and in the quality of the EOs. With the other *Fusarium* strain, it was observed lower inhibition rates, but they still were higher than in [13]. Qualitative and quantitative differences with consequences on their biological activity are currently observed between EOs from the same species, depending on the batch of plants used, as observed in the present work.

The EOs of *T. capitatus* from the Maghreb region (Morocco, Algeria, Tunisia, and Libya) are mainly composed of carvacrol, α-pinene, γ-terpinene, thymol, and p-cymene [19]. *Thymus capitatus* is generally a carvacrol chemotype, even if thymol chemotypes were sometime reported [20]. As expected, the *T. capitatus* EO obtained in the present work was carvacrol chemotype in agreement with previous reports on Tunisian *T. capitatus* EO in which 69.15 to 83.86 % of EO components were carvacrol [13, 15].

The antifungal activity of EOs and extracts of *T. capitatus* against many fungal strains has been reviewed [19]. Carvacrol is believed to be responsible for a large part of this activity. The monoterpene reduced by 50 % the incidence of *Fusarium oxysporum* wilt in tomato plants after seed treatment, without causing phytotoxic action, and was shown to have a fungistatic but not fungicidal effect *in vitro* [21]. Carvacrol has been proposed as an environmentally friendly agent to fight seeds' damping-off diseases and as a food preservative. Metabolomic profiling data of *Penicillium digitatum*

revealed that carvacrol-induced oxidative stress and disturbed energy production and amino acid metabolism [22]. It can also induce damage to the RNA molecules and affect the ROS production [23]. However, the antifungal potential depends not only on the main components and their concentrations, but also on compounds present at lower concentrations and their synergistic actions. Considering the antifungal activity observed in the present study, *T. capitatus* EOs of carvacrol chemotype and also containing other compounds (p-cymene,  $\gamma$ -terpinene...) has a great potential for being used to control *F. avenaceum*, a generalist pathogen responsible for diseases in numerous crop species.

*Fusarium avenaceum* is not only a plant pathogen but also a producer of mycotoxins, mainly ENNs. The production of ENNs as well as other mycotoxins, may play a key role in the adaptive response of the fungus to stresses [4]. Therefore, it is important to ensure that any antifungal compound used to control *F. avenaceum* had no significant enhancing effect on ENNs production when applied at doses below the lowest concentration that inhibits 100% of mycelial growth (MIC). In the present work, *in vitro* observations showed that *T. capitatus* EO tended to decrease the level of ENNs accumulation in the culture medium per unit of mycelial biomass (estimated as the surface of the mycelial colony) for two *Fusarium* strains, with different abilities to produce ENNs. Overall, *T. capitatus* EO had a great potential to significantly limit the risk of contamination of crops by ENNs, by acting both as an antifungal and an antimycotoxinogenic treatment.

One of the characteristics of EOs is that they are composed of lipophilic and highly volatile plant secondary metabolites. *Fusarium* species and other phytopathogenic fungi generally grow on plant tissues and not in liquid media. They are permanently in contact with volatile compounds present in their environment and it is worthwhile to check the activity of an EO when used as a fumigant, without a direct contact of the source of volatile components with the mycelium or conidia. The fungistatic activity of volatile components of *T. capitatus* EO was confirmed over a long period of 24 days. The duration of the lag phase before the onset of mycelial growth and the kinetics of mycelial growth depended on the amount of EO. Acclimation of the fungus to the EO and degradation of EO over time were the two possible explanations regarding the data reported in Figure 3. After transplanting of the spores or plugs in new containers with or without fresh EO, there were no differences with the initial culture. The fungus was no longer affected by its previous contact with EO volatiles and continued to be very susceptible to the volatile compounds from the fresh EO. Therefore, it was not the acclimation but the decrease in active components concentrations due to EO degradation that was responsible for the loss of inhibition activity over time. EOs are known to be sensitive to conversion and degradation reactions modulated by temperature, light, and oxygen availability [23]. The protection of EOs against these physico-chemical factors and a gradual release of effective amounts of EO are two main constraints for their use in a biocontrol process. Nanoencapsulation of EOs, with a large surface area per unit volume, would represent a valid and efficient strategy to improve the concentration of EO volatiles in plant areas where the fungi are preferentially located, i.e. in liquid-solid interfaces. Nanoencapsulation of *T. capitatus* EO in chitosan nanoparticles increased its bactericidal activity against foodborne pathogens [24]. The inhibitory concentrations of the biodegradable and biocompatible poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) polymer-based nanocapsules were two to four times lower than those of pure essential oils on a panel of fourteen different fungi belonging to the phyla Ascomycota and Basidiomycota [25]. Another challenge in the use of thyme EOs is their potential cytotoxic nature. However, *T. capitatus* EO was reported to be not cytotoxic [26].

## 5. CONCLUSIONS

The present study showed that *T. capitatus* is a natural source of bioactive substances against *F. avenaceum* and it proved to be an excellent candidate for the development of an alternative solution to synthetic fungicides for the control of the ENNs accumulation in crops. Further researches are needed to assess the *in-planta* activity of *T. capitatus* EO and its potential effect on a broad fungal spectrum. A nanoencapsulation system of the *T. capitatus* EO that could provide a solution to a practical use of this oil as a biofungicide is under study.



## ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the PHC-Utique program, project CMCU 18G0913 / Campus France 39198RKL.

## REFERENCES

1. Ferrigo D, Raiola A, Causin R 2016, 'Fusarium toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management', *Molecules* vol. 21, no. 5., p. 627. <https://doi.org/10.3390/molecules21050627>
2. European Commission (EC) 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal European Union*, L364, pp. 5–24.
3. Gruber-Dorninger C, Novak B, Nagl V, Berthiller F 2017, Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, vol. 65, pp. 7052–7070.
4. Gautier C, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F 2020., *Fusarium* mycotoxins enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 68, pp. 4788-4798.
5. Herrmann M., Zocher R., Haese A. 1996, Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62 no 2, p. 393–398.
6. Prosperini A, Berrada H, Ruiz MJ, Caloni F, Coccini, T, Spicer LJ, Perego MC, Lafranconi AA 2017, Review of the mycotoxin enniatin B. *Frontiers in Public Health* 5, 304. doi: 10.3389/fpubh.2017.00304.
7. Eranthodi A, Schneiderman D, Harris LJ, Witte TE, Sproule A, Hermans ., Overy DP, Chatterton S, Liu J, Li T, González-Peña Fundora D, Zhao W, Foroud NA 2020, Enniatin production influences *Fusarium avenaceum* virulence on potato tubers, but not on durum wheat or peas. *Pathogens*, vol. 9, no. 2, p. 75. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020075>
8. Zinedine A, Meca G, Mañes J, Font G 2011, Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in Morocco. *Food Control*, vol. 22, no. 1, pp. 1–5.
9. Oueslati S, Meca G, Mliki A, Ghorbel A, Mañes J 2011, Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control*, vol. 22, no. 8, pp. 1373-1377.
10. Oueslati S, Berrada H, Mañes J, Juan C 2018. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. *Food Control* vol. 84, pp. 362-369.
11. Amri I, Gargouri S, Hamrouni L, Hanana M, Fezzani T, Jamoussi B 2012, Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, vol. 85, no. 2, pp. 199-207.
12. Ismail A, Lamia H, Mohsen H, Samia G, Bassem J 2013, Chemical composition and antifungal activity of three Anacardiaceae species grown in Tunisia. *Science International*, vol. 1, no. 5, pp. 148-154.
13. Saoud I, Hamrouni L, Gargouri S, Amri I, Hanana M, Fezzani T, Bouzid S, Jamoussi B 2013, Chemical composition, weed killer and antifungal activities of Tunisian thyme (*Thymus capitatus* Hoff. et Link.) essential oils. *Acta Alimentaria*, vol. 42, no. 3, pp. 417-427.

14. Hamrouni L, Hanana M, Amri I, Romane AE, Gargouri S, Jamoussi B 2015, Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 48, no. 2, pp. 145-158.
15. Hanana M, Mansour MB, Algabr M, Amri I, Gargour S, Romane AE, Jamoussi B, Hamrouni L 2017, Potential use of essential oils from four Tunisian species of Lamiaceae: Biological alternative for fungal and weed control. *Records of Natural Product*, vol. 11, no. 3, pp. 258-269.
16. Abessi M, Bachrouch O, Mediouni J, Haouel Hamdi S, Abderrabba M 2018, Comparative insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. and *Thymus capitatus* Hoff. & Link. essential oils against the red flour beetle: *Tribolium Castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae), *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 10, no 10, pp. 32-39.
17. Fanelli F, Ferracane R, Ritieni A, Logrieco AF, Mulé G 2014, Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116, pp. 390–399.
18. Gautier C, Pinson-Gadais L, Verdal-Bonnin MN, Ducos C, Tremblay J, Chéreau S, Atanasova V, Richard-Forget F 2020, Investigating the efficiency of hydroxycinnamic acids to inhibit the production of enniatins by *Fusarium avenaceum* and modulate the expression of enniatins biosynthetic genes. *Toxins*, vol. 12, no. 12, p. 735. DOI:10.3390/toxins12120735
19. Bouyahya A, Chamkhi I, Guaouguaou FE, Benali T, Balahbib A, El Omari N, Taha D, Belmehdi O, Ghokhan Z, El Menyiy N 2020, Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 259, p. 112925. doi: 10.1016/j.jep.2020.112925.
20. Goudjil MB, Zighmi S, Hamada D, Mahcene Z, BencheikhSE, Ladjel S 2020, Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, vol. 128, pp. 274-282.
21. Saghrouchni H, El Barnossi A, Salamatullah AM, Bourhia M, Alzahrani A, Alkaltham M.S., Alyahya HK, Tahiri NEH, Imtara H, Var, I. (2021). Carvacrol: A promising environmentally friendly agent to fight seeds damping-off diseases induced by fungal species. *Agronomy*, vol. 11, no. 5, p. 985. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050985>
22. Wan CP, Shen YT, Muhammad FN., Qi WW, Chen CY, Chen JY 2019, The antifungal potential of carvacrol against *Penicillium digitatum* through 1H-NMR based metabolomics approach. *Applied Sciences*, vol. 9, no. 11, p. 2240. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105487>
23. Gonçalves DC, de Queiroz VT, Costa AV, Lima WP, Belan LL, Moraes WB., Lopes Pontes PóvoaIori N., Cardoso H., Póvoa HCC 2021, Reduction of Fusarium wilt symptoms in tomato seedlings following seed treatment with *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Crop Protection*, vol. 141, p. 105487. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105487>
24. Turek C, Stintzing FC 2013, Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 12, no. 1, pp. 40-53.
25. Kapustová M, Granata G, Napoli E, Puškárová A, Bučková M, Pangallo D, Geraci C 2021, Nanoencapsulated essential oils with enhanced antifungal activity for potential application on agri-food, material and environmental fields. *Antibiotics*, vol. 10, no 1, p. 31. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010031>
26. Zaïri A, Nour S, Zarrouk A, Haddad H, Khélifa A, Achour L, Tangy F, Chaouachi M, Trabelsi M 2019, Chemical composition, fatty acids profile and biological properties of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns, essential oil. *Scientific Reports*, vol. 9, p. 20134. DOI: 10.1038/s41598-019-56580-y.

## IV. Synthèse

Les résultats du screening des huit huiles essentielles choisies sur la souche *F.av* I496 (chapitre 2.2) et *F.ac* 33T (chapitre 1.2) démontrent que l'huile essentielle d'*Ammoides pusilla* et celle de *Thymus capitatus* ont une activité antifongique plus importante en comparaison avec les autres huiles essentielles testées sur les deux souches. Le dosage des enniatines produites a révélé que toutes les huiles essentielles ont inhibé la production des enniatines par *F.av* I496, à des degrés différents cependant les résultats de la souches *F.ac* 33T, qui produit de plus grandes quantités d'enniatines, montrent que seules les huiles essentielles d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* ont réduit significativement cette production. A partir de ce résultat, nous avons sélectionné les huiles essentielles d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* pour étudier d'avantage leur action antifongique et leur capacité à moduler la production des enniatines.

La caractérisation du profil chimique des huiles essentielles sélectionnées a révélé que le composant majoritaire du *T. capitatus* est le carvacrol à plus de 80% et le thymol à plus de 50% pour l'*A. pusilla*. Ces deux composés terpéniques ont été largement documentés pour leur activité antifongique, leur pouvoir antioxydant et leur action sur la fragilisation de la membrane cellulaire fongique (Šegvić Klarić et al., 2007; Dambolena et al., 2008; Mechergui et al., 2010; Morcia et al., 2011; Janatova et al., 2015; Oliveira et al., 2020). Une application d'une gamme de concentrations des deux huiles en dilution dans l'agar a montré que l'inhibition de la croissance fongique et de la production des enniatines des deux souches par l'huile essentielles d'*A.pusilla* est significativement dose dépendante. L'inhibition de la production des enniatines par l'huile essentielles de *T. capitatus* a varié en fonction des concentrations : à des concentrations faibles une stimulation de la production des enniatines a été observée. Ce comportement a été précédemment décrit comme étant un mécanisme de défense chez certaines espèces fongiques dans des conditions de stress. Les analyses de l'activité des composés volatiles des deux huiles essentielles sur la souche *F.av* I496 a révélé une action antifongique prolongée dans le temps (jusqu'à 24 jours de cultures), néanmoins cette activité est fongistatique (le prolongement de la phase de latence dépend des quantités d'huiles essentielles utilisées). L'inhibition de la production des enniatines a été significative et a été maintenue sur la durée de la culture. L'évaluation de l'effet des huiles essentielles d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* sur la sporulation et la germination de *F.av* I496 a révélé une inhibition significative de la germination des spores dans les deux cas.

La reprise de la croissance fongique de *F.av* I496 au cours de l'expérimentation en fumigation des deux huiles essentielles nous a permis de poser deux hypothèses : (1) le champignon se serait adapté à son environnement et a développé des moyens de résistance à l'action des composés volatiles de l'huile essentielle, (2) les composés actifs des huiles essentielles, étant exposés à l'oxydation auraient perdu leurs caractéristiques antifongiques. Dans le but de répondre aux hypothèses posées, une seconde exposition aux mêmes traitements a été conduite. Le résultat révèle que *F.av* I496 a été aussi sensible à l'action des huiles essentielles testées. Ces résultats nous ont permis d'avancer que les composés volatiles des huiles essentielles se dégradent dans le temps, induisant en conséquence la perte progressive de l'activité antifongique des huiles essentielles.

Afin de comprendre d'avantage l'activité de l'huile essentielle d'*A. pusilla*, les mêmes expérimentations ont été conduites en utilisant le thymol (composé majoritaire de l'huile essentielle). Les résultats obtenus démontrent que le thymol inhibe significativement la croissance fongique de *F.av* I496 dans les deux méthodes de tests (dilution dans l'agar et en fumigation). Cette inhibition se révèle dose dépendante dans les deux cas. Les résultats des dosages des enniatines ont démontré que le thymol ne serait pas le responsable de l'activité d'inhibition de la production de ces mycotoxines de la part de *F.av* I496. L'activité antifongique et antimycotoxines de l'huile essentielle d'*A. pusilla* serait régie par les interactions entre les différents composés de l'huiles et non seulement par les caractéristiques de son composé majoritaire.





# *Chapitre III*



## **Chapitre III : Nanoencapsulation de l'huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Thymus capitatus***

### **I. Introduction**

Dans ce troisième chapitre, nous décrivons la nanoencapsulation des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Thymus capitatus* dans des nanoparticules de silice mésoporeuse (MSNPs) et des nanoparticules de silice mésoporeuse enrobées d'une fine couche de chitosane.

*Les résultats de ce chapitre sont rédigés sous la forme d'un article scientifique qui sera prochainement soumis, après acquisition de données complémentaires sur la caractérisation des nanoparticules.*

## II. « Mesoporous silica nanoparticles for the encapsulation of essential oils and improvement of their activity against *Fusarium avenaceum* and its production of mycotoxins ; enniatins ».

Yasmine Chakroun<sup>1,2\*</sup>, Youssef Snoussi<sup>2</sup>, Mohamed Chehimi<sup>3</sup>, Souheib Oueslati<sup>2</sup>, Manef Abderrabba<sup>2</sup>, Jean-Michel Savoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRAE, UR1264 MycSA, CS2032, Villenave d'Ornon 33882, France

<sup>2</sup>IPEST- University of Carthage, Laboratoire Molecules, Material and Applications (LMMA), La Marsa, Tunis 2070, Tunisia

<sup>3</sup>CNRS, UMR 7182 ICMPE, 2-8 Rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

\* Correspondence : jean-michel.savoie@inrae.fr; Tel.: +33-557-122-496

### Abstract

Essential oils have been investigated for their antifungal activity and mycotoxins reduction ability in order to develop a bioactive alternative environment friendly treatment for fungal diseases. However, due to their chemical nature, the practical use of essential oils faces multiples limitations such as their high volatility and sensitivity to UV and oxidation. Nanoencapsulation techniques are supposed to provide protection to the essential oil and control its release in the environment. *Ammoides pusilla* (AP) and *Thymus capitatus* (TC) essential oils (EOs) are selected for this work against *Fusarium avenaceum*; an enniatin producing *Fusarium* species. *Ammoides pusilla* (AP) and *Thymus capitatus* (TC) essential oils (EOs) were encapsulated following the impregnation method in mesoporous silica nanoparticles (MSNPs) with narrow slit pores (average pore diameter = 3.1 nm) and a specific surface area of 486.975 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. The loading efficiency were 42% for AP EO and 70% for TC EO. The encapsulation in MSNPs decreased the release speed of both essential oils at 25 °C by 3 to 4 days. The antifungal activity against *Fusarium avenaceum* of free AP EO and AP EO encapsulated in MSNPs and their inhibition abilities of the accumulation of enniatins were evaluated *in vitro*. In contact assays in an agar medium, the antifungal activity of AP EO at

0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  was improved 3 times by encapsulation in MSNPs and significantly inhibited the production of enniatins. Controls of MSNPs also inhibited the production of enniatins without affecting the mycelial growth. In fumigation assays of the activity of EO volatiles, encapsulation of the EO in MSNPs also improved significantly the antifungal activity and enniatins production inhibition. Therefore, this study revealed that encapsulation of EO in MSNPs can be used as promising natural fungicide in agriculture and food industry for protecting plant products against the contamination by enniatins.

## 1. Introduction

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by members of several fungal genera. These metabolites accumulate in food and feed causing massive losses and endanger the health of humans and domesticated animals. This issue affects specifically cereals and maize productions for which high-quality grain is a critical component to global food security (Leslie et al., 2021). *Fusarium* species are responsible of the production of various types of mycotoxins in cereals and maize, causing serious health damage. Species like *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum* and *F. verticillioides* produce the main mycotoxin contaminations that are with type B trichothecene like deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives 3 and 15 ADON, zearalenone and fumonisins in maize. These *Fusarium* species are also agents of the *Fusarium* Head Blight (FHB), an ear disease of particular concern due to the losses it causes in addition to the mycotoxins they produce. The species predominantly found associated with FHB in the Mediterranean region are *F. graminearum*, *F. culmorum*, and *F. avenaceum* (Logrieco et al., 2003). The latter is a member of the *Fusarium tricinctum* complex, as well as *F. tricinctum* and *F. acuminatum* that are less frequent or encountered sporadically in the Mediterranean region and are not regarded as strong pathogenic for cereal ears but can cause damping-off (Mergoum et al., 1998). They cause root and stem rot in cereals and various host species and there is an increasing incidence of these species in many cultivation areas across the world (Esmaeili Taheri et al., 2017; Karlsson et al., 2021; Ederli et al., 2021). They produce emergent mycotoxins: enniatines (ENNs), fusaproliferin, beauvericin, and moniliformin (Munkvold et al., 2021). ENNs, mainly enniatin B (ENB), are common grain contaminants worldwide, and reports of their frequent occurrences in human urine indicate a high incidence of human exposure (Prosperini et al., 2017). These cyclodepsipeptide mycotoxins cause



mitochondrial dysfunction, lysosomal alteration, cell cycle disruption, and lipid peroxidation. Besides its primary mechanism of action due to its ionophoric characteristics, ENB involves oxidative stress and exerts cytotoxic activities (Prosperini et al., 2017). It contributes to the phytopathogenicity of *F. avenaceum* and its competition with other *Fusarium* species.

Besides global actions for mycotoxin management in small grains and other crops that include the use of synthetic fungicides which cannot stop severe attacks (Leslie et al., 2021), ecofriendly solutions are investigated to limit mycotoxin contaminations. One of the promising areas of study is the use of essential oils (EOs). These secondary metabolites produced by various aromatic plants have been widely studied for their antifungal activity and for their impact on production of trichotecens B (Kalagatur et al., 2018; Matusinsky et al., 2015; Perczak, 2019; Velluti et al., 2004) but to a lesser extend for their effect for controlling the production of enniatins and the producing *Fusarium* species (Chakroun et al., 2021a). *Thymus capitatus* and *Ammoides pusilla* essential oils were investigated in our previous work for their bioactivity against *F. acuminatum* and *F. avenaceum*. They exerted significant inhibition activities of the mycelial growth and enniatins production by both species (Chakroun et al., 2021a, 2021b).

EOs are ecofriendly, biodegradable, volatile and active in low dosages (Prakash et al., 2015). However, in spite of their proven preservative potential, the application of EOs and their bioactive constituents in real food system remains a challenging task due to major drawbacks such as intrinsic volatility, poor solubility in aqueous system, and chemical instability against abiotic factors such as light, heat and moisture (Chaudhari et al., 2021; Tisserand and Young, 2014). The development of alternatives to synthetic fungicide treatments using EOs relies on the stabilization of the essential oil, its protection and its release control. Nanoencapsulation is one of the most promising candidates to achieve these objectives (Horky et al., 2018). In fact, nanoencapsulation technique involves synthesis, characterization, and application of nano-sized delivery systems with at least one dimension lesser than 100 nm. Nanoencapsulation also exhibits the advantages of providing a large surface-to-volume area, mass transfer behavior and precise release kinetics of EOs and their bioactive constituents to the target food system. A wide range of materials can be used in nanoformulation depending on the aim of its use (Chaudhari et al., 2021). Mesoporous silica nanoparticles (MSNPs) have been studied for the EO encapsulation (Balaure et al., 2017). The nanoparticles provide a high surface volume ratio, is biocompatible and can be functionalized

with a variety of moieties in different regions of the particle. The introduction of functional groups makes MSNPs highly versatile and enables them to perform specialized tasks (Slowing et al., 2010; Janatova et al., 2015; Bernardos et al., 2015; Ebadollahi et al., 2017; Sattary et al., 2020). In another hand, the surface of the MSNPs increases the solubility of the EO in water by reducing its hydrophobicity, allowing the EOs to penetrate the fungal cells, causing loss of membrane integrity, and destroying fungal cells (Sattary et al., 2020).

Chitosan encapsulation have been also widely investigated. It has been considered as one of the most gifted wall materials for the nanoencapsulation of EOs/bioactive constituents due to their characteristic attributes like abundance, biocompatibility, hydrophilicity, biodegradability, non-toxicity (GRAS status), excellent film, gel and particle forming properties coupled with exceptional antifungal activity (Hasheminejad et al., 2019; Valencia Junca et al., 2019; Zachetti et al., 2019; Sattary et al., 2020; Das et al., 2021; Chaudhari et al., 2021).

In this work, we focused on *T. capitatus* and *A. pusilla* EOs and improvement of their antifungal and enniatin inhibition activities against *F. avenaceum* by their encapsulation in mesoporous silica nanoparticles and coating the resulting products with a chitosan layer. With loading efficiency of 42% for *A. pusilla* EO and 70% for *T. capitatus* EO, encapsulation improved the antifungal efficiency of the EOs, and preserved their inhibition activities on enniatin production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mesoporous silica nanoparticles synthesis

MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41) has a hexagonal array of uniform pores and channels and it belongs to a family of mesoporous materials known as M41S (Kresge, 1992). MCM-41 silica nanoparticles was synthesized using tetraethyl orthosilicate TEOS ( $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$ ) as precursor in acidic environment based on the sol-gel method. A mixture was prepared using 16 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ , 20 mL of hydrochloric acid (HCl), 0.2 g of CTAB as surfactant, 10 mL of absolute ethanol (EtOH), 1.2 g of P123 and stirred at 40°C for 45 min. 4 mL of TEOS was added and stirred at 40°C for 45 min. The resulted solution was heated at 70°C for 16 h. A white suspension was formed. To collect the resulted powder, a decantation using a Soxhlet apparatus using ethanol as solvent for 48h was performed. The resulting powder leading to the MSNPs was dried overnight at 70°C.

### 2.2. N<sub>2</sub> physisorption measurements at 77K

The textural and morphological properties of the synthesized MSNPs were carried out at 77K using Belsorp-MAX (Japan bel Co, Ltd., Japan). It is worth noting that prior the N<sub>2</sub> physisorption measurements, the powdered sample was degassed at 100°C for 3h in order to eliminate the adsorbed species remaining in the porous network. The specific surface area (SSA) was determined by Brunauer-Emmett-Teller (BET) method and the pore size distribution (PSD) was evaluated by Barrett-Jorner-Halenda (BJH) method.

### 2.3. Thermogravimetric analysis (TGA)

TG analyses of both bare and EO loaded MSNPs were conducted using Setaram instrument (set sys evolution 16 model). Practically, the powders were heated up from room temperature to 800°C at a linear heating rate of 10°C/min under air.

### 2.4. Essential oil encapsulation and chitosan coating

Two essential oils were used, *Ammoides pusilla* (AP) EO and *Thymus capitatus* (TC) EO, obtained as in (Chakroun et al., 2021a, 2021b). The impregnation method was used for essential oil loading in MSNPs. 200 µL of essential oil was diluted in 400 µL of hydroalcoholic solution (70/30 EtOH/H<sub>2</sub>O). The EO solution was added drop by drop to 200 mg of MSNPs. The solvent was evaporated at room temperature and the loaded nanoparticles were collected.

200 mg of chitosan was dissolved in 50 mL of solution of acetic acid (10%). 200 mg of collected loaded nanoparticles were added to 40 mL of the chitosan solution and stirred for 36h at ambient temperature. The resulted product was collected after 2 cycles of centrifugation/rinsing. The powder of MSNPs-Chi was obtained after evaporation at ambient temperature.

### 2.5. In vitro release of EO in liquid and evaporation

The evaporation of essential oils from the loaded MSNPs was monitored using weight losses of 12.5 µL of EO or of 20 to 24 µg of EO loaded MSNPs placed at room temperature in small tared weighing dishes. The weights were recorded daily for 9 days. The mean of room temperature was 25.2°C with a maximum at 28.5 °C and a minimum at 23.0 °C. Controls containing non-loaded MSMPs were used for measuring variations in weights due to the changes in air relative humidity and correct the measured values of EO loaded MSNPs by these absorption/release factors. The mean of relative humidity throughout the incubation was 62 % with a maximum at 72 % and a minimum at 54 %

The loaded essential oil percentage (LE%) was calculated using the following equation:

$$\text{LE\%} = (\text{Mass of loaded EO}) / (\text{Mass of loaded nanoparticles}) \times 100$$

To measure the release of the essential oils from the MSNPs, a dialysis method was used as in Qiu et al. (2017) with modifications. 12.5  $\mu\text{L}$  of essential oil or 25 mg of loaded MSNPs or 25 mg of chitosan/ loaded MSNPs were dispersed in 4 mL of PBS buffer (pH 7.6), and loaded in dialysis tubing cellulose membranes closed at both ends. The dialysis bags were placed in 45 mL of PBS containing 20% EtOH and stirred mildly at 25°C. Samples of 3 mL of the solution were collected at definite time intervals and replaced by 3 mL of the PBS buffer + EtOH solution. The concentrations of HE components released through the membranes were estimated by changes in absorbance at 275 nm measured in the collected medium using a UV/Vis spectrophotometer. Since at each sampling time 6 % (3 mL / 45 mL) of the released EOs were removed in the external compartment, a dilution factor of 6 % was introduced with the addition of fresh PBS/EtOH solution, a correction factor was applied to the absorbances as follows:

$$A(n) = A / 0.933 + (A(n-1) * 0.067)$$

A(n) is the corrected Absorbance value at the sampling time n, A is the measured Absorbance, A(n-1) is the corrected absorbance measured at the previous sampling time.

#### 2.6. Antifungal activity against *Fusarium avenacum*

The evaluation of the antifungal and antimycotoxigenic activity of *A. pusilla* essential oil and its nanoproductions was performed both by contact assays using the agar dilution method and fumigation assays.

FDM-agar medium contained the following per liter of distilled water: 12.5 g of glucose, 4.25 g of  $\text{NaNO}_3$ , 5 g of  $\text{NaCl}$ , 2.5 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.36 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01 g of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0029 g of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and 15 g of agar. For the contact assays, FDM-Agar medium was cooled at 50°C after sterilization. Solutions of AP EO in EtOH were prepared and added in sterile conditions with constant stirring to obtain a final concentration as following: 0, 0.05, 0.075 and 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  in 2% of EtOH. The loaded nanoparticles and the chitosan nanoparticles were diluted in the FDM-agar medium before pouring to obtain final concentrations of 0, 0.1, 0.15 and 0.2  $\text{mg mL}^{-1}$ . 10 mL of the supplemented culture media and control without supplementation were poured in 90 mm

Petri dishes. Six Petri dishes were prepared for each treatment and inoculated in one point with 10  $\mu\text{L}$  of spore suspension of *F. avenaceum* ( $10^6$  spores per mL). Each set of treatment was incubated in different hermetically closed jars at 25 °C for 10 days. Straight linear regression equations defining the relationship between the decimal logarithms of EO concentrations and the growth index or the mycelial area at the end of the experiment (10 days) were used to calculate the IC50. On day 10, the plates were conserved at -20 °C until their use for ENNs analysis.

The evaluation of the effect of the volatile compounds of *A. pusilla* EO and its nanoproductions was performed in fumigation assays. Two perpendicular length scales were marked on each 90 mm Petri dishes in which 10 mL of FDM-agar medium were poured. After the medium solidification, 10  $\mu\text{L}$  of *F. avenaceum* spore suspension ( $10^6$  spores per mL) was inoculated at one point in the center of the dishes. The required amounts of *A. pusilla* EO and its nanoproductions were added into 1 cm<sup>2</sup> of sterile filter paper put in the center of open 55-mm Petri dishes (AP EO amounts: 0, 5, 7.5 and 10  $\mu\text{L}$  / Nanoproductions amounts: 0, 10, 15 and 20 mg). For each treatment, three inoculated Petri dishes without lids and the respective amount of the tested product were put in a hermetically closed jar. The jars were incubated horizontally at 25 °C for 10 or 24 days. The mycelial growth was evaluated at 10 and 24 d of incubation thanks to the length rules without destruction of the dishes nor disturbing the incubation in jars. The mycotoxins were extracted after incubation for 10 and 24 days.

### 2.7. Enniatines quantification

The content of a Petri dish (agar medium plus mycelium) was placed in 35 mL of ethyl acetate (VWR, Fontenay-Sous-Bois, France) for 15 min at room temperature with rotating end-over at 250 rpm. After filtration on n°4 Whatman filter paper, 5 mL were evaporated to dryness at 45°C under nitrogen flow. The dried samples were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of methanol/water (1:1, v/v) and filtered on 0.2  $\mu\text{m}$  filters before analysis. Quantification of ENNs was performed on a Shimadzu Prominence UPLC chain, equipped with two pumps LC-30 AD, a degasser DGU-20A5R, an auto sampler SIL-30 AC and a DAD detector SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, Noisiel, France). Separation of 5  $\mu\text{L}$  of extract was achieved on a Kinetex 2,6U XB-C18—100 Å column (150 x 4.6 mm; 2.6  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Le Pecq, France) maintained at 45 °C. An elution gradient of acetonitrile in water was used with a constant flow at 1.4 mL min<sup>-1</sup>: 30% acetonitrile for 2.5

min, 30–99% acetonitrile in 5 min, 99% acetonitrile for 3.5 min, and 2.5 min post-run equilibration with 30% acetonitrile. LC-grade methanol and acetonitrile were purchased from VWR (Fontenay-Sous-Bois, France). Absorbance spectra were recorded from 190 to 450 nm and peak areas were measured at 205 nm. External calibration with standard solutions of A, A1, B and B1 enniatins (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), allowed quantifications between 1 and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The limit of quantification was 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### *2.8. Statistical analyses*

Mycelial growth and ENNs concentrations were analyzed by ANOVA and Duncan's multiple range tests using SAS Software (Statistical Analysis System, version 9, Cary, NC, USA). Differences were considered at a significance level of 95% ( $P < 0.05$ ).

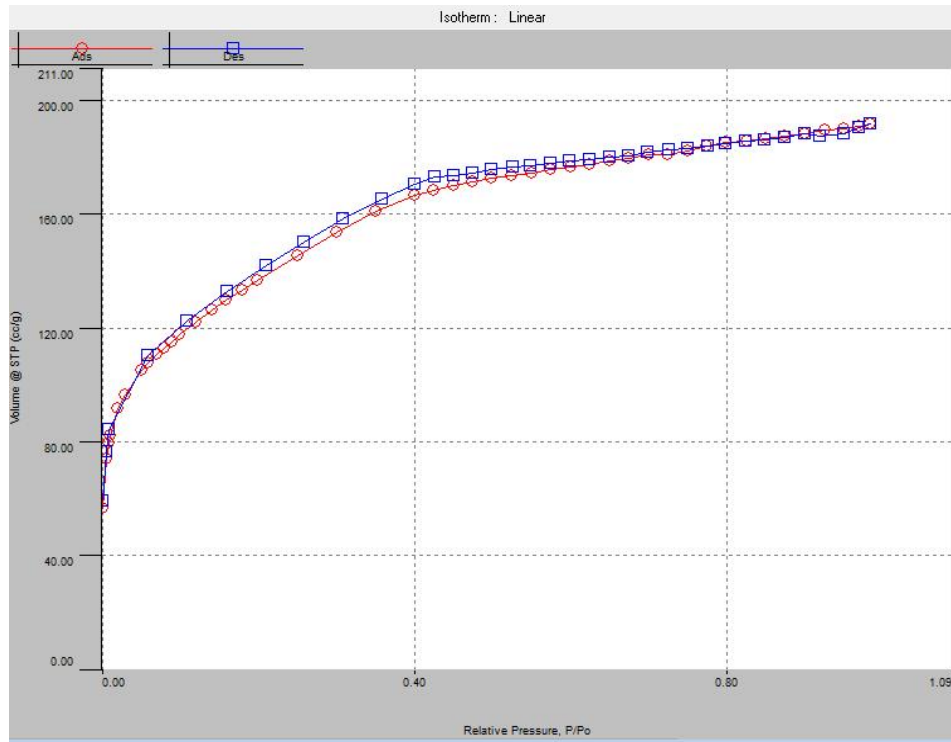
## **3. Results**

### *3.1. Mesoporous silica nanoparticles characterization*

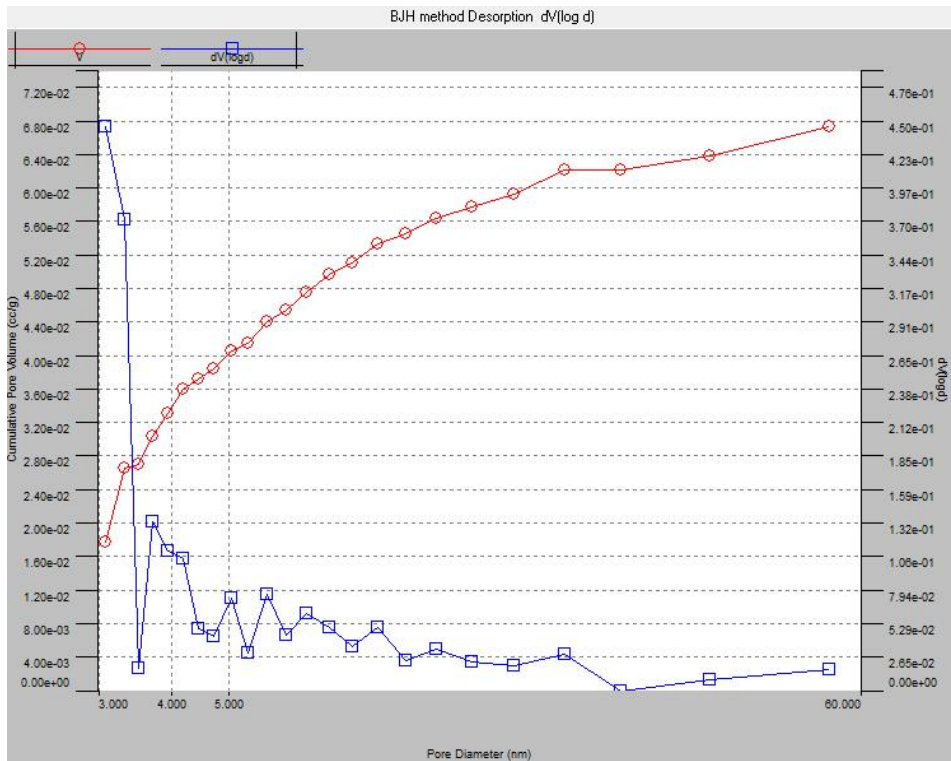
According to the IUPAC classification, the nitrogen adsorption-desorption isotherm of the MSNPs in figure 1 is of the type IV and high hysteresis loop is of the type H<sub>4</sub> which suggest that the powder had a mesoporous structure with narrow slit pores (Sing et al., 1985). The PSD of MSNPs indicated a narrow multimodal distribution with an average pore diameter of 3.1 nm. The value of Specific surface area (SSA) evaluated by the BET method was 486.975  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ .



**A**

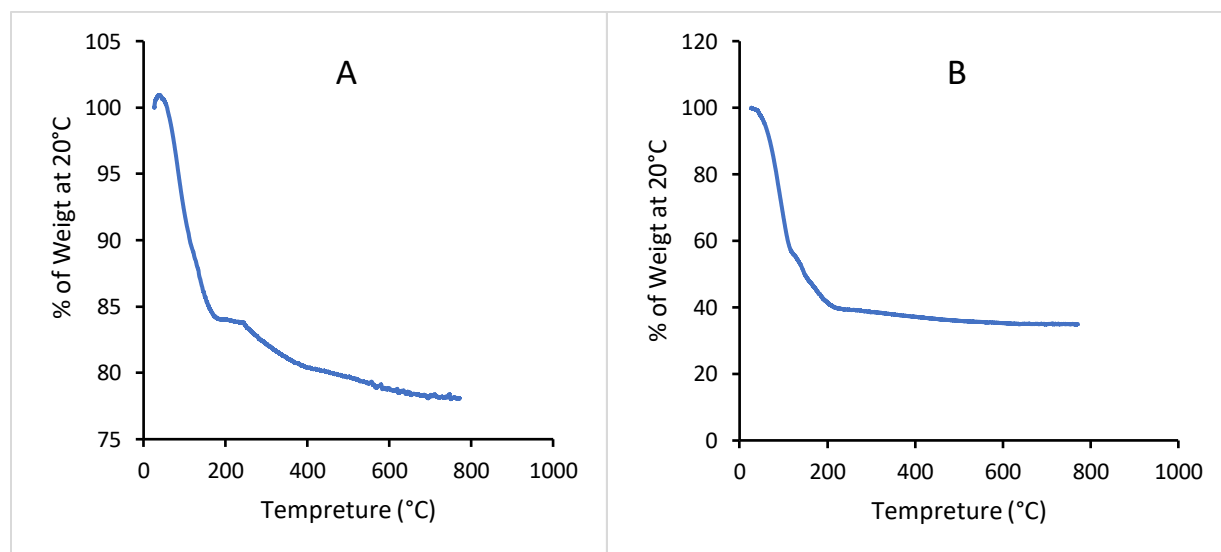


**B**



**Figure 1:** Nitrogen adsorption-desorption isotherms (A) and pore size distribution (B) of empty mesoporous silica nanoparticles

As shown in figure 2, the thermogravimetric curve of the bare MSNPs exhibited a first weight loss at 100°C corresponding most likely to the loss of physisorbed water and carbon dioxide. The other weight losses registered between 100 - 400°C could be assigned to the thermal decomposition of surfactants (CTAB, P123) resisting to the washing step and the organic compounds remaining into the porous structure. The thermal analysis of the AP-EO loaded MSNPs revealed a more important total weight loss (around 65%) compared to 20% with the bare mesoporous silica. The difference is essentially due to the loss of the loaded oil emulsion (roughly calculated, 45%). The important losses at 100 and 200°C could be explained by the volatile nature of the essential oil.



**Figure 2:** Thermogravimetric analysis (TGA) of (A) empty mesoporous silica nanoparticles, (B) mesoporous silica nanoparticles loaded with AP EO.

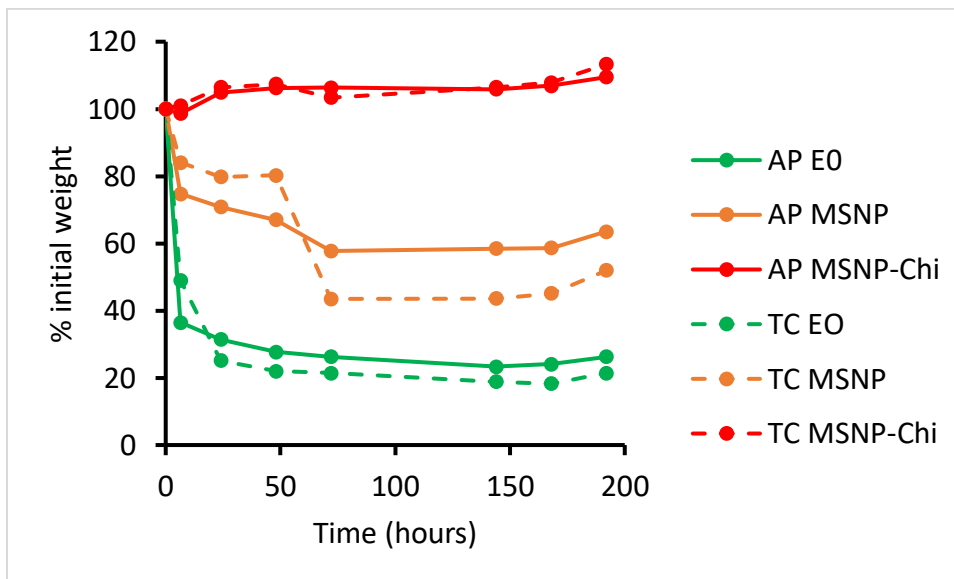
### 3.2. Nanoencapsulation efficiency and EO release

The evaporation of the non-encapsulated essential oils was observed mostly on the first 24 hours of the experiment (68.6% loss for the AP EO and 74.8% for TC EO) (Figure 3). The evaporation continued progressively up to 144 hours and the total evaporation was 76.6% for AP EO and 81.1% for TC EO. No further evaporation was measured. The residual masses could be explained by the presence of EO components with an evaporation temperature value higher than 25°C and nonvolatile components.

EO loaded MSNPs released the essential oils more progressively for 72 hours. Indeed, the AP EO MSNPs weight reduced by 29.2% during the first 24 hours and by 20.2% for the TC EO MSNPs.

The weight decrease of these nanoparticles continues progressively up to 72 hours reaching weight losses of 41.5% and 56.3% for the AP and TC loaded nanoparticles respectively. The residual mass is equivalent to the sum of essential oil components and the MSNPs' weights. LE% was estimated to 42.2% for AP EO and 69.9% for TC EO.

The weight evolution of the EO loaded MSNPs that were coated with chitosan did not present a significant variation in both cases, no significant quantity of EO was released.

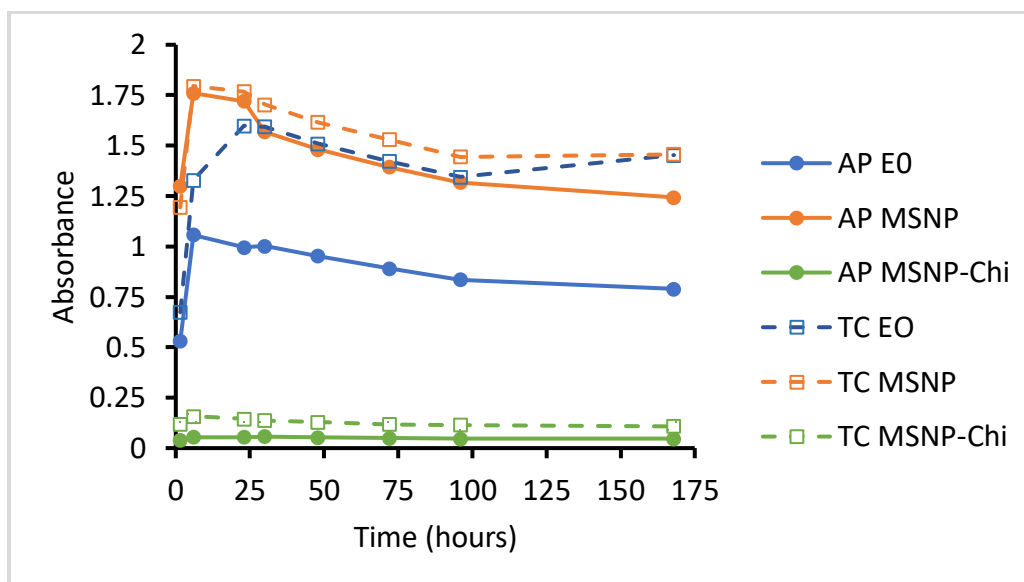


**Figure 3:** Percentages of the initial weights measured after evaporation of *A. pusilla* and *T. capitatus* EOs formulations at room temperature for 192 hours.

AP EO = Free essential oil of *A. pusilla*, TC EO = Free essential oil of *T. capitatus*, AP MSNP = essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles, TC MSNP = essential oil of *T. capitatus* encapsulated in silica nanoparticles, AP MSNP-Chi = essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles coated with chitosane, TC MSNP-Chi = essential oil of *T. capitatus* encapsulated in silica nanoparticles with chitosane,

Absorbances measured in the diffusion essays showed increases of essential oils concentrations outside the dialysis bags in the case of the free essential oils and the EO loaded MSNPs (Figure 4). AP essential oil and TC and AP loaded MSNPs presented a maximum value after 6 hours of the experiment. TC EO maximum diffusion point was recorded after 23 hours. The EOs diffusion continued progressively. In the case of the chitosan coated MSNPs, no release of EO was observed. The means of release percentages measured from 72 to 168 hours were 75.3 % and 39.7 % for AP EO and AP EO loaded in MSNPs respectively. Considering the non-diffusible residue of EO, one can estimate that 100 mg of loaded MSNPs contained 52.7 mg of AP EO. For TC, the means were

81.0 % and 53.0 % for EO and AP EO loaded in silica nanoparticles leading to 65.4 mg of TC EO per 100 mg of loaded silica nanoparticles. The results confirmed the adsorption of both essential oils in the MSNPs. This encapsulation extended the essential oil release to 72 hours compared to the free essential oil which evaporated fully in 24 hours. The chitosan coating provided the essential oils from releasing in the air and in the PBS buffer. This preliminary result confirms the impact of the chitosan coating on the EO evaporation. The amount of chitosan used for the coating of the loaded nanoparticles needs to be optimized in the order to find conditions allowing to extend the release of the essential oils at active concentrations.



**Figure 4:** Release kinetics of AP EO from different formulas in the PBS buffer solution

AP EO = Free essential oil of *A. pusilla*, TC EO = Free essential oil of *T. capitatus*, AP MSNP = essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles, TC MSNP = essential oil of *T. capitatus* encapsulated in silica nanoparticles, AP MSNP-Chi = essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles coated with chitosane, TC MSNP-Chi = essential oil of *T. capitatus* encapsulated in silica nanoparticles with chitosane,

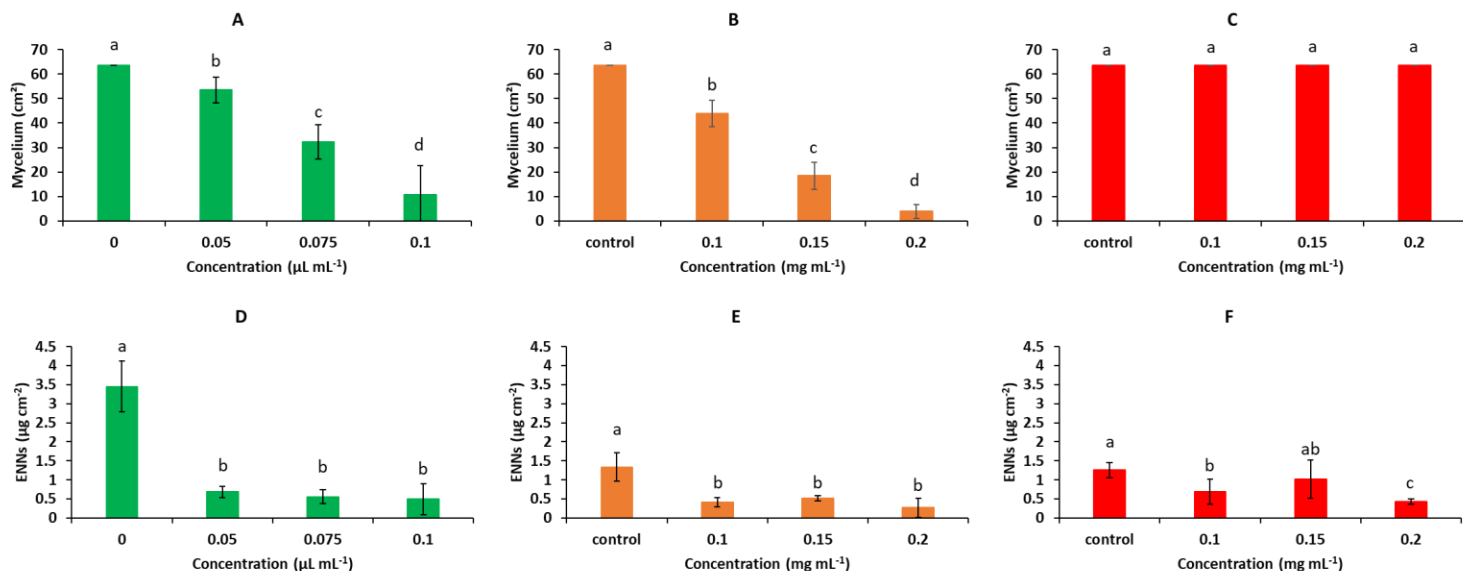
### 3.3. Antifungal and antimycotoxic activity

The antifungal contact assays of AP EO against *F. avenaceum* presented a dose dependent inhibition of the mycelial growth in the case of the free AP EO and the AP EO loaded MSNPs. Indeed, AP EO showed an inhibition of 15.8% at  $0.05 \mu\text{L mL}^{-1}$  and 82.9% at  $0.1 \mu\text{L mL}^{-1}$ . In the case of AP EO loaded silica nanoparticles, 31.1% of inhibition was recorded at  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  and 93.7% at  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Since 52.7 % of AP EO loaded MSNPs weight were EO, and thymol which is the main volatile component of AP EO (Chakroun et al., 2021b) having a density value of 0.965

g/mL at 25 °C, one can approximate that treatment with 2 mg of AP EO loaded MSNPs is comparable to treatment with 1 μL of EO. Consequently, for equivalent amounts of free EO and EO loaded in MSNPs, the latter presented higher growth inhibition values. The MSNPs without EO as well as all the treatments with chitosan coated nanoparticles did not affect the mycelial growth.

The accumulation of ENNs in the culture medium was inhibited at rates varying between 80% to 85% by both free and EO loaded MSNPs. No significant concentration dependency effect was observed at the tested concentrations.

The exposure to non-loaded MSNPs (controls without EO), in figure 5-E compared to the control in figure 5-D, inhibited 61% of ENNs accumulation and the chitosan coated nanoparticles presented an inhibition by 63.5%. AP EO Loaded nanoparticles inhibited significantly the ENNs production with percentages that varied between 61.5% at 0.1 mg mL<sup>-1</sup> and 80% at 0.2 mg mL<sup>-1</sup> compared to the non-loaded silica nanoparticles. Loaded and chitosan coated nanoparticles inhibited significantly the ENNs production at 0.2 mg mL<sup>-1</sup> with a percentage value of 65.6% compared to the control chitosan coated nanoparticles without EO.



**Figure 5:** Effects in agar dilution assays of free essential oil of *A. pusilla*, (A, D), essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles (B, E) and essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles coated with chitosan (C, F) on the mycelial growth (A, B, C) and on the production of ENNs, sum of ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1 (D, E, F) of *F. avenaceum* I 496I.

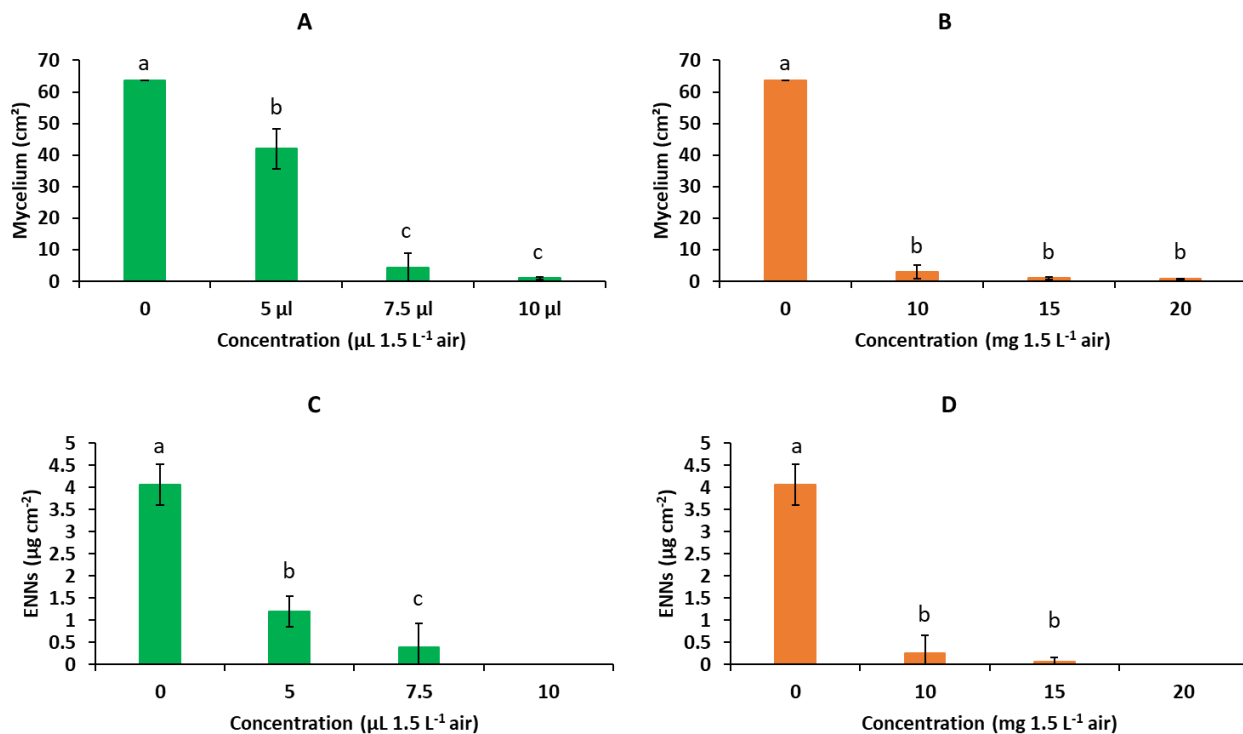
Controls in B and E are silica nanoparticles (MSNPs) at 0.1 mg g<sup>-1</sup>, controls in C and F are MSNPs coated with chitosan at 0.1 mg g<sup>-1</sup>. Values are means of 3 replicates. Error bars are ± standard deviation. Means with the same lowercase letter are not significantly different (p < 0.05)

The exposure to volatiles components of AP EO in the fumigation method had similar effects on the mycelial growth than in the contact assays (Figure 6). Significant dose dependent inhibition was observed for both the AP EO treatment and the loaded silica nanoparticles treatment. AP EO inhibited 34% of the mycelial growth at 5 µL per flask and 98.3% at 10 µL per flask. The AP EO loaded silica nanoparticles presented higher percentage of inhibition compared to the equivalent amount of the free essential oils. 95.4% of mycelial growth inhibition was observed for 10 mg and 98.8% for 20 mg per flask. Chitosan coated nanoparticles were not applied in this experiment since the coating prevented the release of the essential oils.

Unlike the contact assays, a significant dose dependent inhibition was observed on the accumulation of ENNs in the fumigation assays. 70.4% of the ENNs production per cm<sup>2</sup> of the mycelial growth was observed for 5µL of AP EO, 90.2% for 7.5 µL and 100% for 10 µL. The loaded silica nanoparticles inhibited 93.6 % of the enniatines production per cm<sup>2</sup> of mycelial



growth at 10 mg per flask, 98.4% for 15 mg and 100 % for 20 mg per recipient. As expected, the MSNPs without EO control had no effect.



**Figure 6:** Effect of volatile components of free essential oil of *A. pusilla*, (A, C), and essential oil of *A. pusilla* encapsulated in silica nanoparticles (B, D) on the mycelial growth (A, B) and on the production of ENNs, sum of ENNA, ENNA1, ENNB, ENNB1(C, D) of *F. avenaceum* I 496I.

Values are means of 3 replicates. Error bars are  $\pm$  standard deviation. Means with the same lowercase letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Emergent mycotoxins are causing serious concerns on the scientific community. Studies are examining the toxic potential of these mycotoxins and the appropriate control strategies to prevent their accumulation in the food crops (Jestoi, 2008; Gautier et al., 2020). Essential oils have been investigated as a safe, ecofriendly, renewable, and easily biodegradable option to be used to prevent the fungal contamination and the mycotoxins accumulation (Prakash et al., 2015).

Various studies have investigated the antifungal effect of several essential oil against *F. avenaceum* following different experimental methods such as the agar dilution method, the disk method or the fumigation method (Chakroun et al., 2021b). *Origanum vulgare* essential oil has inhibited 77.4% of the *F. avenaceum* when tested following the agar dilution method (Hanana et al., 2017). The chemical profile of this essential oil was identified. Thymol and p-Cymene were the major component (29.6%, 29.4% respectively). *Thymus capitatus* essential oil with carvacrol as a major compound (69.15%) inhibited the mycelial growth by 89% (Hanana et al., 2017). Very few studies have considered the effect of the essential oil exposition on the enniatines production. Our recent work demonstrated the antifungal effect of 8 different essential oils (*Ammoides pusilla*, *Thymus capitatus*, *Carum carvi*, *Origanum vulgare*, *Myrtus communis*, *Artemisia absintum*, *Mentha spicata* and *Schinus terbenthifolius*) against *F. avenaceum* and their impact on the enniatins production. *Thymus capitatus* and *A. pusilla* demonstrated the highest inhibition percentage of the mycelial growth and the enniatins production. *Ammoides pussila* demonstrated a dose dependent inhibition effect on both factors and had thymol as major compound (Chakroun et al., 2021b). The analysis on the fumigation assays demonstrated that after 24 days of culture, the mycelial growth recovered to the control level for almost all the concentrations tested. Thus, a stabilization system of the essential oil is needed to protect the essential oil from oxidation and the UV exposure and to extend its release.

Nanoencapsulation is one of the most promising techniques to protect the essential oils and control their delivery. Silica mesoporous nanoparticles presents a stable platform with homogeneous porosity that provides high surface area and a high loading capacity. In another hand, MSNPs surface enables a high range of functionalization with a variety of molecules in different regions of the particle. This property makes the MSNPs highly versatile and enables them to perform specialized tasks (Slowing et al., 2010; Sattary et al., 2020).

The essential oil loading encapsulation percentage varies depending on the nature of the essential oil and its components. In our study, the LE% was 69.9% for *T. capitatus* EO and 42.2% for *A. pusilla* EO. The latter values were confirmed by thermogravimetric analysis (45 %). These percentages were higher than the values presented by Sattary et al. (2020) who reported a LE% of 33.75% for *Cymbopogon citratus* and 26.91% for the *Syzygium aromaticum* essential oil.

Ebadollahi et al. (2017) reported a LE% of 89.07% for *Thymus eriocalyx* essential oil and 85.5% for *Thymus kotschyanus* essential oil.

The antifungal activity of the AP loaded MSNPs showed a higher mycelial growth inhibition compared to the free essential oil in the contact assays. This result is in line with the work of Ebadollahi et al. (2017) that demonstrated an increase in the activity of *T. eriocalyx* and *T. kotschyanus* essential oils loaded in MCM-41 compared to the free oils. The encapsulation did not only increase the effect of the essential oil but also prolonged its release in the environment by 13 days. A work by Sattary et al. (2020) showed the encapsulation in the MSNPs had significantly increased the activity of the Lemongrass and Clove essential oils by 3 times. The nanoencapsulation of the essential oils into mesoporous silica nanoparticles increased their stability and solubility. In fact, the MSNPs surface increases the solubility of the EO in water by reducing its hydrophobicity, allowing the EOs to penetrate the fungal cells, causing loss of membrane integrity, and destroying fungal cells (Janatova et al., 2015; Sattary et al., 2020). Thus, a lower dosage of the essential oil is needed to achieve the same antifungal and enniatines inhibition activity than with the free oils. The fumigation assays presented a significant increase of the antifungal activity and the enniatines inhibition of the encapsulated AP EO compared to the free oil. In Janatova et al. (2015) work, multiples essential oil compounds were tested and encapsulated individually in equivalent amounts and tested against *A. niger*. The results showed that the release of the compounds depends on their chemical nature. Indeed, encapsulated thymol antifungal activity increased 8 times compared to the non-encapsulated type and its diffusion was considerably slower.

In the present study we observed a significant effect of the non-loaded MSNPs on the mycelial growth and enniatines production by *F. avenaceum*. To the best of our knowledge, this was not reported before

For a further control of the release of the encapsulated essential oil, a chitosan coating was performed. Chitosan is a cationic polymer comprising of  $\beta$ -(1–4) linked Dglucosamine and N-acetyl-D-glucosamine unit, produced by alkaline deacetylation of chitin, which is the second most plentiful compound in nature after cellulose and chief component of crustaceans' exoskeleton and fungal cell-walls (Elieh-Ali-Komi and Hamblin, 2017). It represents an excellent candidate as nanoencapsulation material due to its abundance, biocompatibility, hydrophilicity,

biodegradability, non-toxicity (GRAS status), excellent film, gel and particle forming properties coupled with exceptional antifungal activity (Chaudhari et al., 2021). Indeed, when exposed to chitosan at 0.98 aw, *F. graminearum* mycelial growth decreased significantly (Zachetti et al., 2019). Chitosan treatment proved to have inhibition activity on the fumonisin and DON production by *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. graminearum* respectively.

The EOs encapsulation using chitosan proved to increase their antifungal activity and inhibited the mycotoxins production. Hasheminejad et al. (2019) work measured two times increase in the antifungal activity of encapsulated clove essential oil against *A. niger*. Various studies reported the effect of the encapsulation of multiple essential oil and their components on the inhibition of mycotoxins production. This inhibition varied from 59% to 100% of different mycotoxins like DON, 3ADON, 15ADON, fumonisins and aflatoxins (Beyki et al., 2014; López-Meneses et al., 2018; Wan et al., 2019; Kujur et al., 2020; Das et al., 2021). To the best of our knowledge no previous study reported of the effect of such encapsulation on ENNs production by *Fusarium* species. An addition, the combination of mesoporous silica encapsulation of EOs and the chitosan coating to improve the stabilization and extend the release of the essential oil have not been reported. Our preliminary results prove that the chitosan coating have a significant impact of the release of AP EO from MSNPs, however the amount deposited on the silica nanoparticles needs to be optimized to control the release of the oil and improve its activity. In the contact assays, the chitosan coated nanoproducts without EO had a significant inhibition activity on ENNs production by *F. avenaceum*. To our best knowledge this is the first report of the impact of nanoencapsulated EO in MSNPs coated with a chitosan layer and their consequence on a mycotoxigenic *Fusarium* species.

## 5. Conclusion

Nanoencapsulation of an EO in MSNPs with narrow slit pores having an average pore diameter of 3.1 nm and a specific surface area of 486.975 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> obtained by the impregnation method increased the activity of the EO against *F. avenaceum* and its production of ENNs when evaluated *in vitro* in both contact and fumigation assays. The nanoencapsulation delayed the release of the EO in both assays, but the improvement of the measured activities was significantly higher when volatile components effects were tested (fumigation assay). Chitosan coating of MSNPs containing the EO drastically slowed the EO release. Optimization of the coating by using lower quantities of

chitosan needs to be proceeded to manage the control of the release with chitosan. Thus, this study presents a promising encapsulation system that could be developed for the potentializing of *A. pussia* and *T. capitatus* EOs as biofungicides active against mycotoxigenic *Fusarium* species.

## Bibliography

- Balaure, P.C., Boarca, B., Popescu, R.C., Savu, D., Trusca, R., Vasile, B. Ștefan, Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Bolocan, A., Andronescu, E., 2017. Bioactive mesoporous silica nanostructures with anti-microbial and anti-biofilm properties. *International Journal of Pharmaceutics* 531, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.062>
- Bernardos, A., Marina, T., Žáček, P., Pérez-Esteve, É., Martínez-Mañez, R., Lhotka, M., Kouřimská, L., Pulkrábek, J., Klouček, P., 2015. Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports: Antifungal effect of encapsulated essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 2824–2831. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7022>
- Beyki, M., Zhavah, S., Khalili, S.T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 54, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
- Chakroun, Y., Atanasova, V., Jallouli, S., Oueslati, S., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2021a. Tunisian Thyme essential oil for controlling enniatins producing *Fusarium* species. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food* 9, 221–230.
- Chakroun, Y., Oueslati, S., Atanasova, V., Richard-Forget, F., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2021b. *Ammoides pusilla* Essential Oil: A Potent Inhibitor of the Growth of *Fusarium avenaceum* and Its Enniatin Production. *Molecules* 26, 6906. <https://doi.org/10.3390/molecules26226906>
- Chaudhari, A.K., Singh, V.K., Das, S., Dubey, N.K., 2021. Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system. *Food and Chemical Toxicology* 149, 112019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112019>
- Das, S., Singh, V.K., Dwivedy, A.K., Chaudhari, A.K., Deepika, Dubey, N.K., 2021. Eugenol loaded chitosan nanoemulsion for food protection and inhibition of Aflatoxin B1 synthesizing genes based on molecular docking. *Carbohydrate Polymers* 255, 117339. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117339>
- Ebadollahi, A., Sendi, J.J., Aliakbar, A., 2017. Efficacy of Nanoencapsulated *Thymus eriocalyx* and *Thymus kotschyanus* Essential Oils by a Mesoporous Material MCM-41 Against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 110, 2413–2420. <https://doi.org/10.1093/jee/tox234>
- Ederli, L., Beccari, G., Tini, F., Bergamini, I., Bellezza, I., Romani, R., Covarelli, L., 2021. Enniatin B and Deoxynivalenol Activity on Bread Wheat and on *Fusarium* Species Development. *Toxins* 13, 728. <https://doi.org/10.3390/toxins13100728>
- Elieh-Ali-Komi, D., Hamblin, M.R., 2017. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials 24.
- Esmaeili Taheri, A., Chatterton, S., Foroud, N.A., Gossen, B.D., McLaren, D.L., 2017. Identification and community dynamics of fungi associated with root, crown, and foot rot of field pea in western Canada. *Eur J Plant Pathol* 147, 489–500. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1017-4>
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., 2020. *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4788–4798. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00411>
- Hanana, M., Mansour, M.B., Algabr, M., Amri, I., Gargouri, S., Romane, A., Jamoussi, B., Hamrouni, L., 2017. Potential Use of Essential oils from Four Tunisian Species of Lamiaceae: Biological Alternative for Fungal and Weed Control. *Rec. Nat. Prod.* 12.



- Hasheminejad, N., Khodaiyan, F., Safari, M., 2019. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry* 275, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085>
- Horky, P., Skalickova, S., Baholet, D., Skladanka, J., 2018. Nanoparticles as a Solution for Eliminating the Risk of Mycotoxins. *Nanomaterials* 8, 727. <https://doi.org/10.3390/nano8090727>
- Janatova, A., Bernardos, A., Smid, J., Frankova, A., Lhotka, M., Kourimská, L., Pulkrabek, J., Kloucek, P., 2015. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products* 67, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.019>
- Jestoi, M., 2008. Emerging *Fusarium* -Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 21–49. <https://doi.org/10.1080/10408390601062021>
- Kalagatur, N.K., Nirmal Ghosh, O.S., Sundararaj, N., Mudili, V., 2018. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With *Cymbopogon martinii* Essential Oil on Plant Pathogenic Fungi *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Pharmacology* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610>
- Karlsson, I., Persson, P., Friberg, H., 2021. *Fusarium* Head Blight From a Microbiome Perspective. *Front. Microbiol.* 12, 628373. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628373>
- Kresge, C.T., 1992. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* pp.710-712.
- Kujur, A., Kumar, A., Yadav, A., Prakash, B., 2020. Antifungal and aflatoxin B1 inhibitory efficacy of nanoencapsulated *Pelargonium graveolens* L. essential oil and its mode of action. *LWT* 130, 109619. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109619>
- Leslie, J.F., Moretti, A., Mesterházy, Á., Ameye, M., Audenaert, K., Singh, P.K., Richard-Forget, F., Chulze, S.N., Ponte, E.M.D., Chala, A., Battilani, P., Logrieco, A.F., 2021. Key Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains. *Toxins* 13, 725. <https://doi.org/10.3390/toxins13100725>
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops, in: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M. (Eds.), *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 645–667. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_1)
- López-Meneses, A.K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Rodríguez-Félix, F., Mouriño-Pérez, R.R., Cortez-Rocha, M.O., 2018. *Schinus molle* L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT* 96, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.013>
- Matusinsky, P., Zouhar, M., Pavela, R., Novy, P., 2015. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products* 67, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.022>
- Mergoum, M., Hill, J.P., Quick, J.S., 1998. Evaluation of Resistance of Winter Wheat to *Fusarium acuminatum* by Inoculation of Seedling Roots with Single, Germinated Macroconidia. *Plant Disease* 82, 300–302. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.3.300>
- Munkvold, G.P., Proctor, R.H., Moretti, A., 2021. Mycotoxin Production in *Fusarium* According to Contemporary Species Concepts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 59, 373–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-102825>
- Perczak, A., 2019. Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds. *Archives of Microbiology* 13.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>

- Prosperini, A., Berrada, H., Ruiz, M.J., Caloni, F., Coccini, T., Spicer, L.J., Perego, M.C., Lafranconi, A., 2017. A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Front. Public Health* 5, 304. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00304>
- Qiu, C., Chang, R., Yang, J., Ge, S., Xiong, L., Zhao, M., Li, M., Sun, Q., 2017. Preparation and characterization of essential oil-loaded starch nanoparticles formed by short glucan chains. *Food Chemistry* 221, 1426–1433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.009>
- Sattary, M., Amini, J., Hallaj, R., 2020. Antifungal activity of the lemongrass and clove oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against wheat's take-all disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 170, 104696. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104696>
- Slowing, I.L., Vivero-Escoto, J.L., Trewyn, B.G., Lin, V.S.-Y., 2010. Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications. *J. Mater. Chem.* 20, 7924. <https://doi.org/10.1039/c0jm00554a>
- Tisserand, R., Young, R., 2014. Essential oil composition, in: *Essential Oil Safety*. Elsevier, pp. 5–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06241-4.00002-3>
- Valencia Junca, M.A., Valencia, C., Flórez López, E., Delgado-Ospina, J., Zapata, P.A., Solano, M., Grande Tovar, C.D., 2019. Chitosan Beads Incorporated with Essential Oil of *Thymus capitatus*: Stability Studies on Red Tilapia Fillets. *Biomolecules* 9, 458. <https://doi.org/10.3390/biom9090458>
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology* 21, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.009>
- Wan, J., Zhong, S., Schwarz, P., Chen, B., Rao, J., 2019. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chemistry* 291, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.032>
- Zachetti, V., Cendoya, E., Nichea, M., Chulze, S., Ramirez, M., 2019. Preliminary Study on the Use of Chitosan as an Eco-Friendly Alternative to Control *Fusarium* Growth and Mycotoxin Production on Maize and Wheat. *Pathogens* 8, 29. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010029>

### III. Synthèse

Les résultats obtenus ont montré que l'encapsulation dans des MSNPs a prolongé le largage des huiles essentielles dans l'environnement et a augmenté l'activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles testées par rapport à une quantité équivalente d'huiles libres. Ces résultats ont révélé aussi que les MSNPs seules sans huile essentielle ont présenté une inhibition de la production des enniatines par *F. avenaceum* I496. Ce résultat, n'a pas été rapporté précédemment dans la littérature.

L'enrobage de nos nanoproduits avec le chitosane a freiné le largage des huiles essentielles dans l'environnement du champignon. Les résultats des analyses en contact de l'activité des nanoparticules enrobées de chitosane n'ont pas montré une activité antifongique observable du chitosane. Cela peut être dû au fait que les nanoparticules étaient disséminées dans un milieu gélosé et non dans un milieu liquide comme dans la plupart des études. Néanmoins, une inhibition de la production des enniatines a été observée.



# *Discussion et perspectives*





## Discussion et perspectives

Les enniatines sont des mycotoxines émergentes secrétées par plusieurs espèces de *Fusarium* telles que *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*. Ces espèces fusariennes font partie des acteurs de la fusariose des épis des céréales (FHB) aux côtés d'autres espèces telles que *F. graminearum*, *F. culmorum* qui produisent à leur tour des toxines de types trichothécènes B. La coprésence de ces types de mycotoxines pose le problème de la possibilité d'effets toxiques synergiques (Smith et al., 2016). La toxicité des enniatines *in-vitro* a été prouvée selon plusieurs études (Jestoi, 2008). Cependant les informations sur leurs toxicités *in-vivo* restent limitées. En effet, à ce jour, aucun événement de toxicité aigüe n'a été associé à ce type de toxines. En revanche des études montrent leur présence sur des zones géographiques étendues (Pays de l'Europe : France, Espagne, Italie ..., et aussi le Canada, l'Australie, la Tunisie, ...), sur une large gamme d'hôtes (céréales, tomates, carottes, asperges, ...) et en quantité importante. De ce fait, le risque d'une exposition chronique du consommateur aux enniatines ne peut pas être écarté.

Comme étayé précédemment dans la partie synthèse bibliographique, les études visant à contrôler l'accumulation des enniatines dans les denrées alimentaires ou au développement de nouvelles alternatives dans le but de maîtriser la contamination par les champignons producteurs d'enniatines sont très limitées voire inexistantes, alors que l'on enregistre une augmentation de la fréquence de détection de ces mycotoxines et la détermination avérée de leur toxicité cellulaire (Jestoi, 2008; Gautier et al., 2020). Par ailleurs, une évaluation est en cours pour la réglementation des teneurs des enniatines autorisées dans certaines denrées alimentaires par l'EFSA.

Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire se situent dans ce contexte et visent à évaluer les activités antifongiques d'huiles essentielles sur des espèces fusariennes productrices d'enniatines et leur capacité à contrôler leur production d'enniatines, en vue d'une valorisation de ces substances naturelles comme moyen de lutte alternatif aux fongicides de synthèse.

La première partie du travail a consisté à établir le choix des souches fusarienne de travail. Etant donné que ma thèse en cotutelle s'est déroulée dans le cadre d'un projet de collaboration Franco-Tunisien, PHC-Utique, nous avons décidé de travailler avec une souche en provenance de chacun des deux pays de la collaboration. La souche I496 appartenant à l'espèce *F. avenaceum* a été choisie du côté français. Comme présenté précédemment, il a été démontré que cette espèce est quasi-omniprésente (dans 85% des échantillons de blé dur français) dans les analyses effectuées

lors du projet ANR DON&Co (ANR-10-CESA-0012) comme espèce responsable de la FHB. Cette souche provient de la collection de l'unité de recherche MycSA. Les caractéristiques morphologiques et toxigènes ont fait l'objet des travaux de recherche de ma collègue Charlotte Gautier au sein de la même unité de recherche. Pour sélectionner une souche fusarienne productrice d'enniatiens en provenance de la Tunisie, nous avons procédé à l'isolement de *Fusarium spp.* à partir d'échantillons de blé tunisien en appliquant la méthode ULSTER et procédé par la suite à des cultures monoclonales (Chapitre 1). La taxonomie moléculaire de quatre souches isolées d'un lot contaminé par du DON et des enniatiens a révélé leur appartenance à deux espèces différentes. Deux souches (3T et 4T) font partie de l'espèce *F. culmorum* et les deux autres (32T et 33T) font partie du complexe d'espèce *F. tricinctum* (FTSC), plus précisément à l'espèce *F. acuminatum*. La caractérisation morphologique des deux souches correspond aux descriptions de *F. acuminatum* publiées par différents auteurs (Rabie et al., 1986; Logrieco et al., 1992; Burgess and Forbes, 1993; Leslie and Summerell, 2006). Nous nous sommes intéressés, dans le cadre de ces recherches, à la caractérisation plus poussée de leur production d'enniatiens. Les dosages des mycotoxines dans des cultures in vitro ont montré que les deux souches sont d'importants producteurs d'enniatiens B et B1 (allant jusqu'à 1900 µg g<sup>-1</sup> de biomasse fongique pour l'enniatine B, et en moindre importance, l'enniatine A1 (172 µg g<sup>-1</sup>). Différents profils mycotoxiques de *F. acuminatum* ont été précédemment décrits. Cette espèce est connue pour sa production de plusieurs enniatiens (B, B1, B2, B3 et B4) (Visconti et al., 1992) et A1 dans une moindre mesure (Senatore et al., 2021). Par ailleurs nous avons cherché à savoir si ces souches FTSC produisent des TCTB in vitro. Ces analyses ont montré que les deux souches produisent également la mycotoxine 3ADON mais pas les autres mycotoxines recherchées. *Fusarium acuminatum* a été présenté aussi comme producteur de toxine T2 (Rabie et al., 1986).

Les travaux de Marín et al., 2012 ont montré que certaines souches de *F. acuminatum* ont la capacité de produire de la DON, mais en faible quantité. A notre connaissance, la production de 3ADON par une souche de *F. acuminatum* n'a pas été signalée précédemment. Cependant dans une récente revue, Munkvold et al. (2021) soulignent que l'absence de gènes du cluster de synthèse des trichotécènes (gènes TRI) dans le génome de référence de *F. acuminatum* plaide en faveur d'une impossibilité à produire ces mycotoxines. Selon eux, les quelques résultats de production de DON sont probablement erronés et dû à de mauvaises interprétations de profils chromatologiques. Des travaux complémentaires avec d'autres milieux de cultures pour éviter des interférences

potentielles de métabolites, le dosage par HPLC MS/MS et la recherche de gènes TRI par PCR et séquençage des éventuels amplicons sont nécessaires pour confirmer ou infirmer la capacité de production de 3ADON par les souches isolées dans cette étude.

Pour évaluer l'activité de certaines huiles essentielles comme produits naturels antifongiques et inhibiteurs de la production des enniatines sur les deux souches de travail choisies, un panel de huit plantes aromatiques tunisiennes a été choisi, à partir d'une étude bibliographique des travaux précédemment établis. En effet, les huiles essentielles *Thymus capitatus*, *Artemisia absinthium*, *Carum carvi*, *Myrtus communis*, *Origanum vulgare* et *Mentha spicata* ont été précédemment testées contre différentes espèces de *Fusarium* productrices de TCTB et ont démontré une activité antifongique intéressante (voir tableau de synthèse bibliographique dans Chakroun et al., 2021b). En revanche, aucune étude n'avait été rapportée sur des espèces fusariennes productrices d'enniatines. Les huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et *Schinus terbenetofonius* n'avaient pas encore fait l'objet d'étude pour leur activité antifongique sur des espèces du genre *Fusarium*. Le rendement de l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation de ces plantes aromatiques est un critère de sélection important. *T. capitatus*, *C. carvi*, *A. pusilla* et *S. terbenetofonius* ont montré les rendements d'extraction les plus importants, allant jusqu'à 2.5 % pour *S. terbenetofonius* (Chapitre 2.2). Une des limites des travaux de recherches et de l'utilisation des huiles essentielles réside dans le fait que le rendement d'extraction ainsi que la composition des extraits obtenus dépendent fortement de plusieurs facteurs, notamment la saison et la région de la récolte de la plante, la partie de la plante à utiliser et son stade de croissance ainsi que la méthode d'extraction choisie. C'est pourquoi pour chacune des deux huiles essentielles sélectionnées pour des études plus approfondies, deux lots de plantes d'origine différente ont été utilisés pour l'extraction (Tefiani et al., 2016).

Les huiles essentielles d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* ont présenté le pourcentage d'inhibition les plus élevés au niveau de la croissance mycélienne de *F. avenaceum* I496 et *F. acuminatum* 33T. Cette activité peut être associée à la composition chimique de ces deux huiles. En effet la détermination du profil chimique de leur composition démontre que le composé majoritaire est le carvacrol pour l'huile essentielle de *T. capitatus* avec un pourcentage de plus de 80% (Chapitre 2.3) et le thymol pour l'huile essentielle d'*A. pusilla* avec un pourcentage de plus de 50% (Chapitre 2.2). Le thymol et le carvacrol sont deux monoterpènes oxygénés isomères,

dotés d'une activité antifongique importante (Dambolena et al., 2008; Janatova et al., 2015; Roselló et al., 2015; Gill et al., 2016; Oliveira et al., 2020). La structure chimique de ces deux composés et leur hydrophobicité leur permet de s'accumuler dans les phospholipides des membranes cellulaires et de finalement affecter drastiquement l'intégrité membranaire (Zabka and Pavela, 2018). Sur le plan de l'inhibition de la production des enniatines, le résultat du screening des huiles essentielles sur les deux souches a été contrasté. Les huiles essentielles ont présenté des activités différentes en fonction de la souche testée. En effet, dans le cas de la souche *F. avenaceum* I496, la production des enniatines a été inhibée, dans des proportions variables, par toutes les huiles essentielles utilisées. En revanche dans le cas de *F. acuminatum* 33T, seules les huiles essentielles d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* ont présenté une inhibition de la production des enniatines. Les autres huiles essentielles testées ont plutôt stimulé cette production. Certaines études ont démontré que la production des mycotoxines serait un mécanisme de défense des champignons en présence de conditions de stress (Gautier et al., 2020). Certaines molécules bioactives testées peuvent inhiber la production des mycotoxines à de fortes doses mais l'activer à de faibles doses (comme c'est le cas pour certains composés phénoliques). Il est important, dans notre projet, de sélectionner les extraits qui présentent une activité antifongique intéressante mais aussi qui inhibent la production des enniatines, ou au moins n'induisent pas une activation de leur accumulation dans le milieu ambiant qui annulerait l'intérêt d'une activité antifongique partielle. C'est pourquoi le choix s'est porté sur les huiles essentielles d'*A. pusilla* (Chapitre 2.2) et de *T. capitatus* (Chapitre 2.3) pour la suite des analyses.

Une application d'une gamme de concentrations des huiles essentielles en contact avec les deux souches (I496 et 33T) dans un milieu gélosé nous a permis d'approfondir d'avantage nos connaissances sur l'activité de ces huiles. L'activité antifongique et antimycotoxines de l'huile essentielle d'*A. pusilla* s'est révélée être dose dépendante vis-à-vis des deux souches. En effet l'inhibition de la croissance mycélienne et la production des enniatines a été proportionnelle à la concentration appliquée. Cependant, l'huile essentielle de *T. capitatus* à de faibles concentrations contre 33T a montré une action d'activation de la production des enniatines. Afin de mettre en évidence l'activité des composés volatils des huiles essentielles sélectionnées, des analyses en fumigation ont été effectuées. Les résultats obtenus ont montré que l'inhibition de la croissance mycélienne et de la production des enniatines a été dose dépendante. La même expérience a mis en évidence une activité fongistatique des deux huiles avec une reprise de la croissance fongique

et des différences dans la phase de latence qui ont été proportionnelles à la quantité de l'huile appliquée. Il a été démontré aussi que l'inhibition de la production des enniatines a été maintenue même après 24 jours de culture pour les plus fortes concentrations. L'évaluation de l'effet des deux huiles essentielles sur la germination des spores de *F. avenaceum* I496 a démontré qu'une inhibition significative du taux de germination contribue à l'effet fongistatique observé. Ces résultats soulignent que les huiles essentielles d'*A. pusilla* et de *T. capitatus* sont des candidats prometteurs pour leur valorisation en vue de développer une alternative à base de produits d'origine naturelle pour le contrôle de la fusariose et de la contamination en mycotoxines.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *T. capitatus* a été démontrée sur d'autres espèces fusariennes et sur d'autres genres de champignon phytopathogènes responsables de la production de mycotoxines nocives à la santé humaine et animale (Tabti et al., 2014a, 2014b; López-Meneses et al., 2018; Casiglia et al., 2019). De ce fait, cette huile essentielle présente une action antifongique à large spectre. En revanche, les informations sur son action d'inhibition de la production des mycotoxines restent encore limitées. Les études sur l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*A. pusilla* sont très limitées. Une application de cette huile sur d'autres espèces fongiques est nécessaire pour évaluer sa possible utilisation sur un large spectre de champignons phytopathogènes, en particulier les espèces fusariennes pouvant interagir pour la colonisation des épis de céréales et que l'on retrouve dans les mêmes épis ou grains de blé, comme dans le chapitre 1 où *F. avenaceum* et *F. culmorum* cohabitaient.

Les activités biologiques des huiles essentielles sont généralement déterminées par les caractéristiques de leurs composés majoritaires (Tisserand and Young, 2014). Le thymol étant le composé majoritaire de l'huile essentielle d'*A. pusilla*, une évaluation de son activité antifongique et antimycotoxines a été effectuée. Le thymol a démontré une activité antifongique significative et dose dépendante (Chapitre 2.2). Ce résultat nous permet de dire que le thymol a une influence importante dans la propriété antifongique de l'huile essentielle d'*A. pusilla* précédemment observée. Néanmoins, en analysant les résultats pour l'inhibition de la production des enniatines, le thymol ne serait pas le responsable de cette activité. Il est important de souligner que l'activité observée de l'huile essentielle d'*A. pusilla* réside probablement dans la synergie du thymol avec les autres composés terpéniques de l'huile. Il est important de continuer l'investigation en vue de comprendre les interactions entre ces composés et leurs implications dans l'activité antifongique

et dans l'inhibition des enniatines de cette huile essentielle en réalisant des essais d'activité antifongique et antimycotoxines avec différentes combinaisons des composés constituant l'huile essentielle.

Nous avons mis en évidence, au cours de ces recherches, que l'activité des huiles essentielles sélectionnées a été fongistatique et non fongicide. Une activité qui décroissait au cours du temps de la culture. Pour expliquer la reprise de la croissance avec le temps, deux hypothèses ont été posées : (1) le champignon se serait adapté à son environnement et aurait développé des moyens de résistance à l'action des composés volatils de l'huile essentielle (2) ; les composés de l'huiles essentielles, étant exposés à l'oxydation, auraient perdus leurs caractéristiques antifongiques. Une seconde exposition aux mêmes concentrations d'huile essentielle à partir d'explants ou de spores issus d'un premier contact prolongé avec un milieu contenant de l'huile essentielle a mis en évidence la sensibilité persistante du champignon face aux huiles essentielles utilisées. Ces résultats montrent que le champignon ne s'était pas adapté à la présence des composés volatils dans l'environnement. Par conséquent, la deuxième hypothèse a été retenue. Suite à ces conclusions, il est évident que l'activité des deux huiles essentielles a été persistante dans le temps et l'inhibition de la production des enniatines a été maintenue sur toute la période expérimentale, mais avec une diminution d'efficacité due à l'altération ou la dégradation des composés actifs. Il serait nécessaire de mettre en place une solution qui protège les composés des huiles essentielles des facteurs externes d'altération (tels que la lumière et l'oxydation) et de prolonger leur diffusion dans l'air afin de prolonger l'activité antifongique et antimycotoxines.

La nanotechnologie représente une des méthodologies qui permettrait d'atteindre les objectifs fixés en termes de protection de l'huile et de prolonger sa diffusion. En effet, comme évoqué dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, un large choix de matériaux peut être utilisé pour procéder à la synthèse de nanomatériaux et à l'encapsulation des huiles essentielles (Asbahani et al., 2015; Álvarez et al., 2016; Chaudhari et al., 2021). Pour nos travaux de recherche, nous avons opté pour l'encapsulation des huiles essentielles dans des nanoparticules de silice mésoporeuse (MSNPs) et par la suite à l'enrobage des produits obtenus dans du chitosane (Chapitre 3). La silice mésoporeuse représente un matériau stable mécaniquement et inerte vis-à-vis de l'activité biologique du microbiote environnant. La surface spécifique active des MSNPs améliore la solubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, favorise leurs accès aux



cellules fongiques et présente une surface biocompatible et apte à la fonctionnalisation (Slowing et al., 2010; Balaure et al., 2017; Sattary et al., 2020). Le chitosane a été choisi comme matériau d'enrobage afin d'améliorer l'encapsulation des huiles et prolonger d'avantage leur diffusion (Chaudhari et al., 2021). De plus, de multiples études ont mis en évidence une activité antifongique du chitosane sur certaines espèces fusarienne et d'autres champignons toxigènes (Zachetti et al., 2019; Loron et al., 2021; Das et al., 2021). Le succès de l'encapsulation des huiles essentielles dans des MSNPs et leur enrobage par du chitosane a été mis en évidence dans ce projet. Les résultats obtenus ont montré que l'encapsulation dans des MSNPs a prolongé le temps du largage des huiles essentielles dans l'environnement et a augmenté l'activité antifongique et antimycotoxines des huiles essentielles testées par rapport à une quantité équivalente d'huiles libres. De surcroît, il a été démontré que les MSNPs seules sans huile essentielle inhibaient la production des enniatines par *F. avenaceum* I496. A notre connaissance, ce résultat original, n'a pas été rapporté précédemment dans la littérature que ce soit pour les enniatines ou d'autres mycotoxines. Une évaluation de l'impact propre des MSNPs dans la production des enniatines et une mise en évidence des mécanismes d'action serait une prolongation intéressante des travaux exposés ici.

L'enrobage de nos nanoproducts avec le chitosane a drastiquement freiné le largage des huiles essentielles dans l'environnement du champignon. En effet, l'enrobage des nanoparticules de silice imbibées des huiles essentielles par le chitosane a réussi. Cependant, une couche épaisse de chitosane se serait déposée sur la surface des particules créant ainsi un réseau dense de polymères empêchant toute diffusion des huiles essentielles. Une optimisation de la quantité de chitosane à utiliser pour l'enrobage est nécessaire pour moduler la libération progressive des huiles essentielles dans un milieu aqueux ou sous forme de composés volatils. Les résultats des analyses de l'activité des nanoparticules enrobées de chitosane en contact avec le mycélium n'ont pas montré une activité antifongique observable du chitosane, comme rapporté dans certaines études sur des *Fusarium* spp.. Cela peut être dû au fait que les nanoparticules enrobées étaient disséminées dans un milieu gélosé et non dans un milieu liquide comme dans la plupart des études. Néanmoins, une inhibition de la production des enniatines a été observée. L'inhibition de la production de toxines de certaines espèces fusariennes par du chitosane a été décrite dans la littérature (López-Meneses et al., 2018; Das et al., 2021; Loron et al., 2021). En effet, des études ont montré que le chitosane inhibe la production de DON et de fumonisines par *F. proliferatum* et *F. verticillioides*

respectivement (Zachetti et al., 2019) et a réduit de 39 % la production des TCTB de *F. graminearum* (Loron et al., 2021). L'inhibition de la production des mycotoxines par le chitosane serait expliquée par son pouvoir antioxydant (Loron et al., 2021). De même que pour la silice mésoporeuse, une étude plus approfondie du mécanisme d'action du chitosane est nécessaire pour expliquer les résultats obtenus.



# *Conclusion générale*



## Conclusion générale

Nos travaux de recherches se sont intéressés essentiellement à l'évaluation de la potentielle activité des huiles essentielles pour la maîtrise et le contrôle de la contamination de produits végétaux par des agents phytopathogènes producteurs d'enniatines tels que *Fusarium avenaceum* et *Fusarium acuminatum*. Ces agents sont des acteurs parmi d'autres de la fusariose des épis de céréales (FHB) et affectent de nombreuses autres cultures, cependant les connaissances sur les modalités de production de leurs mycotoxines et la toxicité de celles-ci sur la santé humaine suite à une exposition chronique restent insuffisantes. Il est donc important de concentrer les efforts de recherches dans ce domaine.

Même s'ils demandent à être complétés, nos résultats ont bien mis en évidence l'intérêt de la valorisation des huiles essentielles en vue de la mise en place d'alternatives biosourcées aux fongicides de synthèse standards pour limiter la contamination de certaines espèces de *Fusarium* et lutter contre l'accumulation de leurs mycotoxines. Les huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Thymus capitatus* représentent des candidats intéressants pour la modulation de la production des enniatines par *F. avenaceum* et *F. acuminatum*. Certes, le mécanisme d'action des composés terpéniques des huiles essentielles sur la biosynthèse des mycotoxines et l'éventuelle modulation des expressions de gènes qui régulent cette synthèse restent à être caractérisés. Néanmoins, au cours de cette thèse, il a été démontré que l'activité des huiles essentielles repose sur différentes interactions entre ces composés terpéniques.

La nanoencapsulation, comme décrit dans la littérature, présente une voie de potentialisation d'une huile essentielle en améliorant leurs activités biologiques et en présentant un moyen de protection de cet extrait contre les facteurs physicochimiques externes, prolongeant aussi la libération progressive des composés actifs dans l'environnement. Cependant, des études sur la cytotoxicité de ces nanoproduits méritent d'être réalisées en vue d'assurer la sécurité alimentaire du consommateur final. Par ailleurs, le choix du matériau utilisé est aussi primordial pour son impact environnemental, il est donc aussi essentiel de s'assurer du devenir des nanoparticules dans le sol et de leur impact sur l'équilibre de l'écosystème de la plante.



# *Bibliographie*



## Bibliographie

- Abia, W.A., 2013. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control* 16.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Varzakas, T., 2020. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods* 9, 137. <https://doi.org/10.3390/foods9020137>
- Al-Mughrabi, K.I., Coleman, W.K., Vikram, A., Poirier, R., Jayasuriya, K.E., 2013. Effectiveness of Essential Oils and Their Combinations with Aluminum Starch Octenylsuccinate on Potato Storage Pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 16, 23–31. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.764201>
- Alshannaq, A., Yu, J.-H., 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *IJERPH* 14, 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Álvarez, S.P., López, N.E.L., Lozano, J.M., Negrete, E.A.R., Cervantes, M.E.S., 2016. Plant Fungal Disease Management Using Nanobiotechnology as a Tool, in: Prasad, R. (Ed.), *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 169–192.
- Amri, I., Gargouri, S., Hamrouni, L., Hanana, M., Fezzani, T., Jamoussi, B., 2012. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *J Pest Sci* 85, 199–207. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0419-0>
- Argyris, J., TeKrony, D., Hershman, D., VanSanford, D., Hall, M., Kennedy, B., Rucker, M., Edge, C., 2005. Fusarium Head Blight Infection following Point Inoculation in the Greenhouse Compared with Movement of *Fusarium graminearum* in Seed and Floral Components. *Crop Sci.* 45, 626–634. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0626>
- Asbahani, A.E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., Mousadik, A.E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 483, 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Asran, M.R., Eraky, A.M.I., 2012. Aggressiveness of Certain *Fusarium graminearum* Isolates on Wheat Seedlings and Relation with their Trichothecene Production. *Asian Network for Scientific Information* 10, 590–609.
- Audenaert, K., Van Broeck, R., Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., Höfte, M., Haesaert, G., 2009. Fusarium head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *Eur J Plant Pathol* 125, 445–458. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9494-3>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balaure, P.C., Boarca, B., Popescu, R.C., Savu, D., Trusca, R., Vasile, B. Ștefan, Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Bolocan, A., Andronescu, E., 2017. Bioactive mesoporous silica nanostructures with anti-microbial and anti-biofilm properties. *International Journal of Pharmaceutics* 531, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.062>
- Beccari, G., Prodi, A., Senatore, M.T., Balmas, V., Tini, F., Onofri, A., Pedini, L., Sulyok, M., Brocca, L., Covarelli, L., 2020. Cultivation Area Affects the Presence of Fungal Communities and Secondary Metabolites in Italian Durum Wheat Grains. *Toxins* 12, 97. <https://doi.org/10.3390/toxins12020097>
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bernardos, A., Marina, T., Žáček, P., Pérez-Esteve, É., Martínez-Mañez, R., Lhotka, M., Kouřimská, L., Pulkrábek, J., Klouček, P., 2015. Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus*

- niger* when loaded into silica mesoporous supports: Antifungal effect of encapsulated essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 2824–2831. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7022>
- Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili, S.T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 54, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
- Bouhdid, S., Skali, S., N., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Amensour, M., Abrini, J., 2008. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology* 7, 1563–1570.
- Boutigny, A.-L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.-N., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113, 746–753. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.02.010>
- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Guaouguaou, F.-E., Benali, T., Balahbib, A., El Omari, N., Taha, D., El-Shazly, M., El Menyiy, N., 2020. Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. *Journal of Ethnopharmacology* 259, 112925. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112925>
- Boyras, N., Ozcan, M., 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology* 107, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.002>
- Brown, N.A., Evans, J., Mead, A., Hammond-Kosack, K.E., 2017. A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection: Transcriptome of symptomless *Fusarium* infection. *Molecular Plant Pathology* 18, 1295–1312. <https://doi.org/10.1111/mpp.12564>
- Burgess, L.W., Forbes, G.A., 1993. Characterization and Distribution of *Fusarium acuminatum* subsp. *Armeniacum* subsp. nov. *Mycologia* 85, 119–124.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Campanella, V., Mandalà, C., Angileri, V., Miceli, C., 2020. Management of common root rot and *Fusarium* foot rot of wheat using *Brassica carinata* break crop green manure. *Crop Protection* 130, 105073. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105073>
- Cardiet, G., Fuzeau, B., Barreau, C., Fleurat-Lessard, F., 2012. Contact and fumigant toxicity of some essential oil constituents against a grain insect pest *Sitophilus oryzae* and two fungi, *Aspergillus westerdijkiae* and *Fusarium graminearum*. *J Pest Sci* 85, 351–358. <https://doi.org/10.1007/s10340-011-0400-3>
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, Federica, Senatore, Felice, 2019. Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian Journal of Chemistry* 12, 2704–2712. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.05.017>
- Catalogue Officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France. <https://www.geves.fr/catalogue/>
- Chakroun, Y., Atanasova, V., Jallouli, S., Oueslati, S., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2021a. Tunisian Thyme essential oil for controlling enniatins producing *Fusarium* species. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food* 9, 221–230.
- Chakroun, Y., Oueslati, S., Atanasova, V., Richard-Forget, F., Abderrabba, M., Savoie, J.-M., 2021b. *Ammoides pusilla* Essential Oil: A Potent Inhibitor of the Growth of *Fusarium avenaceum* and Its Enniatin Production. *Molecules* 26, 6906. <https://doi.org/10.3390/molecules26226906>

- Champeil, A., Doré, T., Fourbet, J.F., 2004. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant Science* 166, 1389–1415. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.004>
- Chaudhari, A.K., Dwivedy, A.K., Singh, V.K., Das, S., Singh, A., Dubey, N.K., 2019. Essential oils and their bioactive compounds as green preservatives against fungal and mycotoxin contamination of food commodities with special reference to their nanoencapsulation. *Environ Sci Pollut Res* 26, 25414–25431. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05932-2>
- Chaudhari, A.K., Singh, V.K., Das, S., Dubey, N.K., 2021. Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system. *Food and Chemical Toxicology* 149, 112019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112019>
- Chauhan, R., Singh, J., Sachdev, T., Basu, T., Malhotra, B.D., 2016. Recent advances in mycotoxins detection. *Biosensors and Bioelectronics* 81, 532–545. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.004>
- Chekali, S., Gargouri, S., Rezgoui, M., Paulitz, T., Asraoui, B.N., 2016. Impacts of previous crops on Fusarium foot and root rot, and on yields of durum wheat in North West Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 55, 253–261. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-17933](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-17933)
- Cheli, F., Battaglia, D., Gallo, R., Dell’Orto, V., 2014. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control* 37, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.059>
- Christ, D.S., Gödecke, R., von Tiedemann, A., Varrelmann, M., 2011. Pathogenicity, Symptom Development, and Mycotoxin Formation in Wheat by *Fusarium* Species Frequently Isolated from Sugar Beet. *Phytopathology*® 101, 1338–1345. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0003>
- Clara, C., Matasyoh, J.C., Wagara, I.N., Nakuvuma, J., n.d. Antifungal Activity of *Monothotaxis littoralis* essential oil against mycotoxigenic fungi isolated from maize 8.
- Cook, C.M., Lanaras, T., 2016. Essential Oils: Isolation, Production and Uses, in: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 552–557. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00261-0>
- Cowger, C., Smith, J., Boos, D., Bradley, C.A., Ransom, J., Bergstrom, G.C., 2020. Managing a Destructive, Episodic Crop Disease: A National Survey of Wheat and Barley Growers’ Experience With Fusarium Head Blight. *Plant Disease* 104, 634–648. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1803-SR>
- Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F., Miedaner, T., 2004. Genetic Mapping of Pathogenicity and Aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) Toward Wheat. *Phytopathology*® 94, 520–526. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.5.520>
- da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* 166, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22, 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)
- Dambolena, J.S., López, A.G., Cánepa, M.C., Theumer, M.G., Zygadlo, J.A., Rubinstein, H.R., 2008. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon* 51, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.005>
- Dambolena, J.S., López, A.G., Meriles, J.M., Rubinstein, H.R., Zygadlo, J.A., 2012. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure–property–activity relationship study. *Food Control* 28, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.008>
- Das, S., Singh, V.K., Dwivedy, A.K., Chaudhari, A.K., Deepika, Dubey, N.K., 2021. Eugenol loaded chitosan nanoemulsion for food protection and inhibition of Aflatoxin B1 synthesizing genes based on molecular docking. *Carbohydrate Polymers* 255, 117339. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117339>

- de Matos, S.P., Lucca, L.G., Koester, L.S., 2019. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. *Talanta* 195, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.029>
- D’Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183–205. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00059-0)
- Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B. M., 2003. Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals, in: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B. Michael (Eds.), *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 755–768. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_10)
- Ebadollahi, A., Sendi, J.J., Aliakbar, A., 2017. Efficacy of Nanoencapsulated Thymus ericalyx and Thymus kotschyanus Essential Oils by a Mesoporous Material MCM-41 Against Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 110, 2413–2420. <https://doi.org/10.1093/jee/tox234>
- Ederli, L., Beccari, G., Tini, F., Bergamini, I., Bellezza, I., Romani, R., Covarelli, L., 2021. Enniatin B and Deoxynivalenol Activity on Bread Wheat and on Fusarium Species Development. *Toxins* 13, 728. <https://doi.org/10.3390/toxins13100728>
- Elieh-Ali-Komi, D., Hamblin, M.R., 2017. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials 24.
- Eranthodi, A., Schneiderman, D., Harris, L.J., Witte, T.E., Sproule, A., Hermans, A., Overy, D.P., Chatterton, S., Liu, J., Li, T., González-Peña Fundora, D., Zhao, W., Foroud, N.A., 2020. Enniatin Production Influences Fusarium avenaceum Virulence on Potato Tubers, but not on Durum Wheat or Peas. *Pathogens* 9, 75. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020075>
- Esmaeili Taheri, A., Chatterton, S., Foroud, N.A., Gossen, B.D., McLaren, D.L., 2017. Identification and community dynamics of fungi associated with root, crown, and foot rot of field pea in western Canada. *Eur J Plant Pathol* 147, 489–500. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1017-4>
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations. France: Council of Europe; 2007.
- Fakhfakh, M.M., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Elias, E.M., Daaloul, A., 2011. Identification and pathogenicity assessment of Fusarium spp. sampled from durum wheat fields in Tunisia. *African Journal of Biotechnology* 10, 6529–6539. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2453>
- Fanelli, F., Ferracane, R., Ritieni, A., Logrieco, A.F., Mulè, G., 2014. Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *J Appl Microbiol* 116, 390–399. <https://doi.org/10.1111/jam.12371>
- Ferreira, F.M.D., Hirooka, E.Y., Ferreira, F.D., Silva, M.V., Mossini, S.A.G., Machinski Jr, M., 2018. Effect of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil in fungus control and deoxynivalenol production of *Fusarium graminearum* Schwabe *in vitro*. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35, 2168–2174. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1520397>
- Ferrigo, D., Raiola, A., Causin, R., 2016. Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules* 21, 627. <https://doi.org/10.3390/molecules21050627>
- Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M.C., Massad, W., Ramirez, M.L., 2013. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology* 167, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.005>
- Ficheux, A.S., Sibiril, Y., Parent-Massin, D., 2013. Effects of beauvericin, enniatin b and moniliformin on human dendritic cells and macrophages: An *in vitro* study. *Toxicon* 71, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.024>

- Fraternale, D., Ricci, D., Epifano, F., Curini, M., 2004. Composition and Antifungal Activity of Two Essential Oils of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Essential Oil Research* 16, 617–622. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698810>
- Gao, T., Zhou, H., Zhou, W., Hu, L., Chen, J., Shi, Z., 2016. The Fungicidal Activity of Thymol against *Fusarium graminearum* via Inducing Lipid Peroxidation and Disrupting Ergosterol Biosynthesis. *Molecules* 21, 770. <https://doi.org/10.3390/molecules21060770>
- Gardiner, D.M., Kazan, K., Praud, S., Torney, F.J., Rusu, A., Manners, J.M., 2010. Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. *BMC Plant Biol* 10, 289. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-289>
- Gauthier, L., Bonnin-Verdal, M.-N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Richard-Forget, F., Atanasova-Penichon, V., 2016. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 221, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.005>
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., 2020. *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4788–4798. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00411>
- Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K., Brandt, M.E., Brown, D.W., Burgess, L.W., Chulze, S., Coleman, J.J., Correll, J.C., Covert, S.F., Crous, P.W., Cuomo, C.A., De Hoog, G.S., Di Pietro, A., Elmer, W.H., Epstein, L., Frandsen, R.J.N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A.E., Gordon, T.R., Gregory, N.F., Hammond-Kosack, K.E., Hanson, L.E., Jimenez-Gasco, M. del M., Kang, S., Kistler, H.C., Kuldau, G.A., Leslie, J.F., Logrieco, A., Lu, G., Lysøe, E., Ma, L.-J., McCormick, S.P., Migheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, R.C., Proctor, R.H., Rehner, S.A., Robert, V.A.R.G., Rooney, A.P., bin Salleh, B., Scandiani, M.M., Scauflaire, J., Short, D.P.G., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B.A., Sutton, D.A., Thrane, U., Trail, F., Van Diepeningen, A., VanEtten, H.D., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, T.J., Wingfield, M.J., Xu, J.-R., Yang, X.-B., Yli-Mattila, T., Zhang, N., 2013. One Fungus, One Name: Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use. *Phytopathology* 103, 400–408. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE>
- Ghayempour, S., Montazer, M., 2016. Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: Focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. *Journal of Microencapsulation* 33, 497–510. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1216187>
- Gill, T.A., Li, J., Saenger, M., Scofield, S.R., 2016. Thymol-based submicron emulsions exhibit antifungal activity against *Fusarium graminearum* and inhibit *Fusarium* head blight in wheat. *J Appl Microbiol* 121, 1103–1116. <https://doi.org/10.1111/jam.13195>
- Glynn, N.C., Hare, M.C., Parry, D.W., Edwards, S.G., 2005. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status. *Mycological Research* 109, 872–880. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003370>
- Gonçalves, D.C., Tebaldi de Queiroz, V., Costa, A.V., Lima, W.P., Belan, L.L., Moraes, W.B., Pontes Póvoa Iorio, N.L., Corrêa Póvoa, H.C., 2021. Reduction of *Fusarium* wilt symptoms in tomato seedlings following seed treatment with *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Crop Protection* 141, 105487. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105487>
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515–525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>



- Goudjil, M.B., Zighmi, S., Hamada, D., Mahcene, Z., Bencheikh, S.E., Ladjel, S., 2020. Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany* 128, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.020>
- Grove, J.F., Pople, M., 1980. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia* 70, 103–105. <https://doi.org/10.1007/BF00443075>
- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., Berthiller, F., 2017. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 65, 7052–7070. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413>
- H, H., A, R., M, O., Ci, S., I, J., 2017. In-vitro Study of Anti-Fusarium Effect of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol. *J Plant Pathol Microbiol* 08. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000423>
- Hamrouni, L., Hanana, M., Amri, I., Romane, A.E., Gargouri, S., Jamoussi, B., 2015. Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* 48, 145–158. <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.884667>
- Hanana, M., Mansour, M.B., Algabr, M., Amri, I., Gargouri, S., Romane, A., Jamoussi, B., Hamrouni, L., 2017. Potential Use of Essential oils from Four Tunisian Species of Lamiaceae: Biological Alternative for Fungal and Weed Control. *Rec. Nat. Prod.* 12.
- Hasheminejad, N., Khodaiyan, F., Safari, M., 2019. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food Chemistry* 275, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.085>
- Herrmann, M., Zocher, R., Haese, A., 1996. Enniatin production by fusarium strains and its effect on potato tuber tissue. *Appl Environ Microbiol* 62, 393–398. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.393-398.1996>
- Hill, J.P., Blunt, D.L., 1994. Wheat seedling response to root infection by *Cochliobolus sativus* and *Fusarium acuminatum*. *Plant Disease* 78, 1150–1152.
- Horky, P., Skalickova, S., Baholet, D., Skladanka, J., 2018. Nanoparticles as a Solution for Eliminating the Risk of Mycotoxins. *Nanomaterials* 8, 727. <https://doi.org/10.3390/nano8090727>
- Janatova, A., Bernardos, A., Smid, J., Frankova, A., Lhotka, M., Kourimská, L., Pulkrabek, J., Kloucek, P., 2015. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products* 67, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.019>
- Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M.T., Said, S., 2018. Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25, 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.050>
- Jeribi, C., Karoui, I.J., Hassine, D.B., Abderrabba, M., 2012. Comparative Study of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Schinus terebinthifolius* RADDI Fruits and Leaves Essential Oils 3, 7.
- Jestoi, M., 2008. Emerging *Fusarium* -Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 21–49. <https://doi.org/10.1080/10408390601062021>
- Ji, H., Kim, H., Beuchat, L.R., Ryu, J.-H., 2019. Synergistic antimicrobial activities of essential oil vapours against *Penicillium corylophilum* on a laboratory medium and beef jerky. *International Journal of Food Microbiology* 291, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.023>
- Jia, P., Liang, J., Yang, S., Zhang, S., Liu, J., Liang, Z., Li, F., Zeng, Q., Fang, Z., Liao, B., Shu, W., Cadotte, M.W., Li, J., 2020. Plant diversity enhances the reclamation of degraded lands by stimulating plant-soil feedbacks. *J Appl Ecol* 1365-2664.13625. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13625>
- Kalagatur, N.K., Mudili, V., Siddaiah, C., Gupta, V.K., Natarajan, G., Sreepathi, M.H., Vardhan, B.H., Putcha, V.L.R., 2015. Antagonistic activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil on growth and zearalenone production by *Fusarium graminearum* in maize grains. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00892>

- Kalagatur, N.K., Nirmal Ghosh, O.S., Sundararaj, N., Mudili, V., 2018. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles Encapsulated With *Cymbopogon martinii* Essential Oil on Plant Pathogenic Fungi *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Pharmacology* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00610>
- Kammoun, L.G., Gargouri, S., Hajlaoui, M.R., Marrakchi, M., 2009. Occurrence and Distribution of *Microdochium* and *Fusarium* Species Isolated from Durum Wheat in Northern Tunisia and Detection of Mycotoxins in Naturally Infested Grain. *Journal of Phytopathology* 157, 546–551. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01522.x>
- Kapustová, M., Granata, G., Napoli, E., Puškárová, A., Bučková, M., Pangallo, D., Geraci, C., 2021. Nanoencapsulated Essential Oils with Enhanced Antifungal Activity for Potential Application on Agri-Food, Material and Environmental Fields. *Antibiotics* 10, 31. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010031>
- Karlsson, I., Persson, P., Friberg, H., 2021. *Fusarium* Head Blight From a Microbiome Perspective. *Front. Microbiol.* 12, 628373. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628373>
- Khaneghah, A.M., Fakhri, Y., Gahruie, H.H., Niakousari, M., Sant'Ana, A.S., 2019. Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983-2017): A global systematic review. *Trends Food Sci. Technol.* 91, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.007>
- Kresge, C.T., 1992. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* pp.710-712.
- Krzyśko-Łupicka, T., Sokół, S., Piekarska-Stachowiak, A., 2020. Evaluation of Fungistatic Activity of Eight Selected Essential Oils on Four Heterogeneous *Fusarium* Isolates Obtained from Cereal Grains in Southern Poland. *Molecules* 25, 292. <https://doi.org/10.3390/molecules25020292>
- Kujur, A., Kumar, A., Yadav, A., Prakash, B., 2020. Antifungal and aflatoxin B1 inhibitory efficacy of nanoencapsulated *Pelargonium graveolens* L. essential oil and its mode of action. *LWT* 130, 109619. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109619>
- Lahouar, A., Crespo-Sempere, A., Marín, S., Saïd, S., Sanchis, V., 2015. Toxigenic molds in Tunisian and Egyptian sorghum for human consumption. *Journal of Stored Products Research* 63, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.07.001>
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91, 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Laraba, I., Busman, M., Geiser, D.M., O'Donnell, K., 2022. Phylogenetic Diversity and Mycotoxin Potential of Emergent Phytopathogens within the *Fusarium tricinctum* Species Complex. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-21-0394-R>
- Lasram, S., Zemni, H., Hamdi, Z., Chenenaoui, S., Houissa, H., Saidani Tounsi, M., Ghorbel, A., 2019. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 134, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.037>
- Leslie, J.F., Moretti, A., Mesterházy, Á., Ameye, M., Audenaert, K., Singh, P.K., Richard-Forget, F., Chulze, S.N., Ponte, E.M.D., Chala, A., Battilani, P., Logrieco, A.F., 2021. Key Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains. *Toxins* 13, 725. <https://doi.org/10.3390/toxins13100725>
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The fusarium laboratory manual*, 1st ed. ed. Blackwell Pub, Ames, Iowa.
- Liu, C., Van der Fels-Klerx, H.J., 2021. Quantitative Modeling of Climate Change Impacts on Mycotoxins in Cereals: A Review. *Toxins* 13, 276. <https://doi.org/10.3390/toxins13040276>
- Logrieco, A., Altomare, C., Moretti, A., Bottalico, A., 1992. Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycological Research* 96, 518–523. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81101-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81101-5)
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops, in: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M.

- (Eds.), *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 645–667. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_1)
- López-Meneses, A.K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Rodríguez-Félix, F., Mouriño-Pérez, R.R., Cortez-Rocha, M.O., 2018. *Schinus molle* L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT* 96, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.013>
- Loron, A., Navikaitė-Šnipaitienė, V., Rosliuk, D., Rutkaitė, R., Gardrat, C., Coma, V., 2021. Polysaccharide Matrices for the Encapsulation of Tetrahydrocurcumin—Potential Application as Biopesticide against *Fusarium graminearum*. *Molecules* 26, 3873. <https://doi.org/10.3390/molecules26133873>
- Luo, Y., Liu, X., Li, J., 2018. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control* 89, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.016>
- Mahboubi, M., Kazempour, N., 2014. Chemical Composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita*). *Songklanakar Journal of Science and Technology* 18.
- Mahnine, N., Meca, G., Elabidi, A., Fekhaoui, M., Saoiabi, A., Font, G., Mañes, J., Zinedine, A., 2011. Further data on the levels of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in breakfast and infant cereals from Morocco. *Food Chemistry* 124, 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.058>
- Maranghi, F., Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Rocca, C.L., Felice, G.D., Butteroni, C., Corinti, S., Barletta, B., Cordelli, E., Pacchierotti, F., Eleuteri, P., Villani, P., Hegarat, L.L., Fessard, V., Reale, O., 2018. In vivo toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB). *EFS3* 15. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1406>
- Marín, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2012. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology* 31, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.014>
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Marín, S., Velluti, A., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiology* 21, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.08.002>
- Marques, H.M.C., 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 313–326. <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>
- Martins, N.F., Bresso, E., Togawa, R.C., Urban, M., Antoniow, J., Maigret, B., Hammond-Kosack, K., 2016. Searching for Novel Targets to Control Wheat Head Blight Disease—I-Protein Identification, 3D Modeling and Virtual Screening. *AiM* 06, 811–830. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.611079>
- Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V., Vannacci, G., 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology* 158, 98–106. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052639-0>
- Matasyoh, J., Wagara, I., Nakavuma, J., Chepkorir, R., 2014. Chemical composition and antifungal activity of *Piper capense* oil against mycotoxigenic *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Bio. Chem. Sci* 7, 1441. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v7i4.2>
- Matusinsky, P., Zouhar, M., Pavela, R., Novy, P., 2015. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products* 67, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.022>
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., Dwivedy, A.K., 2021. Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Front. Sustain. Food Syst.* 5, 653420. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>

- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J., 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* 3, 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- Mechergui, K., Coelho, J.A., Serra, M.C., Lamine, S.B., Boukhchina, S., Khouja, M.L., 2010. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1745–1749. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4011>
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., Magan, N., 2017. Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews* 31, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.04.002>
- Mergoum, M., Hill, J.P., Quick, J.S., 1998. Evaluation of Resistance of Winter Wheat to *Fusarium acuminatum* by Inoculation of Seedling Roots with Single, Germinated Macroconidia. *Plant Disease* 82, 300–302. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.3.300>
- Merhej, J., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2011. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.008>
- Meyer-Warnod, B., 1984. Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & flavorist* 9, 93–104.
- Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrouf, A., Najjaa, H., Neffati, M., 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie* 13, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.09.008>
- Mohamed, A., Olfa, B., Jemâa, J.M.B., Haouel, S., Manef, A., 2018. Comparative Insecticidal Activity of *Mentha pulegium* L. and *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Essential Oils against the Red Flour Beetle: *Tribolium Castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae) 8.
- Morcia, C., Malnati, M., Terzi, V., 2011. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A* 1–8. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>
- Munkvold, G.P., Proctor, R.H., Moretti, A., 2021. Mycotoxin Production in *Fusarium* According to Contemporary Species Concepts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 59, 373–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-102825>
- Mutlu-Ingok, A., Devcioglu, D., Dikmetas, D.N., Karbancioglu-Guler, F., Capanoglu, E., 2020. Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. *Molecules* 25, 4711. <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>
- Naveen Kumar, K., Venkataramana, M., Allen, J.A., Chandranayaka, S., Murali, H.S., Batra, H.V., 2016. Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. *LWT - Food Science and Technology* 69, 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.005>
- Oliveira, R.C., Carvajal-Moreno, M., Correa, B., Rojo-Callejas, F., 2020. Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry* 315, 126096. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126096>
- Olleik, H., Nicoletti, C., Lafond, M., Courvoisier-Dezord, E., Xue, P., Hijazi, A., Baydoun, E., Perrier, J., Maresca, M., 2019. Comparative Structure–Activity Analysis of the Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of the Fungal Cyclohexadepsipeptides Enniatins and Beauvericin. *Toxins* 11, 514. <https://doi.org/10.3390/toxins11090514>
- Orlando, B., Grignon, G., Vitry, C., Kashefifard, K., Valade, R., 2019. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Res* 35, 369–380. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00363-x>

- Oueslati, S., Meca, G., Mliki, A., Ghorbel, A., Mañes, J., 2011. Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control* 22, 1373–1377. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.015>
- Parikh, L., Agindotan, B.O., Burrows, M.E., 2021. Antifungal Activity of Plant-Derived Essential Oils on Pathogens of Pulse Crops. *Plant Disease* 105, 1692–1701. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1401-RE>
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLEOD, L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals? a review. *Plant Pathology* 44, 207–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x>
- Paškevičius, A., Švedienė, J., Levinskaitė, L., Repečkienė, J., Raudonienė, V., Melvydas, V., 2014. THE EFFECT OF BACTERIA AND ESSENTIAL OILS ON MYCOTOXIN PRODUCERS ISOLATED FROM FEED OF PLANT ORIGIN. *VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA* 9.
- Perczak, A., 2019. Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds. *Archives of Microbiology* 13.
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P., 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals, in: Xu, X., Bailey, J.A., Cooke, B.M. (Eds.), *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 731–742. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_8)
- Pitt, J.I., Taniwaki, M.H., Cole, M.B., 2013. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control* 32, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.023>
- Ponts, N., 2015. Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01234>
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control* 47, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>
- Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G., 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* 47, 927–931. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.010>
- Prasad, R. (Ed.), 2016. *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology, Fungal Biology*. Springer International Publishing, Cham.
- Prosperini, A., Berrada, H., Ruiz, M.J., Caloni, F., Coccini, T., Spicer, L.J., Perego, M.C., Lafranconi, A., 2017. A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Front. Public Health* 5, 304. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00304>
- Qiu, C., Chang, R., Yang, J., Ge, S., Xiong, L., Zhao, M., Li, M., Sun, Q., 2017. Preparation and characterization of essential oil-loaded starch nanoparticles formed by short glucan chains. *Food Chemistry* 221, 1426–1433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.009>
- Rabie, C.J., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Lübben, A., Marasas, W.F., 1986. T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Appl Environ Microbiol* 52, 594–596. <https://doi.org/10.1128/aem.52.3.594-596.1986>
- Règlement CE 856/2005 European Commission - Règlement (EC) No 856/2005 de la commission du 06 Juin 2005 modifiant le règlement (CE) No 466/2001 en ce qui concerne les toxines du *Fusarium*, L143/3. *Journal Officiel de l'Union Européenne* 1–6.
- Règlement CE 1126/2007 Règlement (CE) No 1126/2007 de la commision du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. *Journal Officiel de l'Union Européenne* 4.
- Roselló, J., Sempere, F., Sanz-Berzosa, I., Chiralt, A., Santamarina, M.P., 2015. Antifungal Activity and Potential Use of Essential Oils Against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 18, 359–367. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1010601>

- Saghrouchni, H., El Barnossi, A., Salamatullah, A.M., Bourhia, M., Alzahrani, A., Alkaltham, M.S., Alyahya, H.K., Tahiri, N.E.H., Imtara, H., Var, I., 2021. Carvacrol: A Promising Environmentally Friendly Agent to Fight Seeds Damping-Off Diseases Induced by Fungal Species. *Agronomy* 11, 985. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050985>
- Saglam, N., Yesilada, O., Cabuk, A., Sam, M., Saglam, S., Ilk, S., Emul, E., Celik, P.A., Gurel, E., 2016. Innovation of Strategies and Challenges for Fungal Nanobiotechnology, in: Prasad, R. (Ed.), *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 25–46.
- Saoud, I., Hamrouni, L., Gargouri, S., Amri, I., Hanana, M., Fezzani, T., Bouzid, S., Jamoussi, B., 2013. Chemical composition, weed killer and antifungal activities of Tunisian thyme (*Thymus capitatus* Hoff. et Link.) essential oils. *Acta Alimentaria* 42, 417–427. <https://doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.3.15>
- Sattary, M., Amini, J., Hallaj, R., 2020. Antifungal activity of the lemongrass and clove oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against wheat's take-all disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 170, 104696. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104696>
- Schuenzel, K.M., Harrison, M.A., 2002. Microbial Antagonists of Foodborne Pathogens on Fresh, Minimally Processed Vegetables. *Journal of Food Protection* 65, 1909–1915. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.12.1909>
- Šegvić Klarić, M., Kosalec, I., Mastelić, J., Piecková, E., Pepeljnak, S., 2007. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology* 44, 36–42. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02032.x>
- Senatore, M.T., Ward, T.J., Cappelletti, E., Beccari, G., McCormick, S.P., Busman, M., Laraba, I., O'Donnell, K., Prodi, A., 2021. Species diversity and mycotoxin production by members of the *Fusarium tricinctum* species complex associated with *Fusarium* head blight of wheat and barley in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 358, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109298>
- Shcherbakova, L., Mikityuk, O., Arslanova, L., Stakheev, A., Erokhin, D., Zavriev, S., Dzhavakhiya, V., 2021. Studying the Ability of Thymol to Improve Fungicidal Effects of Tebuconazole and Difenoconazole Against Some Plant Pathogenic Fungi in Seed or Foliar Treatments. *Front. Microbiol.* 12, 629429. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629429>
- Shikur Gebremariam, E., Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T.C., Erginbas-Orakci, G., Karakaya, A., Dababat, A.A., 2018. Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. *Eur J Plant Pathol* 150, 387–399. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1285-7>
- Simpson, D.R., Weston, G.E., Turner, J.A., Jennings, P., Nicholson, P., 2001. Differential Control of Head Blight Pathogens of Wheat by Fungicides and Consequences for Mycotoxin Contamination of Grain. *European Journal of Plant Pathology* 107, 421–431.
- Sing, K.S.W., Haber, J., Kerker, M., Wolfram, E., Block, J.H., Churaev, N.V., Everett, D.H., Hansen, R.S., Haul, R.A.W., Hightower, J.W., Hunter, R.J., 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY* 57, 603–619.
- Slowing, I.L., Vivero-Escoto, J.L., Trewyn, B.G., Lin, V.S.-Y., 2010. Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications. *J. Mater. Chem.* 20, 7924. <https://doi.org/10.1039/c0jm00554a>
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., Hymery, N., 2016. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects 36.
- Souhail, N., Sifaoui, I., Ben Hassine, D., Bleton, J., Bonose, M., Moussa, F., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., Abderrabba, M., 2017. *Ammoides pusilla* (Apiaceae) essential oil: Activity against

- Acanthamoeba castellanii Neff. *Experimental Parasitology* 183, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.011>
- Svingen, T., Lund Hansen, N., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Jensen, U., Have Rasmussen, P., 2017. Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform: OCCURRENCE AND TOXICITY ASSESSMENT MYCOTOXINS IN DANISH GRAINS. *Environmental Toxicology* 32, 1658–1664. <https://doi.org/10.1002/tox.22367>
- Tabti, L., Dib, M.E.A., Djabou, N., Nassira Gaouar Benyelles, Paolini, J., Costa, J., Muselli, A., 2014a. Control of fungal pathogens of Citrus sinensis L. by essential oil and hydrosol of Thymus capitatus L. *Journal of Applied Botany and Food Quality*; 87; 279-285. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2014.087.039>
- Tabti, L., Dib, M.E.A., Gaouar, N., Samira, B., Tabti, B., 2014b. Antioxidant and Antifungal Activity of Extracts of the Aerial Parts of Thymus capitatus (L.) Hoffmanns Against Four Phytopathogenic Fungi of Citrus sinensis. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 9, 49–54. <https://doi.org/10.17795/jjnpp-13972>
- Tefiani, C., Riazi, A., Belbachir, B., Lahmar, H., Aazza, S., Figueiredo, A.C., Miguel, M.G., 2016. Ammoides pusilla (Brot.) Breistr. from Algeria: Effect of harvesting place and plant part (leaves and flowers) on the essential oils chemical composition and antioxidant activity. *Open Chemistry* 14, 343–350. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0037>
- Tefiani, C., Riazi, A., Youcefi, F., Aazza, S., Gago, C., Faleiro, M.L., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Vioque, J., Miguel, M.G., 2015. Ammoides pusilla (Apiaceae) and Thymus munbyanus (Lamiaceae) from Algeria essential oils: chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Research* 27, 131–139. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1006739>
- Tisserand, R., Young, R., 2014. Essential oil composition, in: *Essential Oil Safety*. Elsevier, pp. 5–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06241-4.00002-3>
- Trail, F., 2009. For Blighted Waves of Grain: Fusarium graminearum in the Postgenomics Era. *Plant Physiology* 149, 103–110. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129684>
- Tucker, J.B., 2001. The “yellow rain” controversy: Lessons for arms control compliance. *The Nonproliferation Review* 8, 25–42. <https://doi.org/10.1080/10736700108436836>
- Turek, C., Stintzing, F.C., 2013. Stability of Essential Oils: A Review: Stability of essential oils.... *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY* 12, 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- United Nations, 2019. *World population prospects Highlights, 2019 revision Highlights, 2019 revision*.
- Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Stępień, Ł., 2020. Fusarium Cyclodepsipeptide Mycotoxins: Chemistry, Biosynthesis, and Occurrence. *Toxins* 12, 765. <https://doi.org/10.3390/toxins12120765>
- Valencia Junca, M.A., Valencia, C., Flórez López, E., Delgado-Ospina, J., Zapata, P.A., Solano, M., Grande Tovar, C.D., 2019. Chitosan Beads Incorporated with Essential Oil of Thymus capitatus: Stability Studies on Red Tilapia Fillets. *Biomolecules* 9, 458. <https://doi.org/10.3390/biom9090458>
- Van der Fels-Klerx, H.J., Focker, M., De Rijk, T., Liu, C., 2021. Mycotoxins in wheat cultivated in the Netherlands: results from eight years of field surveys. *Mycotoxin Res* 37, 183–192. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00427-x>
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of Fusarium verticillioides, F. proliferatum and F. graminearum on maize-based agar media. *Food Microbiology* 21, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.009>
- Visconti, Angelo., Blais, L.A., ApSimon, J.W., Greenhalgh, Roy., Miller, J.David., 1992. Production of enniatins by Fusarium acuminatum and Fusarium compactum in liquid culture: isolation and characterization of three new enniatins, B2, B3, and B4. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1076–1082. <https://doi.org/10.1021/jf00018a034>



- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W., 2008. Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008>
- Walter, S., Nicholson, P., Doohan, F.M., 2010. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* 185, 54–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x>
- Wan, C., Shen, Y., Nisar, M.F., Qi, W., Chen, C., Chen, J., 2019. The Antifungal Potential of Carvacrol against *Penicillium Digitatum* through 1H-NMR Based Metabolomics Approach. *Applied Sciences* 9, 2240. <https://doi.org/10.3390/app9112240>
- Wan, J., Zhong, S., Schwarz, P., Chen, B., Rao, J., 2019. Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chemistry* 291, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.032>
- Wang, G., Xu, J., Sun, Z., Zheng, S., 2020. Surface Functionalization of Montmorillonite with Chitosan and the Role of Surface Properties on Its Adsorptive Performance: A Comparative Study on Mycotoxins Adsorption. *Langmuir* 36, 2601–2611. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03673>
- Wegulo, S., 2012. Factors Influencing Deoxynivalenol Accumulation in Small Grain Cereals. *Toxins* 4, 1157–1180. <https://doi.org/10.3390/toxins411157>
- Wegulo, S.N., Baenziger, P.S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W.W., Hallen-Adams, H., 2015. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection* 73, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.025>
- Windels, C.E., 2000. Economic and Social Impacts of *Fusarium* Head Blight: Changing Farms and Rural Communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*® 90, 17–21. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.17>
- Xu, F., Yang, G., Wang, J., Song, Y., Liu, L., Zhao, K., Li, Y., Han, Z., 2018. Spatial Distribution of Root and Crown Rot Fungi Associated With Winter Wheat in the North China Plain and Its Relationship With Climate Variables. *Front. Microbiol.* 9, 1054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01054>
- Xu, X., Nicholson, P., 2009. Community Ecology of Fungal Pathogens Causing Wheat Head Blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>
- Xue, A., Chen, Y., Voldeng, H., Savard, M., Tian, X., 2008. Biological control of *Fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Cereal Research Communications* 36, 695–699. <https://doi.org/10.1556/CRC.36.2008.Suppl.B.62>
- Yli-Mattila, T., 2011. Detection of Trichothecene-producing *Fusarium* Species in Cereals in Northern Europe and Asia. *Agronomy Research* 9, 521–526.
- Zabka, M., Pavela, R., 2018. Review Chapter: *Fusarium* Genus and Essential Oils, in: Mérillon, J.-M., Riviere, C. (Eds.), *Natural Antimicrobial Agents*. Springer International Publishing, Cham, pp. 95–120.
- Zachetti, V., Cendoya, E., Nichea, M., Chulze, S., Ramirez, M., 2019. Preliminary Study on the Use of Chitosan as an Eco-Friendly Alternative to Control *Fusarium* Growth and Mycotoxin Production on Maize and Wheat. *Pathogens* 8, 29. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010029>
- Zairi, A., Nouir, S., Zarrouk, A., Haddad, H., Khélifa, A., Achour, L., Tangy, F., Chaouachi, M., Trabelsi, M., 2019. Chemical composition, Fatty acids profile and Biological properties of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns, essential Oil. *Sci Rep* 9, 20134. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56580-y>
- Zhang, H., Apaliya, M.T., Mahunu, G.K., Chen, L., Li, W., 2016. Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review. *Trends in Food Science & Technology* 51, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.012>
- Zinedine, A., Meca, G., Mañes, J., Font, G., 2011. Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in Morocco. *Food Control* 22, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.05.002>

## Activité antifongique et antimycotoxines d'huiles essentielles tunisiennes sur des souches de *Fusarium* productrices d'enniatiines et évaluation de leur potentialisation par nanoencapsulation

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques qui s'accumulent dans les matrices alimentaires. Elles sont produites par plusieurs genres de champignons filamenteux. La contamination des cultures par ces champignons entraîne une perte économique significative et la contamination par leurs mycotoxines présente un danger important pour la santé animale et humaine. Une augmentation de l'occurrence des « mycotoxines émergentes » a été enregistrée dans le monde au cours de la dernière décennie. Ce terme inclut les mycotoxines qui ne sont ni surveillées ni soumises à une réglementation. Les enniatiines (ENNs) sont un des groupes principaux des mycotoxines émergentes. Elles sont produites par plusieurs espèces de *Fusarium* qui participent à la fusariose des épis de céréales, mais sont moins étudiées que d'autres *Fusarium* spp. Dans ce travail, des lots de grains asymptomatiques ont été analysés pour leurs teneurs en mycotoxine et les *Fusarium* spp. présents afin de mieux cerner les risques de contamination des blés tunisiens. Dans un lot contaminé en ENNs, quatre isolats ont été obtenus, dont deux étaient des producteurs d'ENN *in vitro*. Leur identification morphologique et à partir de séquences d'ADN ont permis de confirmer l'appartenance de 2 isolats à l'espèce *Fusarium acuminatum*, un membre du complexe d'espèce *Fusarium tricinctum*.

A ce jour les différentes stratégies mises en place pour réduire les infections par *Fusarium* spp. et la contamination par ses mycotoxines dans les denrées partout dans le monde ne sont pas suffisamment efficaces et le développement de solutions alternatives est devenu une priorité. L'utilisation d'huiles essentielles végétales (HEs) pour l'élaboration de fongicides respectueux de l'environnement présente divers avantages : volatilité relativement élevée, caractère biodégradable et acceptation du consommateur. Nous avons testé l'efficacité d'HEs issues de 8 plantes tunisiennes pour leur activité antifongique et d'inhibition de l'accumulation d'ENN sur la souche de *F. acuminatum* et une souche de *F. avenaceum*. Les HEs d'*Ammoides pusilla* et de *Thymus capitatus* ont été sélectionnées, puis leur composition chimique caractérisée, et leurs activités biologiques étudiées en détail. Les HEs limitent le taux de germination des conidies et la vitesse de croissance du mycélium, qu'elles soient en contact dans le milieu de culture ou par l'intermédiaire de leurs composés volatils. Elles inhibent aussi la synthèse des ENNs. Le thymol, composé majoritaire de l'HE d'*A. pusilla* peut être responsable de l'activité antifongique mais n'est pas efficace seul pour inhiber la synthèse d'ENNs.

La faible persistance et la forte sensibilité des HEs à l'oxydation et à l'exposition aux UV limitent leur utilisation à l'état libre en cultures. Afin d'améliorer les conditions d'utilisation et d'augmenter l'applicabilité des formulations bioactives naturelles, l'encapsulation dans des nano-supports est une technologie émergente. L'HE d'*A. pusilla* a été encapsulée dans des nanoparticules de silice mésoporeuse (MSNPs) qui présentent une stabilité élevée, une biocompatibilité, une porosité homogène, une inertie élevée et une facilité de fonctionnalisation. Ce traitement a permis de prolonger le temps de diffusion des composés volatils de l'HE dans l'environnement et a sensiblement augmenté l'activité fongistatique et l'inhibition de l'accumulation d'ENN pour une même quantité d'HE utilisée. Les MSNPs seules limitaient aussi l'accumulation d'ENNs.

Ces travaux ont été les premiers mettre en évidence *F. acuminatum* dans des grains en Tunisie et à caractériser des HEs inhibant la production d'ENNs par *F. avenaceum* et *F. acuminatum*. Ils ouvrent la voie à des développements futurs d'utilisation de ces HEs pour maîtriser ces champignons et leurs mycotoxines, en particulier grâce leur encapsulation dans de la silice mésoporeuse.

**Mots clés :** *Fusarium*, mycotoxines, céréales, huile essentielle, nanoencapsulation

## Antifungal and antimycotoxins activity of Tunisian essential oils against enniatin producing *Fusarium* strains and evaluation of their potentiation using nanoencapsulation

Mycotoxins are toxic secondary metabolites that accumulate in food matrices. They are produced by several genera of filamentous fungi. Contaminations of crops by these fungi results in significant economic loss and the contamination by their mycotoxins presents a significant hazard to animal and human health. An increasing occurrence of "emerging mycotoxins" has been recorded worldwide during the last decade. This term includes mycotoxins that are not monitored or regulated. Enniatiins (ENNs) are one of the main groups of emerging mycotoxins. They are produced by species of *Fusarium* that participate in *Fusarium* head blight of cereals, but are less studied than other *Fusarium* spp. In this work, batches of asymptomatic grains were analyzed for their mycotoxin content and the *Fusarium* spp. present, in order to better identify the risks of contamination of Tunisian wheat. In a lot contaminated with ENNs, four isolates were obtained, two of which were ENNs producers *in vitro*. Their morphological identification and analyses of DNA sequences confirmed their belonging to the *Fusarium acuminatum*, a member of the *Fusarium tricinctum* species complex.

To date, the different strategies to reduce *Fusarium* spp. infections and contamination by its mycotoxins in foodstuffs all over the world are not sufficiently effective and the development of alternative solutions has become a priority. The use of plant essential oils (EOs) for the development of environmentally friendly fungicides has several advantages: relatively high volatility, biodegradability and consumer acceptance. We tested the efficacy of EOs from 8 Tunisian plants for their antifungal activity and inhibition of ENNs accumulation on a strain of *F. acuminatum* and a strain of *F. avenaceum*. The EOs of *Ammoides pusilla* and *Thymus capitatus* were selected, then their chemical composition characterized, and their biological activities studied in detail. The EOs limited the germination rate of conidia and the growth rate of mycelium, whether they were in contact with the culture medium or through their volatile compounds. They also inhibited the synthesis of ENNs. Thymol, the major compound in *A. pusilla* EO might be responsible for the antifungal activity but was not effective alone in inhibiting ENNs synthesis.

The low persistence and high sensitivity of EOs to oxidation and UV exposure limits their direct use in fields. In order to improve the conditions of use and to increase the applicability of natural bioactive formulations, encapsulation in nanocarriers is an emerging technology. *A. pusilla* EO was encapsulated in mesoporous silica nanoparticles (MSNPs) which exhibit high stability, biocompatibility, homogeneous porosity, high inertness and ease of functionalization. This treatment prolonged the diffusion time of volatile EOs compounds into the environment and significantly increased fungistatic activity and inhibition of ENNs accumulation for the same amount of EO used. MSNPs alone also limited ENNs accumulation.

This work was the first to identify *F. acuminatum* in grains in Tunisia and to characterize EOs inhibiting ENNs production by *F. avenaceum* and *F. acuminatum*. It opens the way to future developments in the use of these EOs to control these fungi and their mycotoxins, in particular through their encapsulation in mesoporous silica.

**Keywords:** *Fusarium*, mycotoxins, cereals, essential oil, nanoencapsulation