



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم :: **Microbiologie** : Département

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

**Extraction des métabolites secondaires du champignon
entomopathogène, *Beauveria bassiana*, et leur impact sur
l'espèce *Aspergillus niger*.**

Présenté et soutenu par :

Le : 16/07/2019

BOUDJELAL Aicha et BOUCHEFA Imene

Jury d'évaluation :

Président du jury :	M ^{elle} ABDELAZIZ Wided	(M.C.B.- UFM Constantine 1).
Rapporteur :	M ^{me} MIHOUBI Ilhem	(Professeur- UFM Constantine 1).
Examineurs :	M ^{me} GHORRI Sana	(M.C.B.- UFM Constantine 1).
Tutrice :	M ^{me} ZAAMOUCI Ahlem	(M.C.B.- UFM Constantine 1).

**Année universitaire
2018 - 2019**

Remerciements

Nous remercions Dieu le généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et de nous avoir donné le courage et la patience pour terminer ce travail.

Toutes nos infinies gratitudes à notre promoteur, le professeur Mihoubi Ilhem, pour son encadrement, sa qualité humaine, sa patience et son dynamisme et de nous avoir guidé et conseillé pour mener à bien ce travail.

Nos sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils ont fait en acceptant de juger ce travail : Docteur Abdalaziz Wided pour avoir accepté de présider ce jury, et au Docteur Ghorri Sana qui a consacré du temps pour l'examen de ce travail.

Aux Docteur Zaamouchi Ahlem et Benserradj Ouafa nous adressons nos sincères remerciements pour leurs orientations et les innombrables services.

C'est avec un réel plaisir que nous adressons nos sincères reconnaissances et nos profonde gratitude à tous ceux qui ont nous aidé de près ou de loin pour réaliser cette étude.

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail a ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

- ✚ A l'homme, ma précieuse offre du Dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect mon cher père : Ali
- ✚ A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse mon adorable mère : Fatima
- ✚ A mes chères sœurs Hiba & Nihed qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études
- ✚ A ma source de joie (myBae) qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles et pour se soutien morale que dieu le protège et leur offre la chance et le bonheur
- ✚ A mes chers frères Haroune & Ahmed pour leur amour intense pour moi.
- ✚ A mes adorables nièces et neveux Douaa & Nada & Bilel & Med Siraje
- ✚ A ma chère cousine Khaoula
- ✚ A toutes mes amis que j'ai connu jusqu'à maintenant surtout Karim le frère que ma mère n'a pas sauvé
- ✚ Sans oublier mon binôme Imene sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

Aicha.

Dédicace

Louange tout d'abord à Dieu, notre créateur qui nous a donné la force pour terminer ce modeste travail.

C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que Je dédie ce travail :

*A ma chère mère Fatiha , à mon cher père Saadoune,
les deux personnes qui se sont beaucoup sacrifiées pour moi,
m'ont aidée et soutenue,
sans eux je n'aurais eu la volonté d'atteindre ce niveau.*

A ma chère sœur Saoussen qui m'a toujours soutenu.

A mon cher Amine. Dj pour son indéfectible soutien et sa patience infinie.

A ma chère binôme Aicha pour sa entente et sa sympathie

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

A tous mes amis qui ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

Merci !

Imene

Liste des abréviations

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMP : Chloramphénicol

ESI-MS : Ionisation electrospray couplé à la Spectrométrie de masse

H. zea : *Helicoverpa zea*

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

INPV : Institut nationale de protection des végétaux

LC/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LC-APCI-MS : Chromatographie liquide couplée à l'ionisation chimique à pression atmosphérique et à la spectrométrie de masse

MS : Spectrométrie de masse

TOF : Analyseur à temps de vol

UV : Radiations ultraviolettes

Liste des figures

Figure 1. (A) Hyphes de <i>B. Bassiana</i> (B) culture de Beauveria.....	4
Figure 2 . Morphologie de <i>Beauveria bassiana</i> . (A) -Hyphes et mycélium de <i>Beauveria bassiana</i> (B) Culture de <i>B.bassiana</i> sur milieu	5
Figure 3. Spores de <i>B. bassiana</i> : Unités infectieuses.....	6
Figure 4. Schématisation d'une coupe transversale de la cuticule d'un insecte et le mode d'infection d'un champignon entomopathogène.....	7
Figure 5. Schéma du cycle biologique de <i>Beauveria bassiana</i>	10
Figure 6 . Structure chimique de la beauvericine.....	12
Figure 7. Structure chimique de la beauvericine.....	13
Figure 8. (A) tête conidienne d' <i>Aspergillus niger</i> visualisées à l'objectif (40. (B) <i>Aspergillus niger</i> sur milieu M2S5.....	15
Figure 9 . (A et B) culture d' <i>Aspergillus niger</i> sur gélose Sabouraud âgée de 8 jours.....	17
Figure 10: Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore d' <i>A. niger</i>	17
Figure 11. Illustration de la série de dilution décimale.....	21
Figure 12. Ensemencement du milieu de culture.....	21
Figure 13. Décantation (séparation) par l'ampoule a décantée.....	24
Figure 14. Extraction des métabolites secondaires par ROTAVAPOR.....	24
Figure 15. Méthode de diffusion par la technique des puits.....	26
Figure 16. Etude macroscopique et microscopique de <i>Beauveria bassiana</i> (Chabani et Zahri, 2018).....	29
Figure 17 : Développement morphologique de <i>Beauveria bassiana</i> sur milieux de fermentation (Czapek et PDA).....	30
Figure 18 : Extrait brut de la souche <i>Beauveria bassiana</i>	30
Figure 19 : Photo illustrant l'absence de zone d'ihnibition autour des puits ainsi que la contamination inexplicquée des cultures.....	31

Liste des tableaux

Tableau 1 :Aspect macroscopique de <i>Beauveria bassiana</i>	27
Tableau 2 : Aspect microscopique de <i>Beauveria bassiana</i> (G x 40).....	28

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii

Introduction bibliographique

Le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*

1. Généralités sur les champignons.....	2
2. Les champignons entomopathogènes.....	3
2.1. <i>Beauveria bassiana</i>	3
2.1.1. Taxonomie et classification.....	3
2.1.2. Morphologie.....	4
2.1.3 Mode d'infection.....	6
2.1.4. Effets des différents facteurs sur l'efficacité de <i>B.bassiana</i>	10
2.1.5. <i>Beauveria bassiana</i> et lutte microbiologique.....	11
3. Les métabolites produits par <i>Beauveria bassiana</i>	11
3.1. Bassiacridine.....	12
3.2. Beauvericine.....	12
3.3. Bassianolide.....	12
4. La toxicité des métabolites de <i>Beauveria bassiana</i>	13
5. Méthodes d'identification et de détection des métabolites.....	14
5.1. Chromatographie sur Couche Mince.....	14
5.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	14
6. La souche test <i>Aspergillus niger</i>	14
6.1. Habitat.....	15
6.2. Classification.....	15

6.3. Morphologie.....	16
6.4. Pouvoir pathogène.....	18
6.5. L'intérêt dans l'écosystème.....	19

Matériels et méthodes

1. Isolement et Identification du champignon entomopathogène <i>Beauveria bassiana</i>	20
1.1. Prélèvement des échantillons.....	20
1.2. Milieux d'isolement	20
1.3. Méthode d'isolement.....	21
1.4. Purification des souches isolées.....	22
1.5. Méthodes d'identification.....	22
1.5.1. Identification macroscopiques.....	22
1.5.2. Identification microscopique.....	22
2. production des métabolites secondaires élaborés par <i>Beauveria bassiana</i>	23
2.1. Fermentation.....	23
2.2. Extraction	23
2.3. Test de toxicité.....	24
2.3.1. Réactivation de la souche-test.....	24
2.3.2. Bio-essai.....	25

Résultats et discussion

1- L'isolement et l'identification du champignon entomopathogène <i>B.bassiana</i>	26
1.1. Isolement du champignon <i>Beauveria bassiana</i>	26
1.2. Identification	26
1.2.1. Etude macroscopique	26
1.2.2. Etude microscopique	27
2- Extraction des métabolites secondaires élaborés par <i>Beauveria bassiana</i>	29
3- Résultat du test de toxicité sur <i>A. niger</i>	31

Conclusion.....32

Références bibliographique33

Annexes

Résumés

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

Le développement de la microbiologie au cours des deux dernières décennies, a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers à partir des microorganismes, et susceptibles d'être utilisées dans des applications biotechnologiques très étendues (Leveau et Bouix, 1993; Botton *et al.*, 1999). Parmi ces organismes, les champignons entomopathogènes méritent une attention particulière grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et une grande capacité d'adaptation. Ils sont naturellement présents dans l'environnement (sol, air, eau) et jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973; Ferron, 1975).

L'un des microorganismes les plus intéressants appartient à la classe des Ascomycètes : il s'agit de *Beauveria bassiana* qui est reconnu pour les infections qu'il cause chez certains insectes nuisibles (SteinKraus et Tugwell, 1997 ; Snodgrass et Elzen, 1994). Il est considéré comme un bon candidat pour le développement d'insecticides microbiens (Fria et Wraight, 2001 ; Mc Coy, 1990). Il infecte généralement son hôte soit par ingestion, soit par pénétration à travers la cuticule ou par les orifices. L'agent pathogène se multiplie dans l'hôte en lui causant des dommages par destruction des tissus, entraînant sa mort plus ou moins immédiate par septicémie ou toxémie.

Ce mycète (*B. bassiana*) sécrète des métabolites toxiques non-enzymatiques qui ont des activités antibactériennes, antifongiques et insecticides. Ces métabolites incluent la beauvericine, la bassianolide, la cyclosporine, la beauverolide, l'isarolide et l'oosporeine, lesquelles peuvent accélérer le processus infectieux du champignon et affaiblir le système immunitaire de l'hôte (Hajec et St-Leger, 1994).

Dans ce contexte, nous avons choisi notre axe de travail qui vise à mettre en évidence l'effet fongicide de *B. bassiana* contre un champignon pathogène impliqué aussi bien dans les maladies cryptogamiques que dans certaines infections mycosiques chez l'homme. Pour ce faire, notre étude vise les objectifs suivants :

- Isolement de la moisissure *Beauveria bassiana* à partir d'un sol agricole de blé tendre de l'institut nationale de protection des végétaux (INPV) Oued Smar et son identification par l'utilisation des techniques morphologiques.
- Production et extraction des métabolites secondaires de *Beauveria bassiana* par fermentation sur milieu de culture liquide.
- Enfin, mettre en évidence l'effet des toxines de notre souche sur l'espèce *Aspergillus niger*.

1- Généralités sur les champignons

Les champignons constituent un ensemble très diversifié que l'on estime, bien que les chiffres soient approximatifs, à un million d'espèces. Cependant, seulement 14% de ces organismes ont été découverts (Hawksworth et Rossman, 1997 ; Hawksworth, 2001; Neubert *et al.*,2006).

Les champignons sont des eucaryotes et leurs noyaux sont minuscules. Ils sont dépourvus de chlorophylle et de pigments assimilateurs (Genevès, 1990 ; Genevès, 1992). Ils sont aérobies strictes et rarement anaérobies (Mathew,1995 ; Tortora *et al.*, 2003), ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement (Leveau et Bouix, 1993 ; Nicklin *et al.*, 1999).

La structure des champignons repose sur leur appareil végétatif appelé thalle (Hawksworth *et al.*,1994).l'appareil végétatif constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 µm de diamètre. Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium (Chabasse *et al.*2002 modifie).Chez la plupart des champignons les hyphes cloisonnés sont appelés hyphes ségmentés ou séptés, alors que les hyphes qui ne contiennent pas des cloisons sont connus comme étant des cénocytes (Tortora *et al.*,2003).

En effet, les champignons se développent à pH légèrement acide (3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses <15°C ou même parfois à <0°C (Botton *et al.*,1990 ; Guiraud, 1998 ;Tortora *et al.*, 2003).

Les champignons, en général, possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative) et la reproduction sexuée (parfaite). (Senal *et al.*,1993). La plupart des espèces sont, en effet, capables de former des spores, soit à l'intérieurs des sporocystes (chez les champignons inférieurs et à thalles non cloisonnés), soit sur des ramifications différenciées du mycélium (conidiophores) (Davet ;1996).

2- Les champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes représentent plus de 700 espèces de microchampignons (Starnes *et al.*, 1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978 ; Wraight et Roberts, 1987). Ce sont des eucaryotes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse. Ils se présentent parfois sous forme de cellules individuelles, mais le plus souvent sous forme de filaments (hyphes) constituant le mycélium (Humber, 1997 ; Tzean *et al.* 1997).

Les champignons entomopathogènes sont largement distribués avec des gammes d'hôtes restreintes et larges qui ont des potentiels de lutte biologique différents contre les insectes arthropodes et les champignons pathogènes des plantes. Ils ont été parmi les premiers organismes à être utilisés pour le contrôle biologique des ravageurs. La plupart des espèces EPE proviennent des divisions fongiques Ascomycota et Zygomycota ; les Ascomycètes étant auparavant divisés en deux groupes : les Ascomycota et les Deuteromycota.

2-1- *Beauveria bassiana*

Parmi les micro-organismes entomopathogènes ayant un potentiel d'agent de lutte biologique contre les insectes nuisibles, plus de 500 espèces de champignons sont susceptibles d'infecter des insectes (Starnes *et al.*, 1993). *Metarhizium anisopliae* était le premier pathogène utilisé délibérément pour le contrôle d'insecte ravageur par le Russe Eli Metchnikoff (le père de la lutte microbiologique) dans les années 1880.

En 1835, Agostino Bassi de Lodi, précurseur des études des maladies infectieuses, a démontré la pathogénicité de *Beauveria bassiana* (Hyphomycète) envers de nombreux insectes. Cet auteur ayant mis en évidence pour la première fois qu'un micro-organisme pouvait être responsable de maladie infectieuse chez l'animal. Ensuite, *Beauveria sp.* a été décrit par Jean Beauverie en 1911 sous le nom de *Botrytis bassiana*. Le genre a été établi par Vuillemin en 1912 et fut classé dans l'ordre des Hyphomycètes (Mathias de Kouassi, 2001).

2-1-1-Taxonomie et classification

La première contribution taxonomique concernant ce champignon a été réalisée par Balsamo-Crivelli qui a nommé le champignon *Botrytis bassiana* Bals-Criv en reconnaissance à Agostino Bassi qui a montré, en 1835, que ce champignon était l'agent causal d'une maladie des laves du ver à soie. Cette dernière, qui a été désignée sous les noms de mal del segno, calcinaccio, cannellino par les italiens et de (muscardine blanche) par les français, a provoqué

au 18^{ème} et au 19^{ème} siècle une épizootie qui a causé des pertes économiques dans les élevages du ver à soie des pays du sud de l'Europe. Le genre *Beauveria* n'a été formellement identifié que vers le 20^{ème} siècle par Vuillemin (1912) qui a désigné *Botrytis bassiana* Bals-criv comme étant un spécimen type de l'espèce et qu'il a transféré dans le genre *Beauveria* (Figure1).

D'après Taylor (1995) *Beauveria bassiana* est classée comme suit :

- **Règne** : Fungi
- **Phylum** : Ascomycota
- **Classe** : Sordariomycetes
- **Ordre** : Hypocreales
- **Famille** : Clavicipitaceae
- **Genre** : *Beauveria*
- **Espèce** : *Beauveria bassiana* (Bals-criv) (Vuil., 1912).

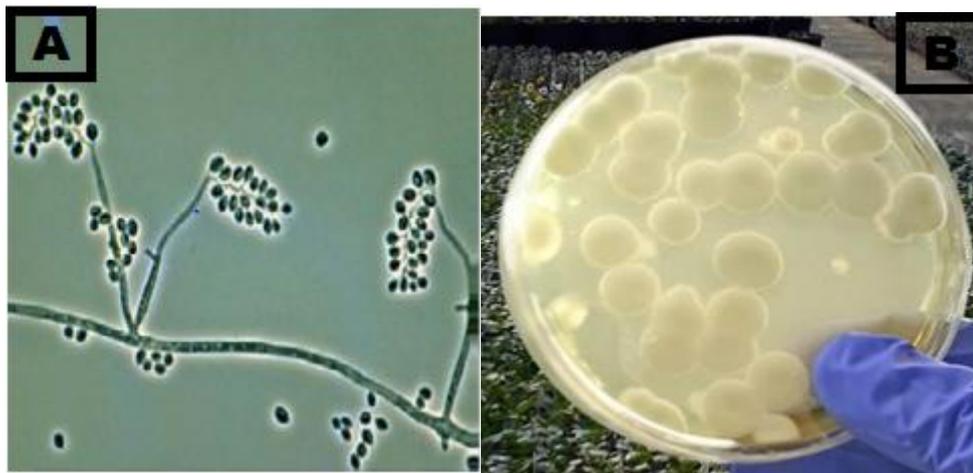


Figure 1 : (A) hyphes de *B.Bassiana*(https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-662004910-insecticida-organico-beauveria-bassiana-polvo-400-gr-_JM#stayOnWeb);
(B) culture de *Beauveria bassiana* (Bernard 2016).

2-1-2-Morphologie

Le champignon *B. bassiana* est une espèce fréquemment retrouvée dans les sols du monde entier. Ce champignon forme des hyphes transparents et septaux de 3,5 ~m de

diamètre (Figure 2.A). Cette espèce produit des colonies cotonneuses de couleur blanchâtre à jaunâtre (Figure 2.B).

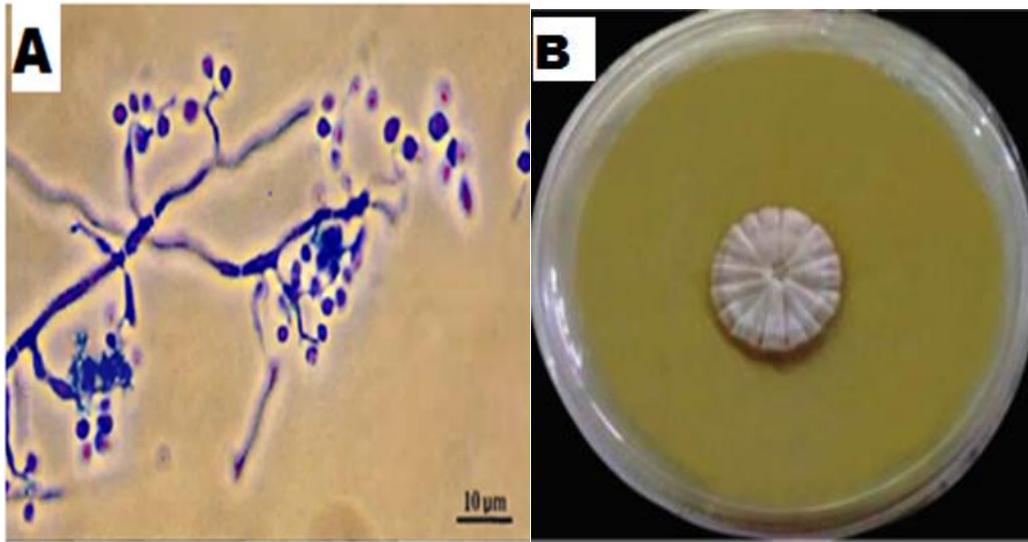


Figure 2 : morphologie de *Beauveria bassiana*. (A) -Hyphes et mycélium de *Beauveria bassiana* (Par David Ellis, source: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/..../beauveria1.gif>); (B) Culture de *B.bassiana* sur milieu P6 (Mondal et Sibashish Baksi,2018).

Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires (Figure 3). Le conidiophore continue de croître après avoir donné naissance aux spores et chaque spore laisse une cicatrice en relief (aspect denticulé). Les bouquets de conidiospores donnent un aspect en "fausse tête". On distingue deux types de spores selon la présence ou l'absence d'oxygène: les conidiospores formées en présence d'air et les blastospores en condition d'anaérobiose. Les conidiospores prennent une forme sphérique ou ovale tandis que les blastospores sont uniquement ovales. Les deux types de spores peuvent avoir le même effet pathogène sur les insectes infectés (Weiser, 1972 et Lipa, 1975).

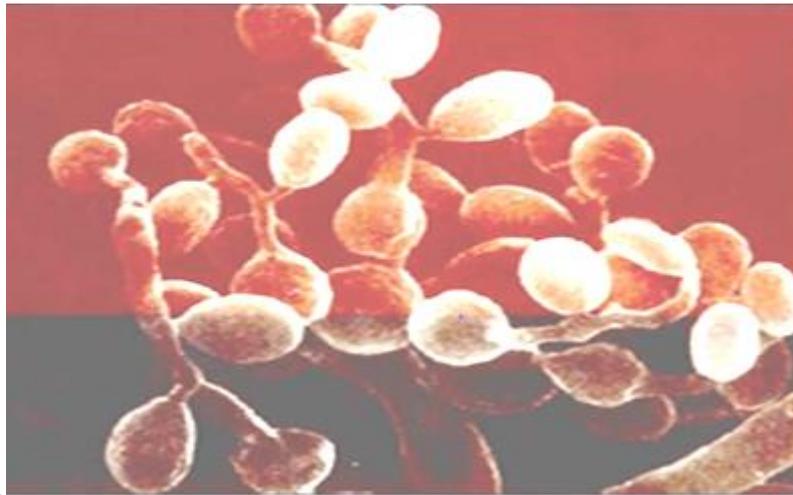


Figure 3 : spores de *B. bassiana*: Unités infectieuses (Par John Bisselt Source : http://www.vertigo.uqam.ca/..../beauveria_bassiana_1.jpg).

2-1-3- Mode d'infection

Le mode d'infection principal des champignons entomopathogènes se fait par contact direct entre les conidies et la cuticule de l'insecte. La cuticule est une couche exosquelettique qui recouvre le corps des insectes. La cuticule est généralement constituée de deux parties principales, soit l'épicuticule et la procuticule (Figure 4) (Klowden, 2007). Ces couches sont percées des canalicules qui débouchent sur l'extérieur pour former des pores. L'épicuticule est une couche mince (de 1 à 4 μm) mais complexe. Elle est fortement résistante à l'eau et aux solvants parce qu'elle est formée de lipides, de cires, de ciment, d'acides gras et de certains composés phénoliques (Nation, 2016). La procuticule est une couche épaisse composée de chitine dans une matrice de protéine. Elle représente jusqu'à 70% du poids sec de la cuticule (Clarkson et Charnley, 1996). La procuticule est divisée en deux couches distinctes, soit l'exocuticule et l'endocuticule. Les types et la quantité des protéines cuticulaires peuvent varier selon les zones anatomiques de l'insecte ainsi que de son stades du développement (Willis *et al.*, 2005). Il existe une autre couche qui se trouve à la base de l'endocuticule appelée l'épiderme et qui est formée de deux couches de phospholipides. L'hémocèle, une cavité interne de l'insecte, se trouve juste au-dessous de l'épiderme.

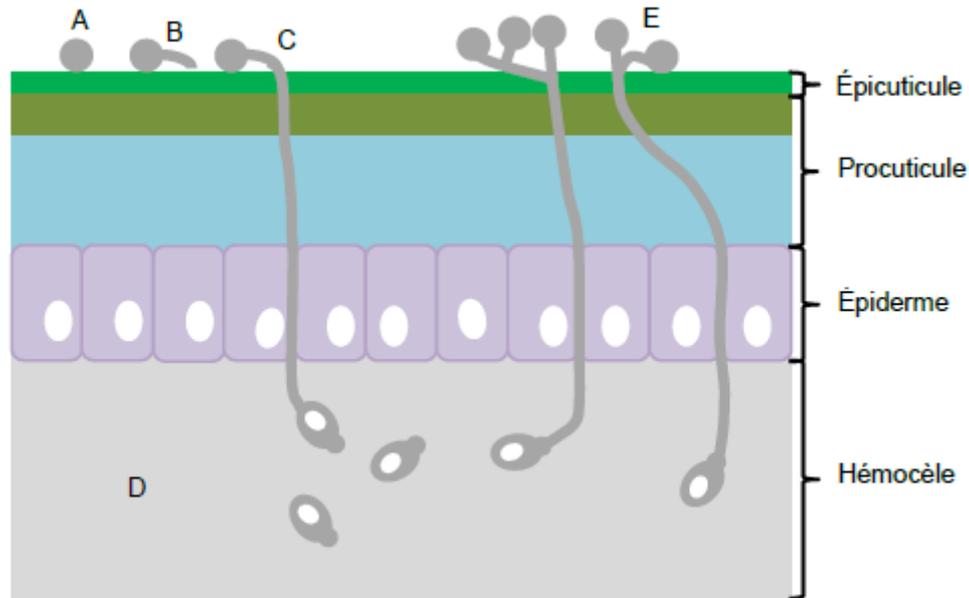


Figure 4: schématisation d'une coupe transversale de la cuticule d'un insecte et le mode d'infection d'un champignon entomopathogène. L'infection fongique se fait directement par contact des conidies avec la cuticule des insectes. Ce mode d'infection peut être résumé en quatre étapes principales, soit (A) l'adhésion des conidies; (B) la germination; (C) la pénétration des hyphes; (D) la prolifération interne par la formation des blastospores *in vivo*; et (E) la formation de la muscardine (NarinSrei, 2017).

L'infection fongique s'effectue en deux phases principales, soit la phase saprophytique et la phase pathogène. La phase saprophytique inclut l'adhésion des conidies à la surface de la cuticule des insectes et la formation de la muscardine. La phase pathogène comprend la germination des conidies, la pénétration des hyphes à travers les différentes couches de la cuticule et la prolifération interne.

➤ Adhésion

L'adhésion des conidies est l'étape initiale de la mycose. En milieu naturel, les conidies fongiques entrent généralement en contact avec la cuticule des insectes par un processus passif, soit à l'aide du vent ou de l'eau. Selon Ortiz-Urquiza et Keyhani (2013), l'adhésion pourrait se réaliser en trois étapes consécutives, soit l'adsorption des conidies à la surface de la cuticule, l'adhésion de l'interface entre les conidies et l'épicuticule, la germination et le développement des conidies à la surface de la cuticule d'insectes. Les conidies adhèrent à la surface de la cuticule d'insectes grâce à des forces hydrophobes et des charges électrostatiques (Boucias *et al.*, 1988 ; Holder et Keyhani, 2005). De plus, certaines protéines, notamment la protéine adhésive hydrophobine produite par *B. bassiana*, jouent un rôle de

médiatrice lors de l'adhésion des conidies à la surface de la cuticule (Hegedus *et al.*, 1992 ; Wang et St Leger, 2007).

Certains champignons entomopathogènes produisent des conidies recouvertes d'une substance gélatineuse de type polysaccharide, appelée le mucilage. Cette substance aide les conidies à s'attacher à leur substrat (Boucias *et al.*, 1988), les protège de la dessiccation et des toxines produites par les plantes (Nicholson *et al.*, 1989).

➤ **Germination des conidies**

La germination des conidies est une étape cruciale après l'adhésion. Lorsque les conditions sont favorables, les conidies commencent à germer en formant une des structures spécifiques, soit un tube germinatif ou un appressorium. Ces structures sont variées selon les espèces de champignons Hypocreales. Par exemple, *B. bassiana* produit l'hyphe à partir d'un appressorium. Un appressorium est formé à l'extrémité du tube germinatif, lequel sert de point d'ancrage, facilitant ainsi la pénétration des hyphes à travers la cuticule des insectes. Des signaux moléculaires intracellulaires, notamment l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et Ca^{++} peuvent jouer un rôle important dans le développement de l'appressorium chez certains champignons Hypocreales (St Leger *et al.*, 1990). De plus, certaines enzymes comme les endoprotéases et les aminopeptidases, sont également produites lors de la germination des conidies. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer la germination. Ces facteurs incluent la température, l'humidité, les éléments nutritifs, ainsi que les facteurs physico-chimiques de l'hôte (Smith et Grula, 1981).

➤ **Pénétration**

Les champignons entomopathogènes ont besoin de pénétrer à travers la cuticule d'insectes jusqu'à l'hémocèle afin d'obtenir les nutriments requis pour leur développement et leur reproduction. La pénétration des hyphes s'effectue à l'aide des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993). Plusieurs enzymes extracellulaires, telles que les endonucléases, les protéases, les chitinases, les lipases, chitobiases et les estérases peuvent également être sécrétées par les hyphes afin de dégrader la cuticule de l'insecte (Boucias *et al.*, 1988, Schrank et Vainstein, 2010, St Leger, 1995). Par exemple, les protéines Pr1 et Pr2 sécrétées par *B. bassiana* possèdent une activité protéolytique contre plusieurs protéines produites par la cuticule des insectes (Campos *et al.*, 2005). Chez ce champignon, la chitinase est une enzyme essentielle pour la formation des hyphes et la conidiogénèse (Fan *et al.*, 2007, Peng *et al.*, 2009). De plus, ces enzymes permettent aux champignons d'absorber les éléments nutritifs et éventuellement coloniser les insectes.

➤ **Prolifération interne**

Lorsque les hyphes ont traversé les différentes couches de la cuticule et l'épiderme de l'insecte, ils forment des blastospores *in vivo* qui seront ensuite libérés à l'intérieur de l'hémocèle. Ces blastospores ont des structures unicellulaires où leur membrane cellulaire est remplacée par une couche mince au-dessus de la membrane plasmique. Pour que les champignons puissent proliférer dans l'hémocèle, ils doivent se confronter aux défenses immunitaires ainsi qu'à la compétition extra-spécifique avec la flore bactérienne et fongique de l'intestin de l'insecte (Boucias *et al.*, 1988). Au cours de l'évolution, les champignons ont acquis la capacité de produire plusieurs enzymes et toxines ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides. Parmi ceux-ci, on trouve la beauvericine, la bassianolide, les peptides cycliques beauverolides et les anniatines (Vey *et al.*, 2001), les isarolides, le diketomorpholinebassiatine et l'oosporine (Xu *et al.*, 2008). Finalement, la mortalité des insectes peut être influencée par de nombreux facteurs, notamment les dommages mécaniques provoquant une invasion des tissus, l'épuisement des ressources nutritives et l'intoxication induite par les toxines des champignons entomopathogènes.

➤ **Formation de la muscardine**

Une fois que l'insecte meure et lorsque les conditions sont favorables, des hyphes émergent à travers les couches de l'exosquelette et les soudent ensemble. Ils traversent donc le tégument aux points d'articulation de l'insecte où l'exosquelette est plus souple. Éventuellement, ces hyphes recouvrent et entourent complètement l'insecte, structure que l'on nomme la muscardine. La présence de muscardine est un signe permettant de diagnostiquer une mycose chez l'insecte. Il existe plusieurs types de muscardines selon les espèces fongiques. Par exemple, la muscardine blanche pour *B. bassiana* et la muscardine verte pour *M. anisopliae*. Comme indiqué précédemment, il y a la formation des conidies à l'extrémité aérienne des hyphes. À maturité, ces conidies seront libérées dans l'environnement, leur permettant ainsi d'entreprendre le nouveau cycle d'infection (Figure 5).

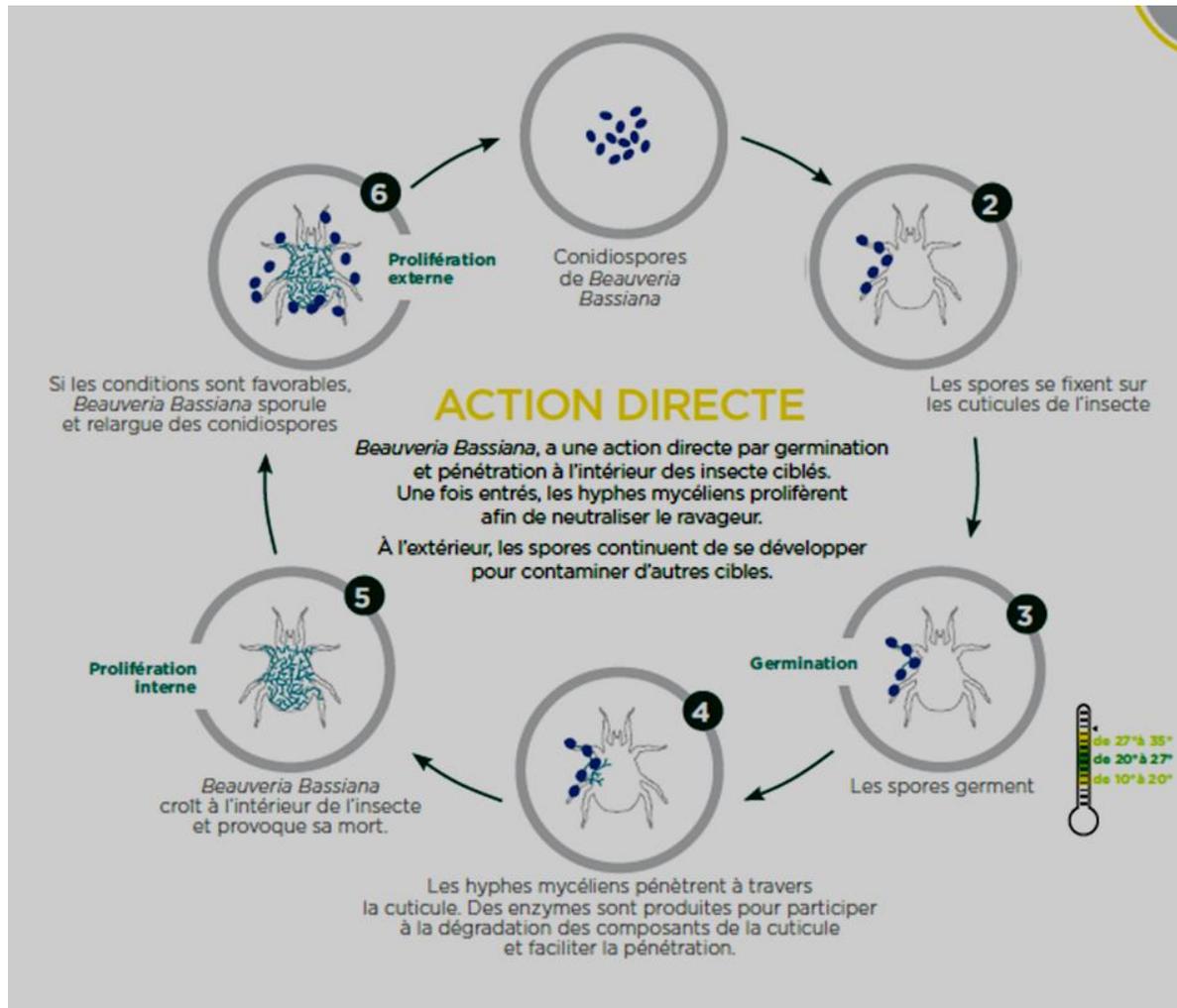


Figure 5: schéma du cycle biologique de *Beauveria bassiana* (Fiche de sécurité NATURALIS® disponible en consultant le site : www.desangosse.fr ou www.quickfds.com/) NATURALIS® - AMM N° 2170437 - Composition : 2.3×10^{10} UFC/L de *Beauveria bassiana* souche ATCC 74040.

2-1-4-Effets des différents facteurs sur l'efficacité de *B. bassiana*

➤ Les facteurs extrinsèques

De nombreuses contraintes écologiques, notamment la température, les radiations ultraviolettes (UV) et l'humidité peuvent nuire à l'efficacité de l'organisme pathogène sur terrain. Lors de ces dernières années, de nombreuses études se sont réalisées pour surmonter ces problèmes (Jaronski et Goettel, 1997).

➤ Les facteurs intrinsèques

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux facteurs essentiels dans le choix d'un agent de lutte microbiologique. Il faut signaler aussi que la capacité de survie des spores a également une influence (Jaronski et Goettel, 1997).

2-1-5-*Beauveria bassiana* et lutte microbiologique

Plusieurs espèces de champignons, dont certains isolats de *B. bassiana*, ont été utilisées pour contrôler des populations d'insectes (Goettel *et al.*, 2000; Liu et Bauer, 2006; Yun, 2003). Le champignon entomopathogène *B. bassiana* est utilisé mondialement comme agent microbien de lutte contre certaines espèces d'insectes grâce, notamment, à la facilité de le produire à grande échelle et à l'innocuité envers les vertébrés (Boucias *et al.*, 1998). Différentes préparations de *B. bassiana* ont été utilisées tant au niveau de la protection de la santé humaine que la protection des végétaux dans les secteurs agricole et forestier. Les chercheurs ont montré la performance de ce champignon entomopathogène contre les insectes nuisibles de plusieurs ordres, notamment chez des lépidoptères, hémiptères, coléoptères, homoptères, isoptères et diptères.

Dans le domaine de la santé humaine, plusieurs études montrent l'efficacité insecticide de certains isolats de *B. bassiana* en milieu aquatique pour lutter contre les populations d'espèces de moustiques jouant le rôle de vecteur de microorganismes pathogènes. En agriculture, certaines préparations à base de *B. bassiana* ont été utilisées comme mycoinsecticides depuis 1965 dans l'ancienne URSS. Ces préparations étaient employées pour réprimer les populations de certaines espèces de lépidoptères.

Dans le secteur forestier, plusieurs travaux montrent le potentiel de certains isolats de *B. bassiana* comme agent de lutte biologique contre des populations d'insectes ravageurs. De façon plus particulière, la susceptibilité de certaines espèces de coléoptères causant d'importants dommages a été étudiée.

3- Les métabolites produits par *Beauveria bassiana*

De nombreux champignons produisent des métabolites secondaires, qui agissent sur d'autres organismes, provoquant parfois une inhibition de la croissance, des maladies et même la mort. Certains champignons entomopathogènes produisent des métabolites, ce qui peut affecter d'autres microorganismes et insectes (Onofre *et al.*, 1999), par exemple le champignon *Beauveria bassiana* produit une gamme de métabolites secondaires chimiquement divers qui le désignent comme un champignon entomopathogène supérieur : Beauvericin, bassianolide, bassianin, tenellin et cyclosporin A qui sont la clé des métabolites secondaires produits par *B. bassiana*. Les enquêtes sur la beauvericine ont démontré que ce métabolite a des propriétés insecticides, antibiotiques, cytotoxiques et ionophoriques.

3-1-Bassiacridine

B. bassiana sécréterait une protéine, la bassiacridine, présentant une toxicité pour criquets et représentant environ 0,1 à 0,3% de la teneur totale en protéines de l'extrait brut. La protéine présente une structure monomère avec une molécule poids de 60 kDa et un point isoélectrique de 9,5. Il montre une séquence d'acides aminés homologie à la protéine de liaison à la chitine de levure, mais ses propriétés de liaison à la chitine n'a pas encore été déterminé. Être neutre pour les échangeurs d'ions, la bassiacridine participe activement à la β -glucosidase, à la β -galactosidase et à la N-acétylglucosa- activités de minidase. (Quesada-Moraga et Vey 2004).

3-2-La beauvericine

Découvert pour la première fois par Hamill *et al.* (1969), la beauvericine est un cyclo-oligomère ionophorehexadepsipeptidique (Figure 6) produit par *B. bassiana* avec une activité insecticide. Le peptide se lie aux cations monovalents et facilite leur transport à travers la membrane, dissociant ainsi la phosphorylation oxydante (Xu *et al.* 2008). Indépendamment de son fort potentiel insecticide, le traitement préférentiel l'utilisation d'une puissante souche produisant de la beauvericine en tant qu'insecticide commercial est beaucoup plus avantageux que le composé pur principalement parce que sa biosynthèse coïncide avec une infection. Au cours de la phase de pathogénèse, les hyphes en développement de *B. bassiana* libère des enzymes hydrolytiques extracellulaires facilitant la pénétration fongique de tégument d'insecte (Fan *et al.* 2007) et de facteurs de virulence qui désactive et émette le système immunitaire de l'hôte menant à sa mort. L'activité de la beauvericine dans l'entomopathogénèse est toujours controversée, car elle aurait été bien tolérée par *Helicoverpa zea*. Outre son rôle d'insecticide actif, la beauvericine présente un large éventail d'activités biologiques in vitro, telles que les antibiotiques, les antiviraux et les cytotoxiques.

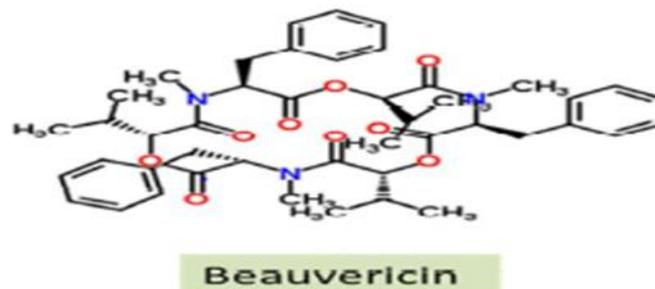


Figure 6 : structure chimique de la beauvericine (Harikesh *et al.* 2015)

3-3-Bassianolide

Un autre métabolite secondaire de *B. bassiana* ayant des propriétés insecticides. Bassianolide est un depsipeptide cyclo-oligomère (Xu *et al.* 2009) (Figure 7). C'est un facteur de virulence hautement significatif, induisant une atonie chez les larves de *H. zea* et toxicité pour les larves de ver à soie. cependant, *B. bassiana* orchestre une stratégie bien définie pour mener à bien l'opération de mise à mort de larves d'insectes dont la production de métabolites coïncide avec l'infection de l'hôte. Ainsi, bassianolide représente un facteur de virulence réel de l'entomopathogène. Contribuant de manière significative à la préparation d'insecticide biologique commerciale contenant les spores du champignon. En plus d'être un insecticide puissant, purifié bassianolide inhibe la contraction du muscle lisse induite par l'acétylcholine, ainsi que sous forme de cytotoxiques, antiplasmodiques et antimycobactériens modérés in vitro activités (Jirakkakul *et al.* 2008).

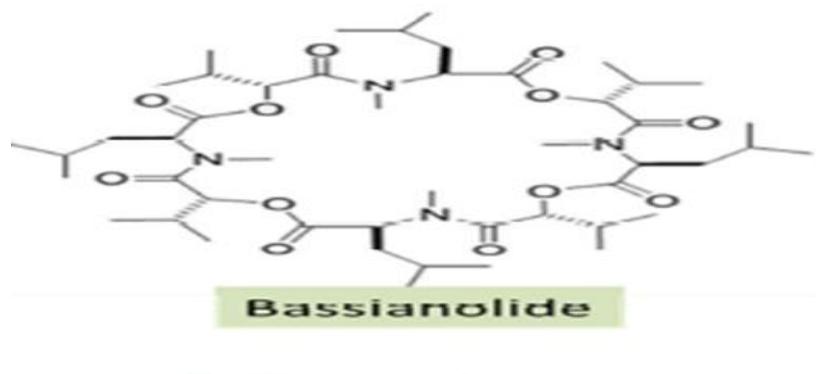


Figure 7 : structure chimique de la beauvericine (Harikesh *et al.*, 2015)

4-La toxicité des métabolites de *Beauveria bassiana*

Les toxines ont un large éventail d'effets biologiques sur les insectes, y compris induire une dépolarisation membranaire, en raison de l'ouverture de canaux Ca^{2+} , causant paralysie par le téтанos et la mort (Samuels *et al.* 1988), provoquent également des changements morphologiques dans le cytosquelette et dans les plasmocytes des insectes, affectant une partie de la réponse immunitaire, telle que encapsulation et phagocytose (Vey *et al.*, 2002). En plus de réduire l'expression des peptides des antimicrobiens qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire humorale des insectes (Pal *et al.*, 2007), induisent également des changements structurelles dans les cellules épithéliales qui causent rupture de

membrane et stress oxydatif dans des cellules (Sowjanya et Padmaja, 2008), et inhiber le taux de sécrétion de liquide dans le Tubules de Malpighi (Ruiz-Sanchez *et al.* 2010).

5- Méthodes d'identification et de détection des métabolites

➤ **Chromatographie sur Couche Mince**

L'utilisation de la chromatographie en couche mince (CCM), permet une détection et une quantification des métabolites secondaires. Plusieurs protocoles ont ainsi été développés, notamment pour la recherche des métabolites à partir d'une culture de *Beauveria bassiana*. D'après Donald et Roberts (1969), les paramètres de CCM idéaux pour la détection des métabolites sont les suivants: Type de couche mince: gel de silice (silica gel); solvant de séparation: Chloroform/Methanol (19:1,v/v); Système de détection: une lampe UV (365 nm) et une révélation par la vapeur d'iode.

➤ **Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)**

Ces toxines ont été isolées dans les extraits organiques obtenus à partir des cultures fongiques (EtOAc, CCl₄, CH₂Cl₂); la chromatographie de gel de silice et la chromatographie liquide à phase renversée ont été utilisées (Pais et al, 1981; Ayer et Pena-Rodriguez, 1987; Bains et Tewari, 1987 ; Samuels *et al.*, 1988; Gupta *et al.*, 1989 a,b; Buchwaldt et Jensen,1991; Che *et al.*, 2001). La quantification de divers métabolites en extraits des cultures fongiques de *B. bassiana* a été effectuée par HPLC en utilisant des courbes d'étalonnage des métabolites purs (Loutelier *et al.*, 1996; Chen *et al.*,1999). La spectrométrie de masse en bombardement par atomes rapides (FAB-MS) a été une méthode très utile pour l'analyse des toxines dans les extraits fongiques bruts (Lange *et al.*,1991 ,1992; Loutelier *et al.*,1996).Des méthodes plus récentes incluent la spectrométrie à temps de vol (TOF) avec l'ionisation chimique à pression atmosphérique (LC-APCI-MS) (Jegorov *et al.*,1998) et l'ionisation electrospray (ESI-MS) ont été appliquées pour l'identification et la caractérisation des métabolites (Potterat *et al.*,2000 ; Liu et Tzeng, 2011).

6- La souche test *Aspergillus niger*

Aspergillus est un genre fongique asexué, décrit pour la première fois en 1729 par Michelli (mycologue florentin) et qui consiste à plus de 180 espèces officiellement reconnues réparties en 18 groupes (essentiellement définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur) morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches. Il se caractérise par des longs hyphes qui se terminent par la formation d'une structure globuleuse,

contenant des spores ressemblant la forme d'un goupillon (un aspergillum en latin) (Figure 8) d'où le nom *Aspergillus* (Kozakiewicz et Smith, 1994 ; Brakhage *et al.*, 1999; Pasqualotto, 2010 ; Masayuki et Katsuya, 2010).

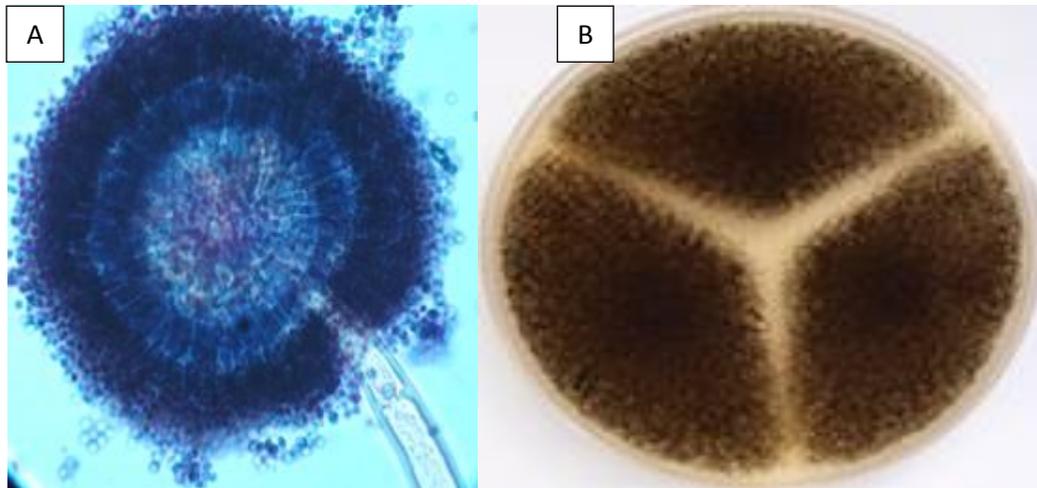


Figure 8 : (A) tête conidienne d'*aspergillus niger* visualisée à l'objectif (40) (cahier de formation. les moisissures d'intérêt médicale. 2002) (B) *Aspergillus niger* sur milieu M2S5 (<http://www.univbrest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/asp+niger>)

6-1- Habitat

Distribué largement dans tout le sur-monde, *A. niger* est l'un des champignons les plus communs dans l'environnement humain, qui vivent en saprobiose (Samson, 1994 ; Ward *et al.*, 2006). Il est très répandu dans les zones sombres et humides, les sols, le compost, pousse à la surface des matières organiques en décomposition, des denrées alimentaires, des sous-produits agricoles surtout les céréales et ses dérivés (son de blé, son de riz, bagasse...) et de nombreux autres substrats, où les acides aminés et les sucres sont initialement insuffisants. Ce qui a conduit l'organisme d'avoir un certain nombre d'enzymes hydrolytiques, qui lui permet d'utiliser efficacement les sources nutritionnelles externes pour sa croissance (Guillaume, 2006 ; Leyral et Vierling, 2007; Pasqualotto, 2010).

6-2- Classification

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. Al-Musallam (1980) a révisé la taxonomie du groupe *Aspergillus niger* en prenant essentiellement les

Caractéristiques morphologiques en compte. La position systématique d'*A. niger* est résumée comme suit (Chabasse *et al.*, 1999 ; Meyer *et al.*, 2004)

- **Phylum** : Tallophyta
- **Sous-phylum** : Fungi (Mycota)
- **Division de sous-phylum** : Eumycota
- **Subdivision** : Deuteromycotina (Fungiimperfecti)
- **Classe** : Hyphomycètes (forme filamenteuse)
- **Ordre** : Moniliales
- **Famille** : Moniliaceae
- **Sous-famille** : Hyalosporae
- **Tribu** : Aspergilleae
- **Genre** : *Aspergillus*
- **Espèce** : *Aspergillus niger*

6-3- Morphologie

Les *Aspergillus* sont caractérisés par la présence de longs filaments perpendiculaires (stipes) aux hyphes végétatifs. Les stipes se terminent par une vésicule supportant les cellules de la conidiogenèse : les phialides. Celles-ci, sans collerette, sont soit portées directement par la vésicule, soit séparées par des pièces intermédiaires ou métules. Les phialides produisent des spores ou conidies qui caractérisent le mode de reproduction asexuée du champignon. Ces phialospores sont regroupées en panache, dont la couleur et la forme varient en fonction de l'espèce. L'ensemble stipe et vésicule constitue le conidiophore et l'ensemble vésicule, phialides et conidies forme la tête aspergillaire (Figure 9) (Leyral et Vierling, 2007; Masayuki et Katsuya, 2010).

➤ **Aspect macroscopique**

Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle montrant parfois des zones concentriques (Figure 9). (Guillaume, 2006). Sur le milieu Czapek, *A. niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore.

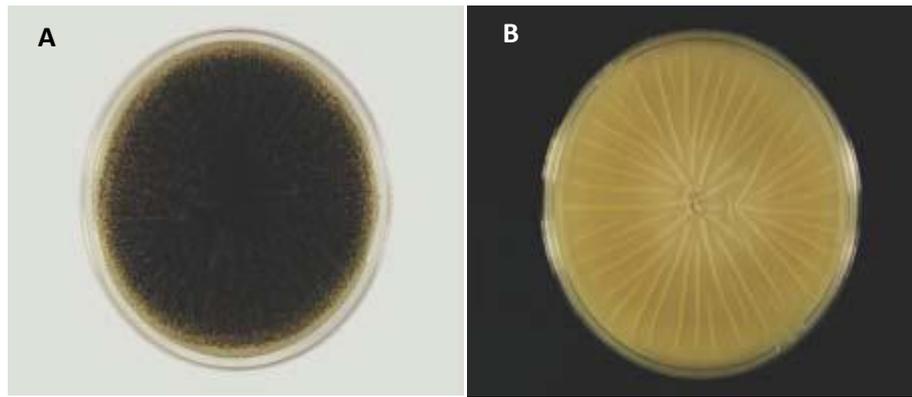


Figure 9: (A et B) culture d'*Aspergillus niger* sur gélose Sabouraud âgée de 8 jours (Cahier de formation BIOFORMA-les moisissures d'intérêt médical -2002).

➤ Aspect microscopique

Les têtes conidiennes, bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule courte appelée cellule podale (footcell) avec un hyphe fertile. Les vésicules (50-70 μ m) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié. Les phialides (7-10 x 3-3,5 μ m) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables (10-15 μ m). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3,5 à 4,5 μ m ; parfois jusqu'à 6 μ m de diamètre (Figure 10) (Abraca *et al.*, 2004; Pasqualotto, 2010).

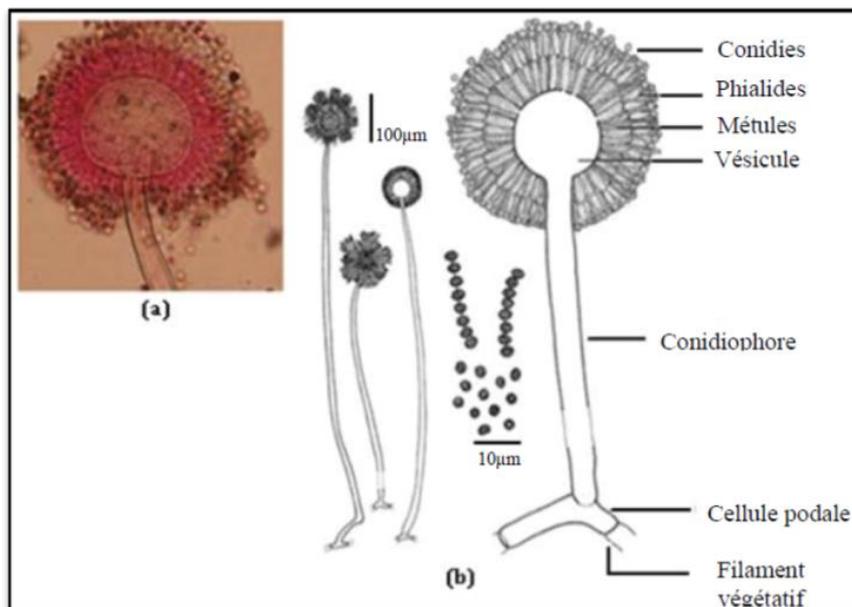


Figure 10: aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore d'*A. niger* (Pasqualotto, 2010).

6-4- Pouvoir pathogène

On attribue la capacité d'*Aspergillus* à provoquer des infections chez l'homme et chez les espèces non humaines à un large éventail de mécanismes, dont l'adhérence, l'envahissement, l'évitement des défenses de l'hôte et des dommages causés aux cellules de l'hôte.

Les infections causées par les aspergilli noirs sont plus fréquentes par temps chaud et humide, et dans les climats tropicaux et semitropicaux (Kredics *et al.*, 2008), ce qui laisse supposer que la température et l'humidité ont une incidence sur la virulence et la croissance du champignon. La plupart des espèces importantes d'un point de vue clinique peuvent croître adéquatement à 37 °C (Klich, 2008)

Les aspergilli noirs, y compris *A. niger* sont dotés de nombreux mécanismes qui peuvent contribuer à leur pathogénicité, notamment la sécrétion de métabolites secondaires, comme les mycotoxines, la formation d'oxalate de calcium, la formation d'aspergillomes ou de boules fongiques, la sporulation, et leur tolérance à la température et au pH physiologiques. Bien qu'il ne soit pas considéré comme une cause importante de maladie des plantes, on a rapporté qu'*A. niger* poussait dans le monde entier et causait des dommages à un grand nombre de cultures et d'aliments, y compris le maïs, les arachides, les oignons, les mangues et les pommes (Perrone *et al.*, 2007; Pitt et Hocking, 1997; Sedaghati *et al.*, 2012). D'autre part *A.niger* a la capacité de coloniser les tissus d'animaux vivants et morts. L'invasion de tissus vivants par le champignon cause de nombreuses formes de maladie chez les animaux à sang chaud et à sang froid (Prelusky *et al.*, 1994), mais le statut immunitaire de l'hôte est déterminant (Baker et Bennett, 2007). Deux sortes de maladies sont causées par les *Aspergillus* noirs, soit les mycotoxicoses (par l'ingestion d'aliments renfermant des métabolites toxiques) et les mycoses (infections) (Austwick, 1965).

À l'instar des autres agents pathogènes opportunistes connus chez l'humain, les *Aspergillus* section Nigri sont susceptibles de provoquer tout un éventail d'infections si les circonstances sont favorables. *A. niger* serait moins virulent que d'autres aspergilli noirs (Person *et al.*, 2010 : consulté dans Severo *et al.*, 1997), mais on a quand même rapporté qu'il causerait des infections des poumons, de la peau, des oreilles, des yeux et du coeur, ainsi que des infections systémiques.

6-5- L'intérêt dans l'écosystème

A.niger est connu pour être un micro-organisme qui solubilise le phosphate et il est donc utilisé comme biofertilisant (Reddy *et al.*, 2002; Seshadri *et al.*, 2004)). *A. niger* a des capacités de biodégradation et de biotransformation (Kanaly *et al.*, 2005). Il peut absorber le plomb, le cuivre, le nickel, le cadmium et le zinc présents dans l'environnement, soit par adsorption sur les parois cellulaires de champignons, soit par complexation avec des acides organiques produits par les champignons (Kapoor *et al.*, 1999; Kapoor et Viraraghavan, 1998 Naseem *et al.*, 1995; Price *et al.*, 2001). Sa tolérance au zinc, au plomb, au cadmium et au nickel (Iram *et al.*, 2009) lui permet de fonctionner dans des milieux qui sont fortement contaminés par les métaux.

***MATERIEL &
METHODES***

1- Isolement et Identification du champignon entomopathogène

Beauveria bassiana

Une grande variété de champignons se rencontrent dans l'environnement du sol et ont divers effets écologiques. La plupart de ces champignons, peuvent se développer sur des supports artificiels *in vitro*. Ces capacités ont longtemps été exploitées pour isoler des micro-organismes à partir d'échantillons de sol et des milieux spécifiques ont été développés pour sélectionner certains champignons entomopathogènes

Les bactéries peuvent être inhibées par l'utilisation d'antibiotiques tels que chloramphénicol, tétracycline ou streptomycine ou les acides tels que l'acide lactique (Goettel et Inglis, 1997). Le principal restant obstacle à l'utilisation de cette méthode d'isolation est que les champignons entomopathogènes se développent relativement lentement par rapport aux nombreux champignons saprophytes opportunistes présents dans l'environnement du sol. Par conséquent, le contenu des supports doit inclure des substances empêchant ces champignons de surcroissance des espèces d'intérêt. En règle générale, l'espèce *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* ont été les plus étudiés.

L'identification des champignons entomopathogènes repose principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium aérien, la présence de spores et leur forme.

1-1- Prélèvement des échantillons

Les échantillons du sol utilisés pour ce travail proviennent d'un sol agricole de blé tendre de l'Institut national de protection des végétaux (INVP) et ont été prélevés par la technique de Pochon et Tradieux (1962). Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol, une quantité suffisante de terre est prélevée, jusqu'à 10 centimètres de profondeur, puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile. Après un premier tri, écartant les pierres et les débris végétaux, l'échantillon est récupéré dans un flacon stérile. Les échantillons ont été ensuite transportés au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne et traités immédiatement.

1-1-1- Milieu d'isolement

Le milieu de culture le plus conseillé pour la culture du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* est le milieu PDA (pomme de terre dextrose agar). La croissance

bactérienne a été inhibée par l'addition de l'acide lactique aux milieux de culture à une concentration de 50 µg/l (Botton *et al.*, 1999).

1-1-2- Méthode d'isolement

Pour préparer les suspensions du sol, 1g de chaque échantillon a été dilué dans 9 ml d'eau distillée stérile (Clark *et al.*, 1985 ; Ulacio *et al.*, 1997), puis une série de dilutions décimales a été effectuée sur l'échantillons (Figure 11).

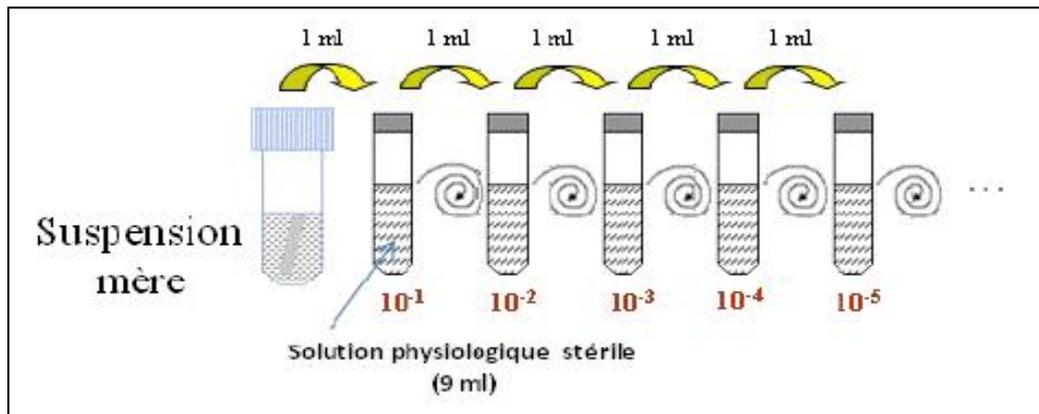


Figure 11 : illustration de la série de dilution décimale

(http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_147).

Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse à l'aide du Vortex a été réalisée afin de permettre une bonne homogénéisation des solutions. A chaque échantillon, il a été attribué un code désignant son origine et son degré de dilution. Ensuite, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de chaque suspension-dilution est étalé sur le milieu PDA, puis le surplus de liquide est aspiré. Trois répétitions ont été effectuées (Ikasari et Mitchell, 1994) (Figure12).

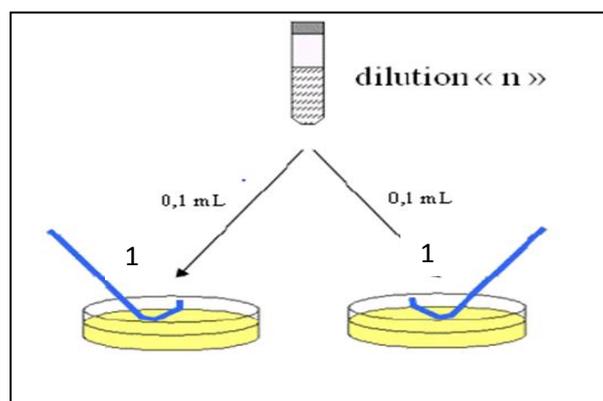


Figure 12 : ensemencement du milieu de culture

(http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_147).

Les boîtes de Pétri sont alors incubées à 25°C et observées quotidiennement pendant une semaine.

1-1-3- Purification des souches isolées

La purification des colonies fongiques isolées a été établie par la réalisation d'un repiquage successif sur milieu solide PDA, confirmée par l'observation microscopique. Elle est réalisée par transfert des colonies développées sur des boîtes contenant le milieu de culture PDA (chaque colonie récupérée dans une boîte). Ce dernier se considère comme un milieu favorable de développement (rapide) des champignons, ainsi qu'à la production des spores (Botton *et al.*, 1990). L'incubation est réalisée à une température 25C°, pendant 4 à 6 jours.

1-1-4- Méthodes d'identification

L'identification des champignons en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

1-1-4-1 Identification macroscopique

L'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons est basée sur l'observation de celles-ci à l'œil nu et à la loupe binoculaire. L'observation des caractères porte sur :

- l'aspect de la colonie (couleur de la surface et du revers de la boîte, texture de la surface des colonies, topographie...).
- l'aspect des bordures des colonies.
- La couleur du mycélium aérien
- Présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium
- Production de pigment diffusible
- Vitesse de croissance (diamètre de la colonie)

1-1-4-2- Identification microscopique

L'identification des champignons nécessite l'observation au microscope optique. Elle est basée sur les critères d'identification microscopique réalisés par Breton (1990) et Roquebert (1998) quand c'est possible à identifier. Pour cela, à l'aide d'une anse de platine stérile on prélève superficiellement un fragment de la culture que l'on dépose sur une lame et

que l'on colore par le lactophénole. Puis la lame est recouverte d'une lamelle et observée au microscope optique à un grossissement (G X 40). L'observation des caractères porte sur :

- Hyphes : septés ou non, c'est-à-dire cloisonnés ou non
- Conidiophores : absents, simples, ramifiés
- Cellules conidiogènes : annellide, phialide...
- Conidies : uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...)
- Organes de fructification : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué)
- Mycélium diffus, épais, coloré ou incolore.

2- Production et extraction des métabolites secondaires élaborées par

Beauveria bassiana

2-1-Fermentation

Pour la fermentation, des milieux de culture (Czapekdox et PDA liquide) ont été sélectionnés pour une production optimale des métabolites secondaires et placés dans des Erlenmeyers de 250 ml. Chaque Erlenmeyer contient 90 ml de milieu de fermentation est inoculé avec des morceaux de gélose (PDA) contenant du mycélium découpés par une pipette Pasteur stérile. Les cultures sont ensuite incubées à 28°C sous agitation pendant 14 jours (maximum de production des toxines) (Benserradj, 2014). Les expérimentations ont été réalisées en triple.

2-2- Extraction

Après la fermentation, le contenu de chaque Erlenmeyer est filtré sur papier Wattman N°1 ; suivie par une centrifugation à 8000 × g pendant 20 min pour une bonne séparation du mycélium du surnageant du milieu liquide. L'extraction des métabolites secondaires a été réalisée à l'aide d'un solvant qui est le chloroforme. Les extraits (métabolites secondaires: exp. beauvericine ...etc...) obtenues sont évaporés à l'aide d'un ROTAVAP sous vide à 40°C (Figure 13). Enfin, la phase chloroforme a été évaporée à sec jusqu'à obtention d'une croute sèche. Ce résidu est recueilli de nouveau l'aide du méthanol.



Figure 13 : extraction des métabolites secondaires par ROTAVAPOR

2-3- Test de toxicité

Les tests de toxicité sont conduits selon les méthodes préconisées par l'organisation mondiale de la santé (2005). Pour évaluer l'activité antifongique des métabolites secondaires de *Beauveria bassiana*, nous avons adopté la technique de contact direct sur gélose. Seuls les filtrats débarrassés de la biomasse fongique sont utilisés, tels quels ou dilués dans de l'eau distillée. La gamme de concentrations de ces métabolites testées avec une souche du genre *Aspergillus* (*A.niger*).

2-3-1- Réactivation de la souche-test

La souche fongique utilisée fait partie de la collection ATCC. Elle nous a été fournie gracieusement par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques. Il s'agit d'*Aspergillus niger* ATCC 16404.

La préparation de la suspension fongique stock de longue conservation a été réalisée de la manière suivante :

Les souches lyophilisées ont été reconstituées par hydratation du lyophilisat avec le fluide hydratant fourni avec le système (Mode d'emploi KWIK-STIK™). A partir de cette suspension, des boîtes de gélose Sabouraud – CMP ont été inoculées. Après incubation de sept jours à 37°C, la confirmation de la pureté des souches a été réalisée suivie de la préparation des suspensions stocks (Normes Françaises NF EN 12353, 2013). Pour *Aspergillus niger* : dix millilitres de la solution cryoprotectrice à 15% de glycérol ont été déversées à la surface d'une des deux boîtes de gélose Sabouraud – CMP préalablement

ensemencées, et les spores ont été récupérées aseptiquement en grattant la surface à l'aide d'une anse de platine stérile, puis mise en incubation durant cinq jours à 37°C. Les suspensions ont été réparties à raison de 0,5ml par cryotube, puis conservé à -18°C. L'inoculum d'*Aspergillus niger* doit correspondre à une concentration de 0,4 à 5×10^4 UFC/ml (Espinel-Ingroff *et al.*, 2009). La suspension sporale a été préparée dans de l'eau physiologique stérile, puis a été calibrée à une densité optique de $DO_{530nm} = 0,09$ à 0,11 qui correspond à $0,4$ à 5×10^4 UFC/ml (Espinel-Ingroff *et al.*, 2009).

2-3-2- Bio-essai

La toxicité de l'extrait de la souche *Beauveria bassiana* a été testée par la méthode des puits on utilisant le milieu PDA qui, une fois coulé dans des boites de Pétri, est ensemencé avec le germe cible. Des puits de 6 mm de diamètre sont perforés à l'aide de pipettes Pasteur (l'extrémité épaisse de 6 mm de diamètre). Les puits préparés sont remplis par 10, 20, 30, 40 et 50 μ l de chacun des deux extraits, ensuite les boites sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes, afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant la croissance des germes, puis incubées à 35°C (Figure 14). La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre, à l'aide d'un pied à coulisse, des zones d'inhibitions autour des puits après 48 h (Sheehan *et al.*, 2004). Un extrait est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (Ela *et al.*, 1996).

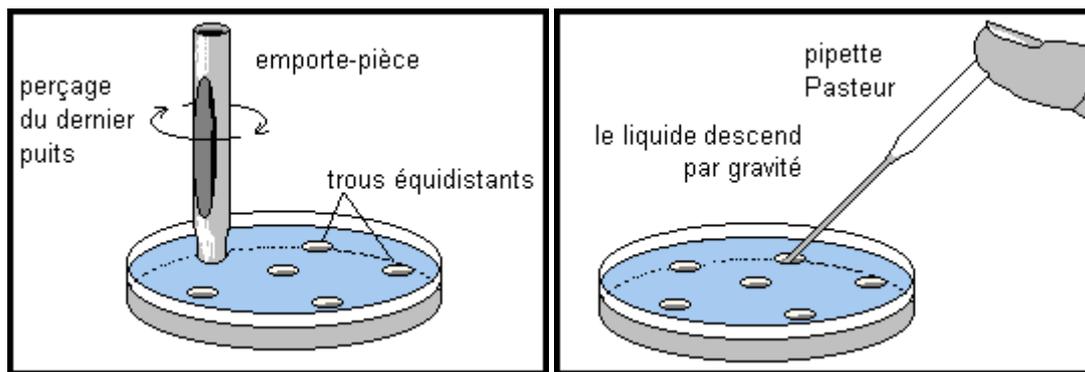


Figure 14 : méthode de diffusion par la technique des puits (www2.ac-lyon.fr)

RESULTATS

&

DISCUSSION

L'objectif de cette étude consiste à isoler et identifier une souche d'un champignon entomopathogène, *B. bassiaia*, et tester l'activité de ses métabolites secondaires vis-à-vis une espèce de champignon d'intérêt agronomique et médicale, à savoir l'espèce *A.niger*.

1- Résultats de l'isolement et de l'identification du champignon entomopathogène *B.bassiana*

1-1- Isolement

L'isolement a été réalisé à partir du sol, la méthode est faite dans des conditions aseptiques suivie par des dilutions. Les dilutions $10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ ont été retenues pour l'ensemencement du milieu solide (PDA) (Annexe) et l'isolement des champignons (Waksman, 1922). L'incubation des boites a été faite à une température de $28C^\circ$, pendant 21 jours.

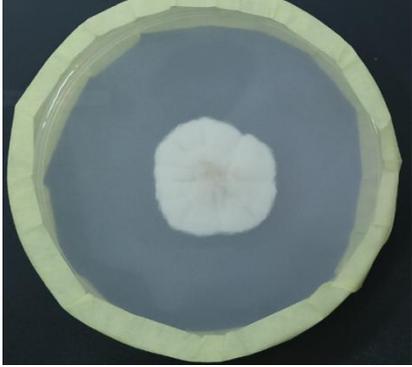
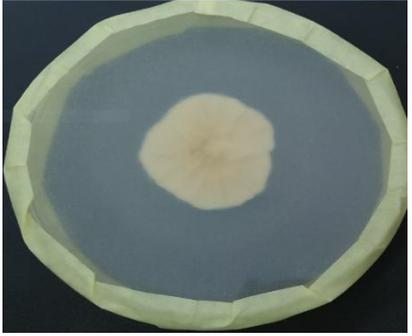
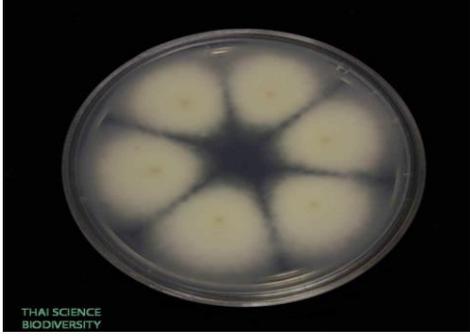
1-2- Identification

L'identification de cette souche étant basée essentiellement sur les clés de détermination des genres à savoir les caractères cultureux et la morphologie microscopique, établies par Botton *et al.* (1990), Messiaen *et al.* (1991) et Rémi *et al.* (1997).

1-2-1- Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des isolats sélectionnés ont été étudiés sur milieu PDA le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le tableau 1 récapitule l'aspect macroscopique des isolats purifiés: surface et consistance des colonies, couleur du revers de la colonie ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristique de la souche.

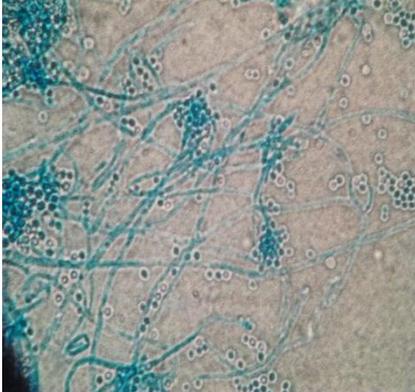
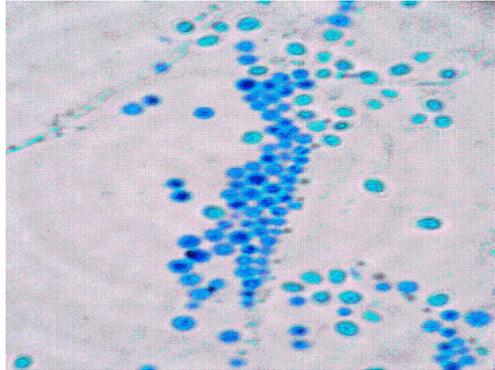
Tableau 1 : aspect macroscopique de *Beauveria bassiana*

Caractères macroscopiques	Observation macroscopique	Référence
<p>Couleur : blanchâtre à jaunâtre</p> <p>Aspect : cotonneuse</p>	<p>Recto :</p> 	 <p>culture de <i>Beauveria</i> sur gélose PDA</p> <p>http://lycee-roland-garros.ac-reunion.fr/category/actualites/</p>
<p>Pas de pigment</p>	<p>Verso :</p> 	 <p>THAI SCIENCE BIODIVERSITY</p> <p>www.thai2bio.net/museum/item.</p>

1-2-2- Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des isolats sélectionnés (conidiophores, conidies, mycélium etc...). Les différents aspects microscopiques des isolats en question, sont récapitulés dans le tableau 2.

Tableau 2 : aspect microscopique de *Beauveria bassiana* (G x 40).

Caractères microscopiques	Observation microscopique	Référence
<p>- Des Hyphes transparents et septaux.</p> <p>- Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et extrémité terminale en zigzag</p>		 <p>http://lycee-roland-garros.ac-reunion.fr/category/actualites/</p>
<p>Des spores unicellulaires de forme ovale</p>		 <p>https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Conidia-de-Beauveria-bassiana-400X-tincion-azul-de-lactofenol_fig1_318543125;</p>

Selon les travaux de Weiser (1972) ; Lipa, (1975) ; Halouane (1997) et Bamett et Hunter (1998), les espèces de *Beauveria* produisent des conidies cotonneuses blanches à jaunâtres. Les conidies ou spores sont soutenues par de longs filaments en zigzag qui sont des hyphes transparents et septeux, avec un diamètre de 2.5 à 25 µm. Par ailleurs, d'autres travaux sur la souche entomopathogène, *B. bassiana*, sont en corrélation avec les résultats de notre étude (Chabani et Zahri, 2018) (Figure 16).

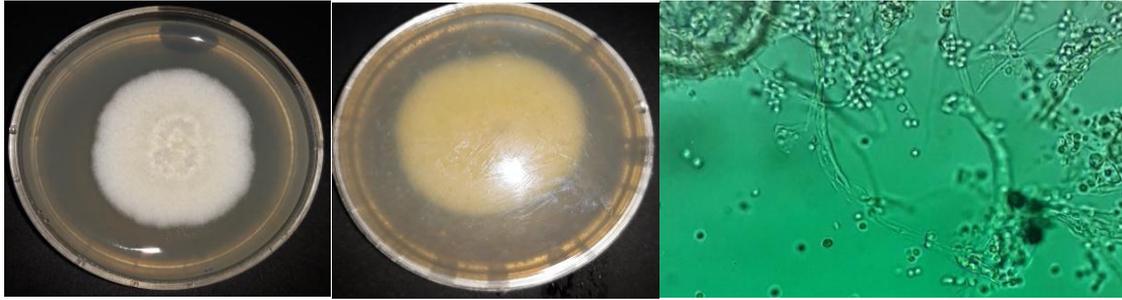


Figure 16 : étude macroscopique et microscopique de *Beauveria bassiana* (Chabani et Zahri, 2018).

2- Extraction des métabolites secondaires élaborés par *Beauveria bassiana*

Après l'inoculation, *Beauveria bassiana* a été développée dans des cultures en Erlen qui ont été incubées à 28°C. pendant 21 jours. Après la période d'incubation, nous observons un trouble important ainsi que des développements identiques du mycélium de forme ovale regroupé en amas de couleur blanche-jaune en haut de l'Erlen. La morphologie de ces structures fongiques est illustrée dans la figure 17. Le début de la croissance était au 8ème jour sur milieu PDB et au bout de 15ème jour sur milieu Czapek-dox.

Il est à noter qu'au cours de l'incubation ; les Erlens ont été contrôlés de façon incessante à fin d'être sûr qu'il n'y a pas de contamination par d'autres espèces fongiques.



Figure 17 : développement morphologique de *Beauveria bassiana* sur milieux de fermentation (Czapek et PDA)

La fermentation liquide du champignon entomopathogène *B.bassiana* sur les deux milieux (PDB et Czapek-dox) se caractérise par une croissance rapide de la biomasse. Cette dernière est due à la présence de source de carbone : saccharose (dans les deux milieux) et une source d'azote: nitrate dans le milieu Czapek-dox (Khachatourians, 2011).

Les milieux de culture devront donc fournir les éléments essentiels à la croissance et souvent les facteurs de croissance indispensables (Vananuvat et Insella , 1975). Les plus importants étant le carbone et l'azote, utilisés sous forme de composés organiques, et des ions minéraux (potassium, phosphate, magnésium....) en quantités très faibles.

A travers les milieux de cultures de composition extrêmement diversifiée où nous avons cultivé notre souche fongique durant 21 jours, nous avons obtenu un très bon développement de notre souche qui s'est adaptée aux milieux testés.

Nos résultats sont assez comparable avec ceux trouvés par divers auteurs tels que Halouane (1997) qui a démontré que *B.bassiana* se comporte d'une manière similaire sur milieux organique et minéraux.

Enfin, l'extraction des métabolites secondaire à été fait par un solvant organique (Chloroforme) afin de séparer les deux phases (organique et inorganique). La phase organique à été récupérée pour être concentrée sous pression par l'évaporation du solvant a l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C. Les deux extraits obtenus sont de couleur jaune-marron (Figure 18).



Figure 18 : extrait brut de la souche *Beauveria bassiana*.

3- Résultat du test de toxicité sur *A. niger*

Le test de l'activité antifongique, réalisé avec l'extrait brut des métabolites secondaires de *Beauveria bassiana* sur *Aspergillus niger*, n'a révélé aucun effet décelable. En effet, aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des puits contenant les différentes concentrations de l'extrait brut (Figure 19) malgré l'utilisation de milieux adéquats ayant déjà prouvé leur efficacité dans la mise en évidence de l'activité antifongique.

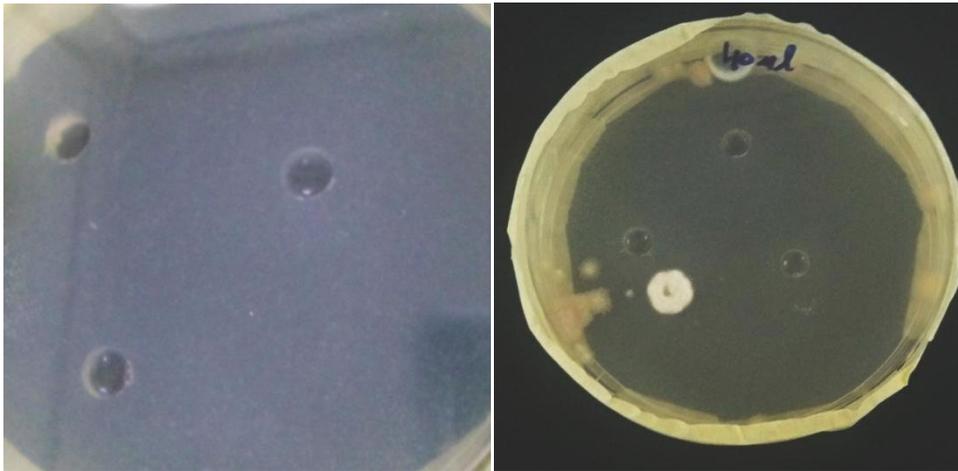


Figure 19 : photo illustrant l'absence de zone d'inhibition autour des puits ainsi que la contamination inexplicable des cultures.

Ce résultat peut être expliqué de deux manières probables : d'abord l'absence potentielle de l'activité antifongique de *B. bassiana* à l'égard d'*Aspergillus niger* ; d'autre part, la présence des différentes contaminations répétées et inexplicables des cultures qui auraient pu empêcher cette activité de s'exprimer (Figure ci-dessus), malgré l'application des règles strictes d'asepsies et ce, pour chaque répétition des manipulations.

L'action des métabolites secondaires de *B. bassiana*, généralement l'effet insecticide, des extraits obtenus à partir de différents systèmes de culture du champignon est connue et a été rapportée par différents auteurs, notamment sur certains insectes. Ortiz-Urquiza *et al.* (2010) ont montré que des extraits bruts obtenus de quatre souches de *B. bassiana* présentaient une toxicité élevée sur *Galleria mellonella* (Lineus). De même, Abd El-Ghany *et al.* (2012) ont montré l'effet toxique de l'extrait brut de *B. bassiana* appliqué sur des larves de *G. mellonella* entraînant la mort de 55% de la population étudiée après 96 heures. Une des fractions ayant une activité insecticide a été identifiée comme étant la beauvericine.

Par ailleurs, l'isolat de *B. bassiana* a démontré son efficacité contre plusieurs espèces de coléoptères, notamment l'agrile du frêne, *Agrilus planipennis* (Johny *et al.*, 2012, Lyons *et al.*, 2012), l'anthonome de la fleur du fraisier, *Anthonomus signatus* Say, et le charançon de la racine du fraisier, *Otirhynchus ovatus* L. (Sabbahi *et al.*, 2008 a, b), le charançon du pin blanc, *Pissodes strobi* (Trudel *et al.*, 2007) et le grand hylésine du pin, *T. piniperda* (Lavallée *et al.*, 2005). Toutefois, pour chacune des espèces, la concentration létale (CL₅₀) semble être spécifique. Par exemple, avec une concentration de $7,4 \times 10^8$ conidies ml⁻¹, l'isolat INRS-242 aurait causé une mortalité de 50% des adultes de *Dindroctonus simplex*. Par contre, 10 fois moins de conidies sont nécessaires pour obtenir le même résultat chez le charançon du pin blanc (Trudel *et al.*, 2007) et le grand hylésine du pin (Lavallée *et al.*, 2005).

D'autre part, Benserradj (2014) a utilisé plusieurs souches de champignons entomopathogènes (*Metarhizium anisopliae* M1, M2, M3 et M5) afin de lutter contre les larves de *Culex pipiens*. Cet auteur a conclu que parmi toutes les souches testées, la souche M5 semblait la plus intéressante pour la lutte microbiologique contre les larves de *Culex pipiens*. Ce qui a, également, été rapporté par Saint-Louis *et al.*, (2001) faisant de *M. anisopliae* un excellent candidat comme mesure alternative aux pesticides de synthèse dans le cadre d'une lutte biologique ou une lutte intégrée.

Il est à noter que tous les travaux mentionnés précédemment ont été réalisés dans le but d'une lutte biologique contre les ravageurs des cultures ou des insectes vecteurs de maladies chez l'homme ; mais à l'heure actuelle aucune étude n'a été rapportée concernant l'effet toxique de *B. bassiana* contre l'espèce *Aspergillus niger*. Cette espèce étant incriminée aussi bien dans les maladies cryptogamiques, mais qui est aussi considérée comme un agent pathogène opportuniste qui peut causer chez l'homme toute une panoplie d'infections, incluant des infections des poumons, de la peau, des yeux, du cœur et des infections systémiques, et qui produit une grande variété d'enzymes extracellulaires et de toxines qui sont des facteurs importants de sa pathogénicité chez l'homme (Arian, 2014). D'où l'intérêt majeur de la présente étude.

CONCLUSION

Les deux objectifs principaux de cette étude étaient d'une part l'extraction des substances toxiques de *Beauveria bassiana* et d'autre part, de voir l'effet de celles-ci sur un champignon filamenteux souvent incriminé dans les maladies cryptogamiques et, un peu moins souvent, dans les infections mycosiques de l'homme. Il s'agit de l'espèce *Aspergillus niger*.

Les microchampignons entomopathogènes occupent une place privilégiée parmi les agents microbiens de lutte biologique. En effet, leur mode d'action assez particulier, par ingestion ou par contact, permet de contrôler efficacement tous les stades du ravageur. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypho-mycetes) (Moniliale) est un champignon microscopique pathogène pour de nombreux insectes et il est naturellement présent dans les écosystèmes. En effet, les différents essais conduits avec cette souche ont permis de réduire significativement les taux d'attaques des insectes avec des efficacités pouvant atteindre 83 et 87 %. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'effet de cet entomopathogène sur une espèce fongique incriminée aussi bien dans les maladies liées à l'agriculture (blé, arachide etc...) que dans celles qui affectent l'homme.

Les résultats de notre étude, malheureusement, ne mettent pas en évidence l'effet pathogène de *B. bassiana* sur *A. niger*. Les tests des différentes activités biologiques n'ont pas été concluant et ce, en partie à cause des contaminations répétées et inexplicables qui ont eu lieu. En effet, après ensemencement des deux milieux de culture, avec la solution sporale pour la mise en évidence du test de toxicité, il s'avère que toutes les boîtes inoculées ont présenté des contaminations dues en majorité par le genre *Penicillium*. Etant limitées par le temps, ce travail n'a pas pu être repris une troisième fois. Cependant, nous proposons comme perspectives permettant de poursuivre cette étude, les points suivants :

- Reprendre les tests d'activité, *in vitro*, de *B. bassiana* sur l'espèce *A. niger* et déterminer la DL_{50} des extraits utilisés
- Identifier les différents métabolites secondaires de *B. bassiana* par HPLC et par des techniques spectrophotométriques.
- Enfin, tester la pathogénicité d'autres entomopathogènes sur l'espèce *A. niger* afin de déterminer quel est le meilleur candidat en termes d'efficacité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Abarca L. M., Francesc A., José C. and Cabañes J. F. (2004).** Taxonomy and significance of black aspergilla. Antonie van Leeuwenhoek Kluwer, Academic Publisher, 86: 33-49.
- 2- **Abd El-Ghany, T.M., El-Sheikh, H.H., Abd El-Rahman, G.A., Abd El-Nasser, A.M. (2012).** Biodiversity of entomopathogenic fungi in new cultivated soil with their using to control of *Galleria mellonella*. *Int. J. Cur. Res.Rev.*, vol 4 (24), 17-31
- 3- **Arboleda, J.W., Gaitán-Bustamante, A.L., Valencia, A.J., GrossideSá, M.F. (2011).** Cytotoxicactivity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: An intraspecific evaluation of Beauvericin production. *Cur. Microbiol.*, Vol 63, 306-312.
- 4- **Austwick, P.K.C. 1965.** Pathogenicity of Aspergillus species. In: Raper, K.B., Fennell, D.I. (éd.) The Genus Aspergillus. Baltimore (MD) : Williams and Wilkins.
- 5- **Ayer W.A. et Pena-Rodriguez M. (1987).** Metabolites Produced by *Alternaria brassicae*.the Black Spot Pathogen of Canola, Part I, the Phytotoxic Components. *J. Natural Prod.* 50: 400-408.
- 6- **Bains P.S. et Tewari J.P. (1987).** Purification, chemical characterization and hostspecificityof the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:259–271.
- 7- **Baker, S.E., Bennett, J.W. 2007.** An overview of the genus Aspergillus. In: Goldman, G.H., Osmani, S.A. (éd.) The aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods. *Mycology*, vol. 26. Boca Raton, États-Unis : CRC Press Inc.
- 8- **Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998).** Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. The *Am. Phytopathol. Soc.*, vol 7 (4), p 216
- 9- **Benserradj O. (2014).** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle en Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques ; Département de Microbiologie, Université Frères Mentouri Constantine 1 ; 170 p.
- 10- **Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris, p 12-426
- 11- **Boucias, D.G., Pendland, J.C., Latge, J.P., 1998.** Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticule. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54, pp. 1795-1805.

- 12- **Bradfish GA & Harmer SL (1990)** ω -Conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Toxicon* 28: 1249–1254.
- 13- **Brakhage Axel A., Jahn B. and Schmidt A. (1999)**. *Aspergillus fumigatus*: biology, clinical aspects, and molecular approaches to pathogenicity, Volume 2, Ed KARGER, P. 221.
- 14- **Buchwaldt L et Jensen J.S. (1991)**. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. *Phytochem* 30:2311–2316.
- 15- **Campos RA, Arruda W, Boldo JT, da Silva MV, de Barros NM, de Azevedo JL, Schrank A & Vainstein MH (2005)**. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology* 50: 257-261.
- 16- **Chabasse D., Guiguen C. and Contet-Audonneau N. (1999)**. *Mycologie médicale*. Ed MASSON, Paris, P. 320.
- 17- **Chabani R. & Zahri A.(2018)**. Production de la protéase acide par des champignons entomopathogènes. Mémoire de Master en Mycologie et Biotechnologie fongique, Département de Microbiologie, Université Frères Mentouri –Constantine 1.
- 18- **Che Y., Swenson D.C., Gloer J.B., Koster B., Malloch D. (2001)**. Pseudodestruxins A and B: new cyclic depsipeptides from the coprophilous fungus *Nigrosabulum globosum*, vol 64 (5), 555-8
- 19- **Chen J.W., Liu B.L et Tzeng Y.M. (1999)**. Purification and quantification of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *J Chromatogr A* . 830:115–125.
- 20- **Clark H.E., Geldriche E.F.B, Kabler P.W., Huff C.B. (1985)**. Identification of Industrial microorganismes. *Appl. Microbiol. Process. Biochem.*, Vol 30, 723-727.
- 21- **Clarkson JM & Charnley AK (1996)** New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiol.* 4: 197-203.
- 22- **Davet, P. (1996)**. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris, p 52-57.
- 23- **Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ & Pei Y (2007)** Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 295–302.
- 24- **Espinel-Ingroff A, Canton E and Peman J. (2009)**. Updates in Antifungal Susceptibility Medicine Group LLC ISSN 1936-3761. Page 134.

- 25- **Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Pei Y (2007)** Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl Environ Microbiol.* 73:295–302.
- 26- **Faria, M., Wraight, S.P. (2001)**. Biological control of *Bemisia* with fungi. *Crop Protection*, vol 20, 767-778.
- 27- **Ferron, P. (1975)**. Les champignons entomopathogènes : évolution des recherches au cours des dix dernières années. Bull. SROP/WPRS. p 54
- 28- **Ferron, P. (1978)**. Biological control of insects pests by entomogenous fungi. *Annual Rev. Entomol.*, vol 23 (1), 409-442
- 29- **Genevès L. (1990)**. Champignons. In (Biologie Végétale : thallophytes et microorganismes) . Ed. DUNOD . Paris. pp. 59-90.
- 30- **Genevès L. (1992)**. Les thallophytes . In (Reproduction et développement des végétaux) Ed. DUNOD . Paris, pp. 5-16.
- 31- **Goettel, M.S., Inglis, G.D. (1997)**. Fungi: hyphomycetes. In: Lacey LA (ed.) *Manu Tech. Insect. Pathol*, vol 5 (3), 213–248. Academic Press, San Diego.
- 32- **Goettel, M.S., Inglis, G.D., Wraight, S.P., 2000**. Fungi. In Field manual of techniques in invertebrate pathology. Eds. Lacey, L.A., Kaya, H.K., pp. 255-282. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 33- **Guillaume V. (2006)**. Mycologie auto-évaluation et manipulation. Ed De Boeck & Lacier, Bruxelles, P.62.
- 34- **Guiraud J.P. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p : 310-321.
- 35- **Gupta S., Roberts D.W et Renwick J.A.A. (1989a)**. Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* :2347-2357.
- 36- **Gupta S., Roberts D.W et Renwick, J.A.A.(1989b)**. Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 12 :383-395.
- 37- **Hajek, A.E., Leger, S.T. (1994)**. Interactions entre les agents pathogènes fongiques et les hôtes insectes. *Revue annuelle d'entomologie*, Vol 39, 293-322
- 38- **Halouane, F. (1997)**. Cycle biologique de *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et de *Locustamigratoria* (Linnée, 1758). (Orthoptera, Acrididae). Efficacité de *Metarhizium anisopliae* (Metch) (Hyphomycète, Deteromycotina) et effet sur quelques paramètres physiologiques de *Schistocerca gregaria*. Thèse Mag. Sci. Agro., El Harrach. p 235

- 39- **Hamill, R. L.; Higgins, C. E.; Boaz, H. E.; Gorman, M.1969.** The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett*, v.49, p.4255-4258.
- 40- **Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. et Pegler D.N. (1994).** Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi , 8 th ed . International Mycological Institute, Egham.
- 41- **Hawksworth, D.L., Rossman, A.Y. (1997).** Where are all the undescribed fungi? *Phytopathol.*, vol 87, 888-891.
- 42- **Hawksworth, D.L. (2001).** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.*, vol 105, 1422-1432.
- 43- **Hegedus, D. D., Bidochka MJ, Miranpuri GS & Khachatourians GG (1992)** A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 785-789.
- 44- **Holder DJ & Keyhani NO (2005)** Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria*
- 45- **Iram, S., Ahmad, I., Stuben, D. 2009.** Analysis of mines and contaminated agricultural soil samples for fungal diversity and tolerance to heavy metals. *Pakistan J. Bot.* 41:885-895.
- 46- **Jaronski S.T. et Goettel M.S. ,1997 :** Development of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts. In Microbial control of grasshoppers and locusts (Goettel M.S. and Johnson D.L.) Mémoire of entomological society of Canada 171 :400 p.
- 47- **Jegorov A., Havlicek V et Sedmera P. (1998).** Rapid screening of destruxins by liquidchromatography/ mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 33 :274–80.
- 48- **Jirakkakul J, Punya J, Pongpattanakitsote S, Paungmoung P, Vorapreeda N, Tachaleat A, Cheevadhanarak S (2008)** Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsiblefor bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067. *Microbiology*154:995–1006.
- 49- **Johny, S., Kyei-Poku, G., Gauthier, D., van Frankenhuyzen, K., Krell, P.J. (2012).** Characterization and virulence of *Beauveria spp.* Recovered from emeraldashborer in south western Ontario, Canada. *J.Invert.Pathol.* vol 11 (1), 41-49.
- 50- **Kagamizono, T.; Nishino, E.; Matsumoto, K.; Kawashima, A.; Kishimoto, M.; Sakai, N.; He, B.-M.; Chen, Z.-X.; Adachi, T.; Morimoto, S.; Hanada, K.1995.** Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J. Antibiot.* v. 48, p.1407-1412.

- 51- **Kanally, R.A., In, S.K., Hur, H.G. 2005.** Biotransformation of 3-methyl-4-nitrophenol, a main product of the insecticide fenitrothion, by *Aspergillus niger*. *J. Agricul.Food Chem.* 53:6426-6431.
- 52- **Kapoor, A., Viraraghavan, T. 1998.** Application of immobilized *Aspergillus niger* biomass in the removal of heavy metals from an industrial wastewater. *J. Environ. Sci. Heal.* A33:1507-1514.
- 53- **Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R. 1999.** Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 70:95-104.
- 54- **Klich, M.A. 2008.** Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol. Ind. Health* 25:657-667.
- 55- **Klowden MJ (2007)** Physiological systems in insects. Academic Press, San Diego, CA, USA, Second Ed. 688 p.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123694935500031>
- 56- **Kozakiewicz Z. and Smith D. (1994).** Physiology of *Aspergillus*, In: Smith J.E. (eds.) *Biotechnology Handbooks (Vol.7) Aspergillus*, Plenum press, New York, p 23-40.
- 57- **Kredics, L., Varga, J., Antal, Z., Samson, R.A., Kocsubé, S., Narendran, V., Bhaskar, M., Manoharan, C., Vágvolgyi, C., Manikandan, P. 2008.** Black aspergilli in tropical infections. *Rev. Med. Microbiol.* 19:65-78.
- 58- **Lange C., Mulheim C., Cherton J.C., Cassier P., Vey A. et Pais M.(1991).** Desorption of ions from locust tissues. I. Behaviour of E-Destruxin using positive-ion fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5: 169-174.
- 59- **Lavallée R., Trudel R., Guertin C., Côté C., Coulombe C., Desrochers P., de Groot P., Alfaro R., Kope H., Sweeney J., Thurston G. (2005).** The use of *Beauveria bassiana* as a potential control method against the pine shoot beetle (*Tomicus piniperda*). IUFRO Meeting, Chapter S7.03.05, «Forest insect epidemics: Population dynamics, dispersal, and ecosystem impacts». (University of Northern British Columbia, Canada, July 11-14), p 12-13.
- 60- **Leveau J.Y. et Bouix M. (1993).** Les moisissures. In Florent J Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industrielle. (edn) Tec et Doc- Lavoisier.
- 61- **Leyral G. and Vierling E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4ème Ed Doin, P. 287.
- 62- **Lipa, J.J. 1975.** White muscardines (*Beauveria* sp.). In an outline of insect pathology. Foreign Sei. Publ. Dept NCSTE!, Warsaw, Poland. 139-J42.

- 63- **Liu B.L et Tzeng Y. M . (2011).** Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnol Adv.* 1-13.
- 64- **Liu, B. L.; Chen, J. W.; Tzeng, Y. M. 2000.** Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol. Prog.*, v.16, p.993-999.
- 65- **Liu, H., Bauer, L.S., 2006.** Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, vol. 99(4), pp. 1096-1103.
- 66- **Logrieco A, Moretti A, Ritieni A, Caiaffa MF, Macchia L.** Beauvericin: chemistry, biology and significance. In *Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation*, Upadhyay, R., Ed.; Kluwer Academic: New York, NY, USA, 2002; pp. 23–30.
- 67- **Loutelier C., Cherton J.C., Lange C, Traris M et Vey A. (1996).** Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae*: direct high-performance liquid chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests. *J Chromatogr A* .738 :181–189.
- 68- **Masayuki M. and Katsuya G. (2010).** *Aspergillus: molecular biology and genomics.* Ed Caister Academic Press, Norfolk (England), P. 238.
- 69- **Mathew R. (1995).** *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.
- 70- **Meyer A., Deiana J. and Bernard A. (2004).** *Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés.* 2ème Ed Doin, P. 430.
Microbiology 54: 1795-1805.
- 71- **Mochizuki, K.; Ohmori, K.; Tamura, H.; Shizuri, Y.; Nishiyama, S.; Miyoshi, W.; Yamamura, S. 1993.** The structures of bioactive cyclodepsipeptides, beauveriolides I and II, metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria* sp. *Bull Chem. Soc. Jpn*, v.66, p.3041-3046.
- 72- **Naseem, A., Sastry, K.S., Mohan, P.M. 1995.** Biosorption of silver ions by processed *Aspergillus niger* biomass. *Biotechnol. Lett.* 17:551-556.
- 73- **Nation JL (2016)** *Insect physiology and biochemistry.* CRC Press, Boca Raton, FL, Third Ed. 690 p.
- 74- **Ngoka, L. C. M.; Gross, M. L.; Toogood, P. L. 1999.** Sodium-directed selective cleavage of lactones: a method for structure determination of cyclodepsipeptides. *Int. J. Mass Spectrom*, 182/183, p.289-298.

- 75- **Nicholson RL, Hipskind H & Hanau RM (1989)** Protection against phenol toxicity by the spore mucilage of *Colletotrichum graminicola*, an aid to secondary spread. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 243-252.
- 76- **Ortiz-Urquiza, A, Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E. (2010).** Insect toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invert.Pathol.*, vol 105, 270-278.
- 77- **Ortiz-Urquiza A & Keyhani NO (2013)** Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357-374.
- 78- **Pais M., Das B.C et Ferron P. (1981).** Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*.
- 79- **Pal, S.; St Leger, R.J.; Wu, L.P.2007.** Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem*, v.282, p.8969-8977.
- 80- **Pasqualotto A. C. (2010).** Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science & Business Media, New York, P. 1027.
- 81- **Peng G, Xie L, Hu J & Xia Y (2009)** Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenous cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Current Genetics* 55: 263-271.
- 82- **Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakamchanakul, W., Samson, R.A. 2007.** Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.* 59:53-66.
- 83- **Person, A.K., Chudgar, S.M., Norton, B.L., Tong, B.C., Stout, J.E. 2010.** *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* 59:834-838.
- 84- **Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1997.** *Fungi and Food Spoilage*. New York : Springer.
- 85- **Potterat O., Wagner K., Haag H. (2000).** Liquid chromatography-electrospray time-offlightmass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptide in a crude extract of fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Chromatogr A* . 872 :85–90.
- 86- **Prelusky, D., Rotter, B., Rotter, R. 1994.** Toxicology of Mycotoxins. In: Miller, J., Trenholm, R. (éd.) *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. St. Paul : Eagan Press. p: 359-403.
- 87- **Price, M.S., Classen, J.J., Payne, G.A. 2001.** *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. *Bioresour. Technol.* 77:41-49.

- 88- **Quesada-Moraga, E.; Vey, A.2004.** Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.*, v.108, p.441-452.
- 89- **Reddy, M.S., Kumar, S., Babita, K., Reddy, M.S. 2002.** Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 84:187-189.
- 90- **Ruiz-Sanchez, E.; Orchard, I.; Lange, A. B.2010.** Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). *Toxicon* v.55, p.1162-1170.
- 91- **Sabbahi, R., Merzouki, A., Guertin, C. (2008).**Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries. *J. Appl. Entomol.*, vol 132, 124-134.
- 92- **Samson R. A. (1994).** Taxonomy current concepts of *Aspergillus* systematic. In: Smith J.E. *Biotechnology Handbooks (Vol.7)*, *Aspergillus* Plenum press, New York, p1.
- 93- **Samuels, R. I., Reynolds, S. E., & Charnley, A. K.1988.** Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Comp. Biochem. Physiol*, v.90, p.403-412.
- 94- **Schrank A & Vainstein MH (2010)** *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267–1274.
- 95- **Sedaghati, E., Rahmani, R., Khodaygan, P., Nadi, M. 2012.** Morphological identification of *Aspergillus* species isolated from fresh grape and raisin in Rafsanjan markets. *Acta Hort.* 963:51-53.
- 96- **Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevcken J. et Viseur J. (1993).** *Traité de pathologie végétale*. Gembloux. Belgique.
- 97- **Seshadri, S., Ignacimuthu, S., Lakshminarasimhan, C. 2004.** Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chem. Eng. Commun.* 191:1043-1052.
- 98- **Severo, L.C., Geyer, G.R., Porto N.S., Wagner, M.B., Londero, A.T. 1997.** Pulmonary *Aspergillus niger* intracavitary colonization. Report of 23 cases and a review of the literature. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:104-110.
- 99- **Singh HB.** *Beauveria bassiana* in Indian Agriculture: Perception, Demand and Promotion. IPMB, The 10th Conference of insect physiology, biochemistry and molecular biology, Nanjing, China, 2013, 122.

- 100- **Smith RJ & Grula EA (1981)** Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 222-230.
Society. 66 :497-411.
- 101- **Sowjanya, K.; Padmaja, V.2008.** Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. *Toxicon*, v.51, p.1140-1150.
- 102- **St Leger RJ (1993)** Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by Deuteromycete fungal pathogens. Parasites and pathogens of insects, Beckage NE, Thompson SA & Federici BA (Édit.) Academic Press, New York, USA Vol 2. p 211-225.
- 103- **St Leger RJ (1995)** The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73: S1119-S1125.
- 104- **St Leger RJ, Butt TM, Staples RC & Roberts RW (1990)** Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J.Gen. Microbiol.* 136: 1779-1789.
- 105- **Starnes, R. L., C. L. Liu et P. G. Marone. 1993.** History, use and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.* 39:83-91. DOI : 10.1093/ae/39.2.83.
- 106- **Takahashi, S.; Karinuma, N.; Uchida, K.; Hashimoto, R.; Yanagisawa, T.; Nakagawa, A.1998.** Pyridovericin and pyridomacrolidin: novel metabolites from entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*. *J. Antibiot*, v.51, p.596-598.
- 107- **Téllez-Jurado, A.; Cruz, R. M. G.; Flores, M. Y.; Asaff, T. A.; Arana Cuenca, A.2009.**Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, v.30, p.73-80.
- 108- **Tortora J., Funk B.F et Case Ch.I. (2003).** Introduction à la microbiologie , (edn). ISBN.Canada.
- 109- **Trudel, R., Lavallée, R., Guertin, C., Côté, C., Todorova, S.I., Alfaro, R., Kope, H. (2007).** Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodesstrobi* (Col., Curculionidae). *J. Appl. Entomol.*, vol 131, 90-97.
- 110- **Vey A, Hoagland RE & Butt TM (2001)** Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential, Butt TM, Jackson C & Magan N (Édit.) CABI, Cambridge, MA, USA. p 311-346.

- 111- **Vey, A.; Matha, V.; Dumas, C.2002.** Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction, *J. Invertebr. Pathol.* v.80, p.177-187.
- 112- **Vining, L. C.; Kelleher, W. J.; Schwarting, A. E.1962.** Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. *Can. J. Microbiol.*, v.8, p.931-933.
- 113- **Wang C & St Leger RJ (2007)** The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell* 6: 808-816.
- 114- **Ward O. P., Qin W. M., Dhanjoon J., Ye J. and Sing A. (2006).** Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 1-75.
- 115- **Wat, C.-H.; McInnes, A. G.; Smith, D. G.; Wright, J. L. C.; Vining, L. C.1977.** The yellow pigments of *Beauveria* species. Structures of tenellin and bassianin. *Can. J. Chem.*, v.55, p.4090-4098.
- 116- **Wei sel', J. 1972.** *Beauveria* Vuill. In. *Nemoci hmyzu*. Naklad. Ceskoslov. Akademie, parapha. 361-377p.
- 117- **Willis JH, Iconomidou VA, Smith RF & Hamodrakas SJ (2005)** Cuticular proteins. *Comprehensive molecular insect science*, Gilbert LI, Iatrou K & Gill SS (Édit.) Elsevier, Oxford, UK, First Ed Vol 4. p 79-109.
- 118- **Xu Y, Orozco R, Kithsiri Wijeratne EM, Espinosa-Artiles P, Leslie Gunatilaka AA, Patricia Stock S, Molna' r I (2009).** Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genet. Biol.* 46:353–364.
- 119- **Xu Y, Orozco R, Wijeratne EM, Gunatilaka AA, Stock SP, Molna' r I (2008).** Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem. Biol.* 15:898–907.
- 120- **Yun, J.S., 2003.** Studies on entomopathogenic fungi isolated from dead pine Caterpillars, *Dendrolimus spectabilis*. *Kor. J. Entomol.*, vol. 33(4), pp. 247-252.

ANNEXES

Composition des milieux de culture (g/l)

❖ Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH final = $5,6 \pm 0,2$

❖ Milieu liquide Czapek dox + Peptone

NaNO ₃	3g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ ...7H ₂ O.....	0,5g
KCl.....	0,5g
FeSO ₄ ... 7H ₂ O.....	0,01g
Saccharose.....	30g
Peptone	5g
Eau distillée.....	1000 ml

pH final = $5,6 \pm 0,2$

❖ Milieu PDA liquide

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH final = $5,6 \pm 0,2$

ملخص

يعد استخدام الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض بديلاً واعداً في مكافحة البيولوجية حيث هناك أكثر من 700 نوع من هذه الفطريات تؤدي دوراً مهماً في التنظيم الطبيعي لمجموعات الحشرات. ومن أكثرها شيوعاً: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutiella*, *Entomophthora* و *Entomophaga*. تقوم *Beauveria bassiana* بإفراز مجموعة من الأيضات السامة الغير انزيمية ذات نشاط مضاد للجراثيم والفطريات ويمكن استخدامها أيضاً كمبيد للحشرات، مما سمح من استخدامها بنجاح في مجال الزراعة. في هذا السياق، يهدف عملنا إلى دراسة تأثير فطريات *B. bassiana* على *Aspergillus niger* أحد أنواع الفطريات الممرضة للحشرات و المسببة لبعض الالتهابات الفطرية لدى الانسان. للقيام بذلك قمنا بزراعة فطر *B. bassiana* في وسائط مختلفة - Czapek- (Dox و PDA) بعد التخمير والتنقية، يتم استخراج الأيضات الثانوية بواسطة الكلوروفورم و اختبارها على *A. niger* بتركيزات مختلفة باستخدام طريقة البئر الصلبة. النتائج المتحصل عليها لم تكشف أي تأثير، حيث لم يلاحظ ظهور أي منطقة تثبيط حول الآبار. قد يشير هذا إلى عدم وجود نشاط مضاد للفطريات لـ *B. bassiana* ضد *A. niger* ولكن هذه النتائج غير حاسمة لهذا يجب إجراء اختبارات أخرى في هذا الاتجاه.

الكلمات المفتاحية: *Beauveria bassiana*، نشاط مضاد للفطريات، *Aspergillus niger*،
إيضات ثانوية

Abstract

The use of entomopathogenic microorganisms is a very promising alternative in biological control. Among the micro-organisms used in biological control, more than 700 species of micro-fungi are entomopathogenic and play an important role in the natural regulation of insect populations. The species of the genera *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* and *Entomophaga* are the most used. The broad spectrum of action and the virulence of *B. bassiana* have allowed it to be used successfully in agriculture. Indeed, this species secretes non-enzymatic toxic metabolites that have antibacterial, antifungal and insecticidal activities. In this context, our work aims to highlight the fungicidal effect of *B. bassiana* against a pathogenic fungus involved in both fungal diseases and in certain mycotic infections in humans, namely the species *Aspergillus niger*. To do this, *B. bassiana* was grown on two different media, Czapek-Dox and PDA. After purification, fermentation, the secondary metabolites were extracted with chloroform. The different concentrations of the crude extract were tested on *A. niger* using the solid medium. The results obtained revealed no detectable effect. Indeed, no inhibition zone has been observed around the wells. This could indicate the absence of antifungal activity of *B. bassiana* against *A. niger*, but these results are inconclusive. Other tests must be carried out in this direction.

Key words: *Beauveria bassiana*; Antifungal activity; *Aspergillus niger*; Secondary metabolites.

Extraction des métabolites secondaires du champignon entomopathogène, *Beauveria bassiana*, et leur impact sur l'espèce *Aspergillus niger*

Mémoire de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

L'utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une alternative très prometteuse, dans la lutte biologique. Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes. Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* sont les plus utilisées. Le large spectre d'action et la virulence de *B. bassiana* ont permis de l'utiliser avec succès en milieu agricole. En effet, cette espèce sécrète des métabolites toxiques non-enzymatiques qui ont des activités antibactériennes, antifongiques et insecticides. Dans ce contexte, notre axe de travail vise à mettre en évidence l'effet fongicide de *B. bassiana* contre un champignon pathogène impliqué aussi bien dans les maladies cryptogamiques que dans certaines infections mycosiques chez l'homme, à savoir l'espèce *Aspergillus niger*. Pour ce faire, *B. bassiana* a été cultivée sur deux milieux différents, Czapek-Dox et PDA. Après purification, fermentation, les métabolites secondaires ont été extraits à l'aide du chloroforme. Les différentes concentrations de l'extrait brut ont été testées sur *A. niger* en utilisant la méthode des puits sur milieu solide. Les résultats obtenus n'ont révélé aucun effet décelable. En effet, aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des puits. Cela pourrait indiquer l'absence d'une activité antifongique de *B. bassiana* à l'encontre d'*A. niger*, mais ces résultats ne sont pas concluants. D'autres essais doivent être réalisés dans ce sens.

Mots clés : *Beauveria bassiana* ; Activité antifongique ; *Aspergillus niger* ; Métabolites secondaires.

Laboratoire : Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne

Jury d'évaluation:

Président :	M ^{elle} Abdelaziz Wided	(M.C.B.- UFM Constantine 1).
Examineur :	M ^{me} Ghorri Sana	(M.C.B.- UFM Constantine 1).
Encadrant :	M ^{me} Mihoubi Ilhem	(Professeur.- UFM Constantine 1).
Tutrice :	Mme Zaamouchi Ahlem	(M.C.B.- UFM Constantine 1).

Défense date: 16/07/2019