



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



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

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Extraction et pré-caractérisation des mycotoxines du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*

Présenté par KOUHIL Rayene
KHEIRI Khouloud
BRIK Roumeissa

Le : 10/06/2024

Jury d'évaluation :

Président : Mme BENSERRADJ Ouafa (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : Mme MIHOUBI Ilhem (Professeur -Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Mme GHORRI Sana (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2023 - 2024



Dédicace

Avant tout, je remercie Dieu, Allah tout puissant, de m'avoir donné la force, le courage et la volonté pour la réalisation de ce modeste travail

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents, partis trop tôt mais toujours présents dans mon cœur, votre amour et votre soutien ont été des guides constants dans ma vie. Je vous porte toujours avec moi, Vous me manquez chaque jour, mais votre présence demeure éternelle dans mes pensées et dans mon cœur.

A mes frères Ryad et Ilyes, mes sœurs Esma, Yasmine et Meriam je vous souhaite une vie remplie de succès et de belles réalisations.

À ma famille chérie, un pilier de force et de soutien, en particulier à ma grand-mère Malika, merci pour votre présence, vos encouragements et votre affection.

Vous avez toujours cru en moi et m'avez donné la force de persévérer.

À ma meilleure amie Hiba, complice de mes rires et de mes larmes, compagne de toutes les saisons de ma vie, merci pour ton amitié indéfectible, ton soutien inconditionnel. Que notre amitié continue de s'épanouir et prospérer au fil des années.

À mes chères Roumeïssa et Khouloud Merci d'être les meilleurs partenaires de ce mémoire qui est dédié à nos rires partagés, nos larmes séchées, et à toutes les aventures que nous avons traversées ensemble.

À tous ceux qui occupent une place spéciale dans mon cœur, et que je n'ai pas eu l'occasion de mentionner, que cette dédicace sincère soit le témoignage de mes sentiments éternels envers vous.

Rayene... ♥



Dédicace

*Je remercie Dieu **Allah** Tout-Puissant et Miséricordieux de m'avoir donné santé, courage et volonté Et de la patience pour faire ce travail Nous remercions Dieu le généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas.*

*Je dédie mon succès A l'âme éternelle de **mon Père**, C'est vrai que tu es absent de la vie, mais tu es vivant dans mon cœur. Votre bonheur au paradis de bonheur, si Dieu le veut.*

*À **ma Mère**, la prunelle de mes yeux, Pour tous les sacrifices que vous avez faits. Pour tous les encouragements et le soutien dans les moments difficiles, j'espère que vous trouverez dans ce travail un témoignage de grands remerciements et de gratitude, Gratitude pour tous les efforts qu'elle a déployés et pour l'énergie qu'elle m'a insufflée durant toutes les périodes de ma vie et les moments de mes études.*

*À mon frère **Djamel** et à ma sœur **Radia**, Mes nièces et neveux. À toute ma famille surtout mon oncle **Faycal**.*

*À mes chers amis, **Adjadj Hanane** mon très cher amie, **Hamíad Lamíss** mon amie le plus proche. Et sans oublier mes amis **Bensalem Djihen** et **Bouhemam Rayene**. Tous les mots de gratitude et d'appréciation ne rendent pas justice aux amis. Les amis sont des lunes brillantes dans le ciel de la vie. Ils tendent la main vers la blessure et elle est guérie, et ils donnent à la vie un sens plus beau et plus merveilleux.*

Je me dédie également ce succès.

*On dit qu'un voyage de mille kilomètres commence par un seul pas. Et voilà, j'ai parcouru cette route, accompagné de mes amis **Kouhaíl Rayene** et **Kheíri Khouloud**, pas à pas, jusqu'à ce que nous terminions la route et atteignons le sommet, Malgré les difficultés et les problèmes, nous sommes restés unis et le resterons pour toujours. Merci de m'avoir aidé à réaliser ce rêve.*

Roumeíssa...♥



Dédicace

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

*Je remercie **DIEU** tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné santé, courage, volante et patience pour avoir réalisé ce travail.*

*À la femme qui souffert sans me laisser souffrir, mon soutien dans ma vie qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse mon adorable maman **NORA**.*

*À l'homme, qui n'ont pas cassée de me conseiller, encouragé et soutenir tout au long de mes études mon chère père **FATEH**.*

*À ma chère sœur **AMANI** et mon petit poussin **OUSSEID** la source de mon amour*

*A mon fiancé **DJOUBEIR** mon partenaire dans la vie*

À tous ma famille et mes amis pour leurs amours et leurs encouragements.

*Sans oublier mes chères amis **RAVENE** et **ROUMEISSA** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

KHOULOUD...♥

Remerciements

*Nous désirons exprimer notre profonde gratitude envers Dieu, Le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé le courage, la patience et la santé nécessaires à l'accomplissement de ce travail modeste. Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadrante, le professeur **Mihoubi Ilhem**, pour son accompagnement précieux malgré ses engagements professionnels.*

Madame, nous vous sommes reconnaissants pour votre expertise, votre soutien et vos conseils éclairés qui ont largement contribué à la réussite de notre recherche.

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux membres de jury **Dr Benserradj Ouafa** comme présidente et **Dr Ghorri Sana** comme examinatrice, pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche tout en acceptant d'évaluer, d'examiner et de juger ce travail pour leur intérêt porté à notre travail et leur évaluation attentive.*

*Docteur **Benserradj Ouafa** et **Zaamouchi Ahlem** pour leur suivi attentif tout au long de notre expérience au laboratoire.*

Nous tenons aussi à remercier chaleureusement tous les enseignants et étudiants du département de microbiologie, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et Activité Microbienne (Chaabet Erssas).

Enfin, nos remerciements s'étendent à toutes les personnes qui ont contribué, directement ou indirectement, à la réalisation de ce mémoire.

Tables des matières

Résumés	
Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	ii
Liste des figures	iii
INTRODUCTION	1
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS	2
1.1. Définition	2
1.2. Caractéristiques des champignons	2
1.3. Classification des champignons	3
1.4. Les champignons entomopathogènes	4
2. LE CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	6
2.1. Généralité sur l'espèce <i>Beauveria bassiana</i>	6
2.1.1 Taxonomie et classification	6
2.1.2 Morphologie	8
2.1.2.1 Aspect macroscopique	8
2.1.2.2 Aspect microscopique	8
2.2. Mode d'infection.....	9
2.3. Les facteur influençant l'efficacité de <i>Beauveria bassiana</i>	11
2.3.1. Les facteurs intrinsèques	11
2.3.2. Les facteurs extrinsèques.....	12
2.4. Utilisations et avantages	13
2.5. Les métabolites produits par <i>Beauveria bassiana</i>	14
3. LES MYCOTOXINES PRODUITES PAR <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	15
3.1. Définition des mycotoxines	15

3.2. Les principaux mycotoxines produites par <i>Beauveria bassiana</i>	16
3.3. La toxicité des métabolites de <i>Beauveria bassiana</i>	17
3.4. Les facteurs influençant sur la production des mycotoxines	17
3.4.1 Facteurs physiques	17
3.4.2 Facteurs chimiques	17
3.4.3 Facteurs biologique	17
3.5. Les méthodes de la détection et de dosage des mycotoxines	18
3.5.1. Chromatographie sur couche mince	18
3.5.2. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	19
3.5.3. Les méthodes de séparations et de quantification	19

PARTIE II : ÉTUDE EXPERIMENTALE

1. SOLEMENT ET IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON

ENTOMOPATHOGENE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	21
1.1. Echantonnage.....	21
1.2. Préparation du milieu d'isolement.....	21
1.3. Isolement de la flore fongique	21
1.4. Purification de souches isolées	22
1.5. Identification morphologique	22
1.5.1. Identification macroscopique	22
1.5.2. Identification microscopique	22

2. ETUDES MYCOTOXICOLOGIQUE.....

2.1. Production de mycotoxine sur milieu de fermentation	23
2.1.1. Préparation du milieu de fermentation	23
2.1.2. Ensemencement du milieu de fermentation	23
2.2. Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation.....	24
2.3. Détection des mycotoxines par chromatographe sur couche mince	25

PARTIE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON ENTOPATHOGENE	
<i>BEAVERIA BASSIANA</i>	26
1.1. Isolement.....	26
1.2. Identification.....	26
1.2.1. Étude macroscopique	27
1.2.2. Etude microscopique	27
2. ETUDE MYCOTOXICOLOGIQUE	29
2.1. Extraction des mycotoxines élaborés par <i>Beauveria bassiana</i>	29
2.2. Analyse des mycotoxines par Chromatographie sur couche mince	30
CONCLUSION	34
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	35
ANNEXE	

ملخص

تلعب الفطريات المسببة للأمراض الحشرية، التي تضم أكثر من 700 نوع، دورًا حاسمًا في التنظيم الطبيعي لتجمعات الحشرات وفي مكافحة البيولوجية. من بينها، *Beauveria bassiana* ملحوظة بشكل خاص بسبب قدرتها على إنتاج العديد من الأيضات الثانوية، بما في ذلك السموم الفطرية مثل بوفيرييسين. تهدف هذه الأطروحة إلى عزل وتحديد سلالات بوفيريا من تربة الحبوب والكشف عن السموم الفطرية المنتجة باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM). للقيام بذلك، تم جمع عينات التربة وزراعتها في وسط PDA تم احتضان السلالات المعزولة وتحديدها عن طريق المراقبة المجهرية لخصائصها المورفولوجية. تم زراعتها في وسط تخمير، وتم استخراج الأيضات الثانوية باستخدام الكلوروفورم. تم تأكيد وجود السموم الفطرية بواسطة CCM، مما يكشف عن نطاقات فلورية مميزة تحت مصباح الأشعة فوق البنفسجية بقيم تبلغ 0,55 ; 0,61 ; 0,7 ; 0,78. في الختام، أظهرت الدراسة أن *Beauveria bassiana* لديها القدرة على إنتاج السموم الفطرية بدرجات متفاوتة من السمية، وأكدت الطرق الكروماتوغرافية، وخاصة CCM، وجود هذه الأيضات. تسلط هذه النتائج الضوء على إمكانات *Beauveria bassiana* كعامل فعال في السيطرة الحيوية، وقادر على إنتاج مركبات نشطة بيولوجيًا مفيدة في إدارة مجموعات الآفات الحشرية.

الكلمات المفتاحية : الفطريات الممرضة للحشرات، *Beauveria bassiana*، السموم الفطرية، بوفيرييسين، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

Abstract

Entomopathogenic fungi, with more than 700 species, play a crucial role in the natural regulation of insect populations and in biological control. Among them, *Beauveria bassiana* is particularly notable for its ability to produce various secondary metabolites, including mycotoxins such as beauvericin. This study aims to isolate and identify *Beauveria* strains from cereal soil and detect the mycotoxins produced using thin-layer chromatography (TLC). For this purpose, soil samples were collected and cultured on PDA (Potato Dextrose Agar) medium. The isolated strains were incubated and identified by microscopic observation of their morphological characteristics. They were cultivated in a fermentation medium, and secondary metabolites were extracted using chloroform. TLC, revealing characteristic fluorescent bands under UV light with R_f values of 0,78 ; 0,7 ; 0,61 ; 0,55., confirmed the presence of mycotoxins. In conclusion, the study demonstrated that *Beauveria bassiana* has the ability to produce mycotoxins with varying degrees of toxicity, and chromatographic methods, primarily TLC, confirmed the presence of these metabolites. These results highlight the potential of *B. bassiana* as an effective biocontrol agent, capable of producing bioactive compounds useful in managing pest insect populations.

Keywords: Entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, Mycotoxins, Beauvericin, Thin-layer chromatography.

Liste des abréviations

- ❖ **µm** : Micromètre
- ❖ **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique
- ❖ **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- ❖ **CPG** : Chromatographie phase gazeuse
- ❖ **Da** : Dalton (unité de masse atomique)
- ❖ **ELISA** : Enzyme-linked immunosorbent assay
- ❖ **HPLC** : Chromatographie liquide sous haute performance
- ❖ **LC/MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
- ❖ **MS** : Spectrométrie de masse
- ❖ **PDA** : Potato dextrose agar
- ❖ **PDB** : Potato dextrose broth
- ❖ **pH** : Potentiel d'hydrogène
- ❖ **UV** : Radiation ultraviolet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Champignons affectant les moustiques	05
Tableau 2 : Classification de l'espèce <i>Beauveria bassiana</i>	07
Tableau 3 : Les facteurs intrinsèques influençant l'efficacité de <i>Beauveria bassiana</i> .	12
Tableau 4 : Caractères macroscopique de <i>Beauveria bassiana</i>	27
Tableau 5 : Caractères microscopique de <i>Beauveria bassiana</i>	28
Tableau 6 : Le calcul des résultats des rapports frontaux de l'extrait du <i>Beauveria bassiana</i>	32

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un hyphe cloisonné et l'hyphe non cloisonné	03
Figure 2 : Classification des champignons	04
Figure 3 : Aspect macroscopique de <i>Beauveria bassiana</i> (A) Aspect microscopique de <i>Beauveria bassiana</i> (Hyphes et mycélium de <i>Beauveria bassiana</i>) (B)	08
Figure 4 : Mode d'infection de <i>Beauveria bassiana</i>	09
Figure 5 : Insecte infecté par <i>Beauveria bassiana</i>	11
Figure 6 : Les métabolites produits par <i>Beauveria bassiana</i>	14
Figure 7 : Schéma de Chromatographie sur couche mince	18
Figure 8 : Schématisation de la méthode ELISA	19
Figure 9 : Schéma explicative de la méthode d'isolement	22
Figure 10 : Incubateur-agitateur	24
Figure 11 : Etapes d'extraction des métabolites secondaire par ampoule à décontation (A) et rotavapor (B).....	25
Figure 12 : Développement de Colonies de <i>Beauveria bassiana</i> après 16 Jours sur Milieu PDA, Suite à la Dilution 10^2	26
Figure 13 : Caractères macroscopiques (A) et microscopiques (B) de <i>Beauveria bassiana</i> (C) Schéma représentatif du genre <i>Beauveria</i> (Benzina <i>et al.</i> , 2018)	29
Figure 14 : Développement morphologique de <i>Beauveria bassiana</i> sur milieu de fermentation (PDA liquide)	29
Figure 15 : Extrait brute de <i>Beauveria bassiana</i>	30
Figure 16 : Résultat de la CCM de l'extrait de <i>Beauveria bassiana</i> observés sous lumière UV ($\lambda = 365$ nm) développées dans le système solvant (chloroforme/Méthanol 9/1 ; V/V)	31

INTRODUCTION

Les champignons entomopathogènes, représentant plus de 700 espèces, sont des acteurs essentiels de la régulation naturelle des populations d'insectes, et on générale dans la lutte biologique. Parmi ces espèces, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Entomophthora* et *Entomophaga* sont largement utilisés. Leur présence dans le sol leur permet d'infecter et d'éliminer les insectes et autres arthropodes en traversant leur cuticule, les rendant ainsi des agents efficaces de biocontrôle contre les insectes ravageurs des plantes. Dans ce rôle crucial, ils contribuent significativement à la gestion des nuisibles et à la préservation de la santé des cultures. (Mantzoukas *et al.*, 2022).

Parmi ces champignons, *Beauveria bassiana*, un champignon filamenteux généralement utilisé en lutte biologique, agit comme un pathogène sur diverses espèces d'insectes. Il est considéré comme un pesticide non sélectif car il parasite un très grand nombre d'hôtes arthropodes (Humber, 2012). *Beauveria* est reconnu pour sa capacité à produire une variété de métabolites secondaires chimiquement diversifiés, ce qui en fait un champignon entomopathogène de premier plan.

Les métabolites secondaires sécrétés peuvent inclure en premier lieu des mycotoxines, qui sont des composés organiques toxiques. Leur présence dans l'environnement peut avoir des conséquences néfastes sur la santé des humains, des animaux et des plantes. Parmi les mycotoxines les plus connues chez *Beauveria bassiana*, on peut citer la beauvéricine, qui est la plus étudiée, ainsi que d'autres composés tels que les bassianolides et les beauvériolides (Al khouy *et al.*, 2019).

Ce mémoire vise à présenter de manière détaillée les résultats de notre étude, en mettant particulièrement l'accent sur le processus d'extraction des mycotoxines à partir du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*. Les objectifs de notre travail comprennent :

- Isoler les souches de *Beauveria bassiana* à partir d'un sol céréalier.
- Évaluer la capacité de ces souches à produire des mycotoxines par fermentation sur milieu de culture liquide.
- Détecter et identifier les mycotoxines produites par *Beauveria bassiana* en utilisant la chromatographie sur couche mince.

Synthèse

Bibliographique

CHAPITRE 01 : GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS

1.1. Définition

Le terme champignon dérive directement du mot latin « champignon », les origines des études fongiques ont commencé en 1836 avec l'étude de **Miles Joseph Berkeley** publication auparavant, les taxonomistes considéraient que les champignons étaient étroitement liées aux plantes, en fonction de leur morphologie et leur habitat de croissance similaire. Environ 144000 espèces de champignons ont été formellement décrites. Mais il a été estimé qu'il pourrait y en avoir de 2,2 à 3,3 millions d'espèces et le nombre réel est donc loin d'être exact. Les espèces fongiques se distinguent par différentes approches et concepts basés sur la morphologie, la physiologie, la biochimie ou les réactions aux produits chimiques essais (**Senanayake et al., 2020**).

Les champignons également appelés Mycètes=fungus Ce sont des organismes eucaryotes possèdent un vrai noyau, unicellulaire ou pluricellulaire représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle primordial dans l'écosystème ils sont des thallophytes ne possèdent ni tige ni racine ni feuilles ni fleur dépourvus de chlorophylle, Il existe deux modes de reproduction sexuée et asexuée. Les spores produites peuvent avoir un rôle dans la diffusion des champignons. De plus, ces mécanismes peuvent jouer un rôle crucial dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (**Madelin, 1994**).

Les champignons sont des microorganismes hétérotrophes, nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur croissance, Ils sont présents de manière ubiquitaire dans la nature. Leur rôle principal est la dégradation et le recyclage de la matière organique. leur potentiel pathogène peut se manifester de différentes manières, notamment par la production de toxines qui peuvent entraîner des intoxications alimentaires ou des mycotoxicoses (**Chabasse et al., 2002**).

1.2. Caractéristiques des champignons

Les mycètes sont des espèces macroscopiques (macromycètes) ainsi que des espèces microscopiques (micromycètes), qui peuvent adopter des formes filamenteuses ou levuriformes. Le thalle végétatif peut se présenter sous deux aspects différents (Figure 01) :

□ Septomycètes (cloisonnés) régulier et fin avec septum (cloison transversale séparant les articles) chez les champignons supérieurs = asco et basidiomycètes.

□ Siphomycètes (non cloisonnés) irréguliers chez les champignons inférieurs = zygomycètes (Benmezdad, 2018).

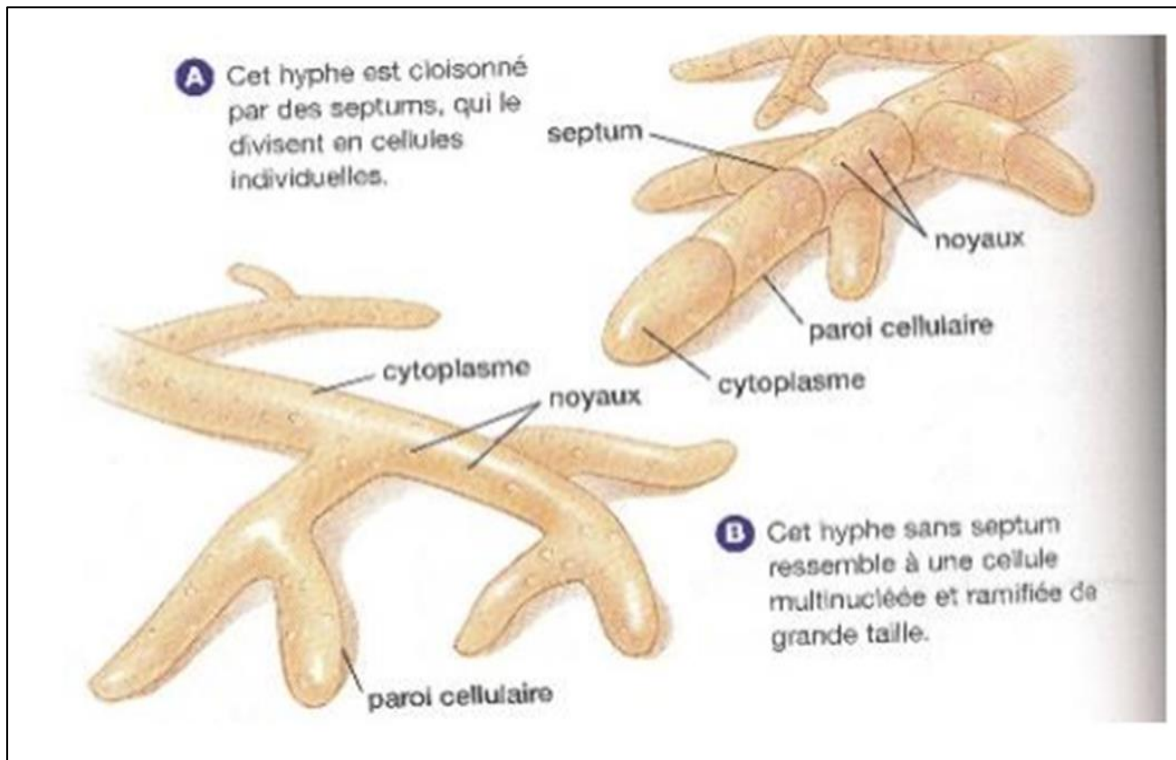


Figure 01 : Structure d'un hyphe cloisonné et l'hyphe non cloisonné

<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcREkfawhehdUiqBOXQtaPaxwYiQ33ptkXCqII6fOj4rbg&s>

En général, pour une croissance optimale des champignons il y a plusieurs paramètres tel que : l'activité d'eau 85 %, le pH entre 3 et 8 et pour une croissance optimale le pH entre (5 et 6), et le besoin d'oxygène par ce que les moisissures sont des microorganismes aérobie, la plupart des champignons sont mésophile donc la température entre 20 et 25 °C (Tabuc, 2007).

1.3. Classification des champignons

Dans la classification du règne animal, les mycètes constituent un règne distinct de celui des végétaux et des animaux, ce règne contient quatre phylums selon la classification des **Kirk** les Chytridiomycota, les Ascomycota, les Basidiomycota et les Zygomycota (Figure 02) (Kirk *et al.*, 2001).

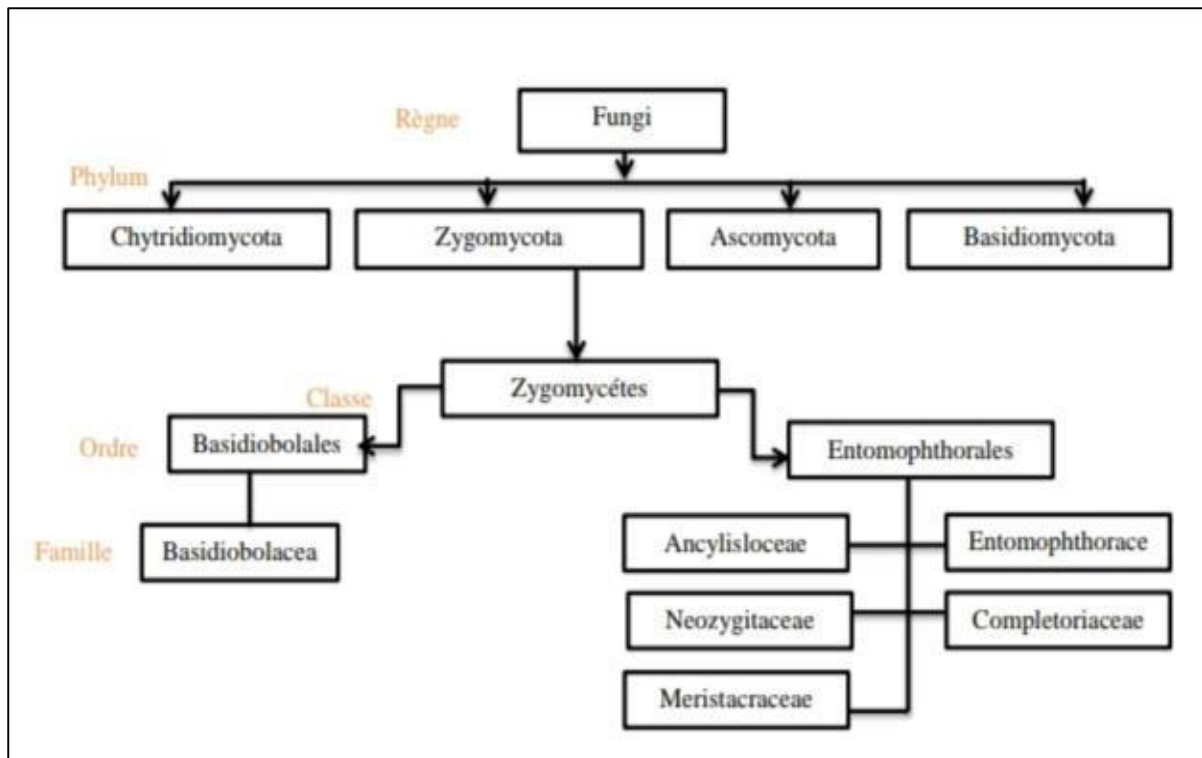


Figure 02 : Classification des champignons selon (Kirk *et al.*, 2001).

1.4. Les champignons entomopathogènes

Plus de 700 espèces de microchampignons sont entomopathogènes et essentielles à la régulation naturelle des populations d'insectes. Les premières recherches scientifiques des champignons entomopathogènes remontent aux années 1830, avec l'article de **Bassi (1835)**. Ils appartiennent au sous-taxon des Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota et Deuteromycota (**Wraight et Robert, 1987 ; Starnes *et al.*, 1993**).

Les champignons entomopathogène sont des agents pathogènes eucaryotes qui provoquent des maladies chez les insectes comprennent : les bactéries, les protozoaires, les virus et les champignons se produisent naturellement sous forme d'infections par la pénétration directe à travers leur cuticule qui peuvent être recueillis sur le terrain et incubés en laboratoire pour la documentation du champignon (**Meyling et Eilenberg, 2007 ; Goettel,1992**).

La plupart des entomopathogènes ont des cycles de vie qui se synchronisent avec les stades hôtes des insectes et les conditions environnementales (**Shah et Pell, 2003**), Le champignon se développe rapidement dans la hémocoel de l'insecte, entraînant la mort de l'hôte sensible dans un délai typique de 3 à 10 jours. Après le décès de l'insecte, le

champignon entre dans une phase hyphale, envahissant les organes internes avant de produire des spores à sa surface. Ce schéma infectieux est généralement partagé par la plupart des champignons entomopathogènes, leur mode d'infection comprend généralement quatre étapes distinctes : adhérence, germination, pénétration et dissémination (**Ferron et al, 1993**). Les genres le plus couramment utilisés sont : *Beauveria*, *Metarhizium*, *Tolypocladium*, *Verticillium* et *Paecilomyces* (**Kamp et Bidochka, 2002**). Les principales espèces sont reprises dans le Tableau ci-dessous :

Tableau 01 : Champignons affectant les moustiques (**Scholte et al., 2004**).

Règne	Embranchement	Ordre	Espèce		
Chromista	Oomycota	Peronosporales	<i>Crypticola clavulifera</i>		
			<i>Lagenidium giganteum</i>		
			<i>Pythium flevoense</i>		
		Saprolegniales	<i>Pythium carolinianum</i>		
			<i>Leptolegnia caudata</i>		
			<i>Leptolegnia chapmanii</i>		
Fungi	Chytridiomycota	Blastocladales	<i>Coelomomyces indicus</i>		
			<i>Coelomomyces psorophorae</i>		
			<i>Coelomomyces stegomyiae</i>		
	Zygomycota	Entomophthorales	<i>Conidiobolus coronatus</i>		
			<i>Entomophthora culicis</i>		
			<i>Entomophthora destruens</i>		
			<i>Erynia aquatica</i>		
			Ascomycota	Harpellales	<i>Smittium morbosum</i>
				Hypocreales	<i>Culicinomyces clavisporus</i>
	<i>Beauveria bassiana</i>				
	<i>Beauveria brongniartii</i>				
				<i>Metarhizium anisopliae</i>	
			<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>		

CHAPITRE 02 : LE CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE *BEAUVERIA BASSIANA*

2.1. Généralité sur l'espèce *Beauveria bassiana*

Le genre *Beauveria* a une longue histoire qui remonte au début des années 1800, lorsque les fermes de vers à soie d'Italie et de France étaient touchées par des maladies qui frappent périodiquement de l'industrie séricicole européenne en 1807 (**Bassi, 1835**). C'est une souche parmi les champignons entomopathogènes qui se développe dans le sol, elle est mycoïnecticide enregistré populaire, possédant une liste d'hôtes extrêmement longue de 700 espèces d'insectes. Cette souche est ubiquitaire et pathogène pour un large spectre d'arthropodes, sa gamme d'hôtes couvrant la plupart des ordres de classe Insecta (**Umadevi et al., 2008**).

C'est un champignon filamenteux généralement utilisé en lutte biologique, et agit comme un pathogène sur diverses espèces d'insectes. Il est considéré comme un pesticide non sélectif par ce qu'il parasite un très grand nombre d'hôtes arthropodes. *Beauveria bassiana* est également appliqué contre la pyrale du maïs, la chenille du pin et les cicadelles vertes (**Humber, 2012**).

Ce champignon sécrète un ensemble d'enzymes et de métabolites secondaires, qui ont tous des rôles biologiques cruciaux. Les chitinases, les lipases et les protéases sont considérées comme les plus importantes de toutes les enzymes. Cependant, des études ont également montré leur capacité à produire d'autres enzymes vitales, notamment l'amylase, l'asparaginase, la cellulase, la galactosidas etc. (**Amobonye et al., 2020**).

2.1.1. Taxonomie et classification

La classification taxonomique de *Beauveria* a suscité des débats, entraînant une confusion considérable dans la désignation des genres après sa découverte. Au départ, *Beauveria* était assimilée à *Botrytis*, *Sporotrichum*, *Isaria* et d'autres genres anamorphiques. La première proposition d'une espèce type pour *Beauveria* a été faite par Balsamo-Crivelli (1835), qui l'a appelée *Botrytis bassiana* Bals.-Criv en hommage aux découvertes de Bassi. Cependant, le genre *Beauveria* n'a été officiellement décrit qu'au début du 20e siècle par Vuillemin (1912), qui a désigné *Botrytis bassiana* comme espèce type. Plus tard, en 1914, le nom a été modifié en *Beauveria bassiana* pour honorer la contribution significative de Beauverie (**Imoulan et al., 2017**).

La classification du *Beauveria* selon **Rehner et Buckley** en 2005 (Tableau 02) est classée comme suit :

Tableau 02 : Classification de l'espèce *Beauveria bassiana* (Rehner et Buckley, 2005).

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Sous phylum	Pezizomycotina
Classe	Sardanomycetes
Sous classe	Hypocreomycetidae
Ordre	Hypocreales
Famille	Cordycipitaceae
Genre	<i>Beauveria</i>
Espèce	<i>Beauveria bassiana</i>

2.1.2. Morphologie

Les champignons entomopathogènes sont identifiés principalement en analysant divers éléments morphologiques à la fois macroscopique et microscopique, tels que la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium aérien, ainsi que la présence de spores et leur apparence.

2.1.2.1. Aspect macroscopique

Les colonies issues de la culture des champignons sont examinées sans microscope afin d'observer leurs caractéristiques macroscopiques. *Beauveria bassiana* forme des colonies qui ressemblent à du coton blanc à jaunâtre, avec une texture poudrée et duveteuse. Initialement blanches, elles peuvent ensuite prendre une teinte jaunâtre ou rose dans certains cas (**Botton et al., 1990**).

2.1.2.2. Aspect microscopique

Il est nécessaire d'observer les champignons au microscope optique pour les identifier microscopiquement. Les conidies ou spores sont portées par de longs filaments

en zigzag, appelés hyphes, qui sont des structures transparentes et segmentées ayant un diamètre compris entre 2,5 et 25 μm . Ces conidies se forment sur de courts épis, ce qui donne aux cellules conidiogènes un aspect épineux. Lorsque le champignon est exposé à l'air, il produit des conidiospores de forme sphérique (avec un diamètre de 1 à 4 μm) ou ovale (mesurant entre 1,55 et 5,5 μm de longueur sur 1 à 3 μm de largeur), mais en absence d'oxygène, il génère des blastospores de forme ovale (ayant un diamètre de 2 à 3 μm et une longueur de 7 μm) (Figure 03). Ces blastospores ont la même capacité infectieuse que les conidies (Ziani, 2008).

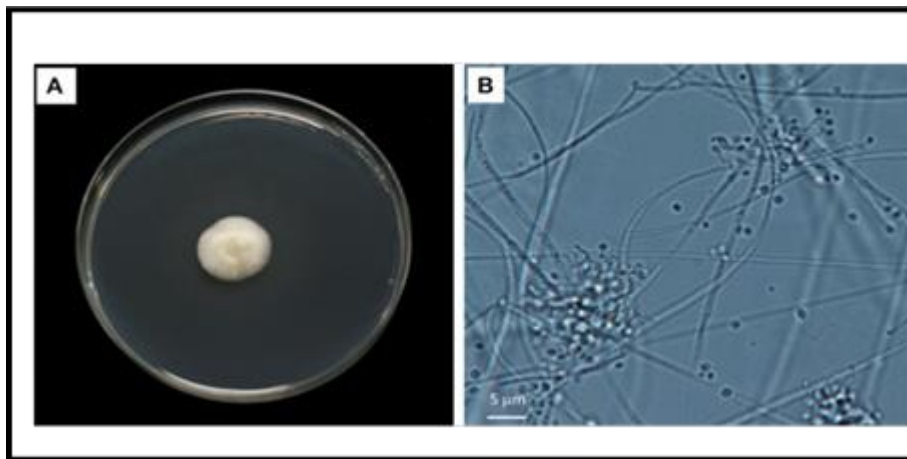


Figure 03 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Beauveria bassiana* (Hyphes et mycélium de *Beauveria bassiana*) <https://ars.elscdn.com/content/image/1-s2.0-S1341321X15002482-gr2.jpg>.

2.2. Mode d'infection

L'infection de *Beauveria bassiana* se produit en contact direct avec les insectes cibles (Figure 04). Effectivement, le champignon peut pénétrer et se déplacer à travers la cuticule de l'hôte généralement par voie percutanée, affaiblissant ainsi la barrière physiologique de l'hôte grâce à des mécanismes enzymatiques et physiques impliqués. D'une manière générale, le processus d'infection de *Beauveria bassiana* il comprend les étapes suivantes (Zimmermann, 2007 ; Badaoui, 2018).

- L'adhésion (fixation de la spore à la cuticule).
- La germination.
- La pénétration et les réactions de défense immunitaire.
- La prolifération.

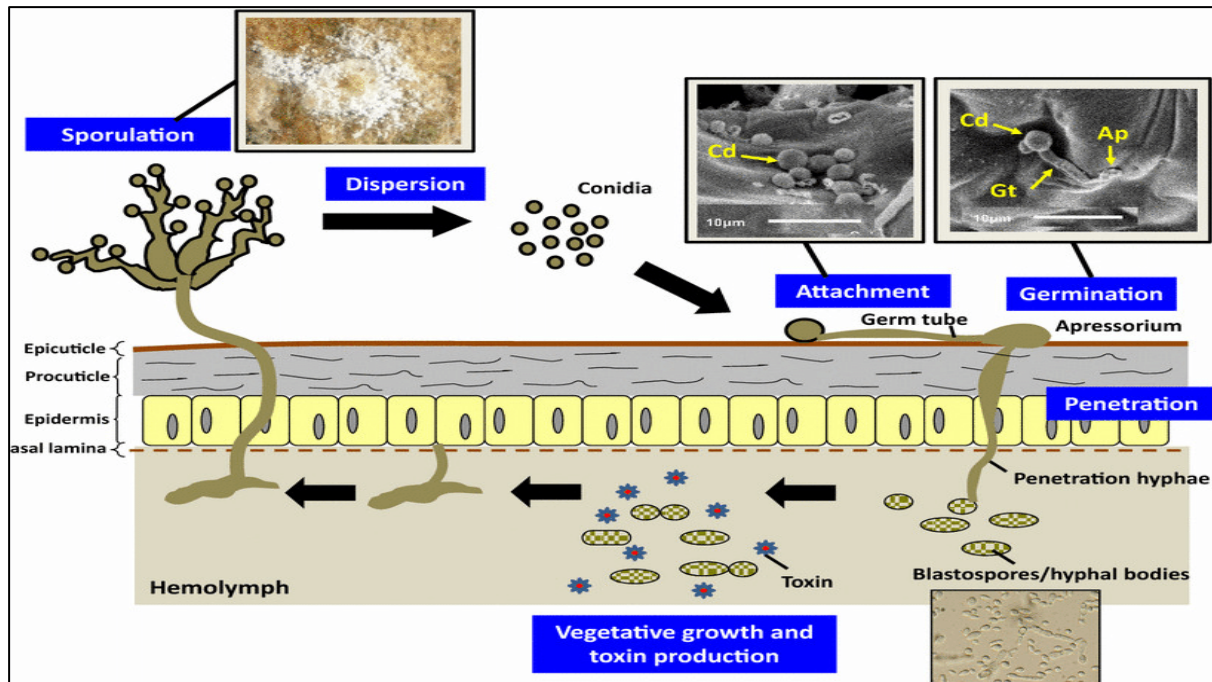


Figure 04 : Mode d'infection de *Beauveria bassiana* (Moura et Jaronski, 2016).

➤ L'adhésion (Fixation de la spore à la cuticule)

C'est la première étape du processus d'infection. Les conidies (conidiospores) se rapprochent de la cuticule en raison de divers éléments tels que le vent et l'eau. Des forces hydrophobiques et des charges électrostatiques permettent l'adhérence des spores à la cuticule des insectes. Les conidies de *B. bassiana* ont démontré des caractéristiques hydrophobiques en raison de la présence de protéines riches en cystéine, connues sous le nom d'hydrophobines. L'hydrophobicité des spores revêt une importance capitale non seulement pour leur attachement, mais aussi pour préserver les conidies du dessèchement, le champignon pénètre dans les zones plus fines et non rigide de la cuticule, comme articulations, entre les segments ou les pièces buccales (Hegedus *et al.*, 1992).

➤ La germination

C'est la deuxième étape se fait à travers les spores qui germe et les hyphes qui pénètrent la cuticule de l'insecte (Kamp et Bidochka, 2002). Elle est caractérisé par la production appressorium et leur développement pourrait également être influencé par des signaux moléculaires intracellulaires tels que l'activation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et la libération de Ca^{++} , ce qu'on appelle des piquets d'infection par les tubes germinatifs qui favorise le ramollissement de la cuticule et la pénétration du

champignon. La germination est fortement influencée par le pH, la température, l'eau, la présence des composés toxiques, et la teneur en oxygène (**Chamley, 1984**).

➤ **La pénétration**

La pénétration à travers la cuticule et les réactions de défense immunitaire est la troisième étape se fait par des moyens mécaniques et par la production de plusieurs enzymes, dont des protéases, chitinases et lipases, Pendant le processus d'infection, *Beauveria* produise des enzymes protéolytiques et des toxines, tandis que les insectes hôtes réagissent avec réactions de défense cellulaire et humorale. Ces réactions consistent en la production de composés antifongiques, inhibiteurs de protéase inductibles et protéines, qui détoxifient les toxines fongiques chez l'insecte (**Zimmermann, 2007 ; Badaoui, 2018**).

➤ **Prolifération**

C'est la phase finale du processus de développement du champignon. Son processus se divise en deux étapes : la prolifération interne et la formation de la muscardine. La prolifération interne consiste, après pénétration de la cuticule, en la génération des blastospores à partir des appressoriums qui sont libérés dans l'hémolymphe. Les hyphes se forment de chaque côté des blastospores dans l'abdomen de l'insecte et font face à une compétition particulière de la part des bactéries intestinales, Avec le temps, *B. bassiana* a développé la capacité de générer plusieurs produits.

Quant à la formation de la muscardine, après avoir envahi l'hémolymphe de l'insecte avec succès et que les conditions sont propices, les hyphes se développent à travers les différentes couches de l'exosquelette et les rassemblent, ce qui empêche la mue de l'insecte et lui permet de se débarrasser des cellules fongiques infectieuses. Les hyphes se déplacent à travers le tégument jusqu'aux points intersegmentaires de la cuticule, qui sont des zones plus souples qui permettent l'articulation de l'objet. La surface de l'insecte est ensuite recouverte par les hyphes, créant ainsi un mycélium blanc cotonneux qui l'entourera entièrement (Figure 05). Le symptôme de la muscardine blanche permet de détecter la maladie chez les insectes. La formation des conidies se produit à la fin des hyphes. Quand les conidies atteignent leur maturité, elles sont libérées dans leur environnement naturel (**Zimmermann, 2007 ; Badaoui, 2018**).



Figure 05 : Insecte infecté par *Beauveria bassiana* (Michael, 2002).

2.3. Les facteurs influençant l'efficacité de *Beauveria bassiana*

L'efficacité des champignons entomopathogènes en tant qu'agents de lutte biologique est conditionnée par leurs caractéristiques physiologiques, la population de l'hôte et les conditions de l'environnement (Tableau 03) (Badaoui, 2018).

2.3.1. Les facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques jouent un rôle crucial dans la détermination de l'efficacité de *Beauveria bassiana* en tant qu'agent de lutte biologique contre les ravageurs agricoles et forestiers. Comprendre et manipuler ces facteurs est essentiel pour optimiser l'utilisation de ce biopesticide dans le contrôle des populations d'insectes nuisibles (Tableau 03).

Tableau 03 : Les facteurs intrinsèques influençant l'efficacité de *Beauveria bassiana* (Badaoui, 2018).

Les facteurs intrinsèques	Explication
1 /Facteurs liés aux pathogènes	<p>-La virulence et la particularité de l'hôte jouent un rôle crucial dans la sélection d'un candidat adéquat pour la lutte biologique.</p> <p>-On a prouvé que les insectes appartenant à la même population montrent une sensibilité qui varie en fonction des isolats de <i>Beauveria bassiana</i>.</p> <p>- À l'échelle industrielle, il est crucial d'effectuer des tests biologiques standardisés en laboratoire pour vérifier le potentiel insecticide des préparations fabriquées et surveiller leur stabilité de conservation.</p>
2/ Facteurs dépendant de l'hôte	<p>On sait que l'infection fongique peut être sensible à tous les stades de développement de l'insecte, de l'œuf jusqu'à l'adulte, ce qui peut entraîner la mort des insectes en quelques jours, en fonction de leur sensibilité.</p>

2.3.2. Les facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales et la sensibilité de l'insecte sont deux facteurs principaux qui influent sur la réussite de l'infection fongique (UmaDevi *et al.*, 2008). Ces facteurs sont :

- Le rayonnement solaire
- La température
- L'humidité relative
- Effet de sol
- Le pH
- Substances nutritives (glucose, saccharose, peptone, protéine...)

2.4. Utilisations et avantages

Le champignon *Beauveria bassiana* (Balsamo) est reconnu comme un agent de suppression efficace pour diverses espèces d'insectes à travers le monde. Son utilisation en tant qu'outil de lutte biologique contre les ravageurs des plantes, y compris les champignons. En Amérique du Nord, *balsamo* est naturellement présent comme agent de lutte contre la pyrale du maïs. Des recherches ont également révélé qu'il peut former une relation endophytique avec le maïs, ce qui offre des perspectives intéressantes pour la gestion intégrée des ravageurs (**Wagner et Lewis, 2000**).

Beauveria bassiana est largement utilisé dans le monde entier comme agent microbien pour lutter contre certaines espèces d'insectes, en raison notamment de sa facilité de production à grande échelle et de son innocuité pour les vertébrés (**Boucias et al., 1998**). Différentes préparations de *B. bassiana* ont été appliquées dans divers secteurs, tels que la protection de la santé humaine et des végétaux en agriculture et en foresterie. Des recherches ont démontré l'efficacité de ce champignon contre les insectes nuisibles de plusieurs ordres, notamment les lépidoptères, les hémiptères, les coléoptères, les homoptères, les isoptères et les diptères.

Dans le secteur de la santé humaine, diverses études ont démontré l'efficacité insecticide de certains isolats de cette souche en milieu aquatique pour contrôler les populations de moustiques vecteurs de microorganismes pathogènes. Par exemple, les recherches de Clark et d'autres en 1968 ont mis en évidence la vulnérabilité des larves de moustiques *Culex tarsalis* L. à certains isolats de *B. bassiana*, qui sont des vecteurs de certains arbovirus en Amérique du Nord. De plus, d'autres études ont examiné l'impact de ces isolats sur d'autres espèces de moustiques vecteurs de maladies telles que la fièvre jaune, la dengue et la leishmaniose viscérale.

En agriculture, des préparations à base de *B. bassiana* sont utilisées comme antifongiques depuis 1965, notamment pour contrôler les populations de lépidoptères et d'hyménoptères ravageurs affectant diverses cultures. Des essais ont montré l'efficacité de ce champignon contre des ravageurs tels que le carpocapse de la pomme, le papillon nocturne du tubercule de pommes de terre, la punaise du blé, la punaise terne et d'autres ravageurs de cultures maraîchères et fruitières.

Dans le secteur forestier, certains isolats de *B. bassiana* sont étudiés comme agents de lutte biologique contre des populations d'insectes ravageurs, notamment des coléoptères, tels

que le scieur du pin japonais, l'agrile du frêne, le charançon du pin blanc, le scolyte birayé, le longicorne brun de l'épinette et l'ips typographe, qui causent d'importants dommages aux peuplements forestiers (Srei, 2011).

2.5. Les métabolites produits par *Beauveria bassiana*

De nombreux champignons synthétisent des métabolites secondaires qui agissent sur d'autres organismes, pouvant entraîner une inhibition de la croissance, des maladies, voire la mort. Certains champignons entomopathogènes produisent des métabolites qui peuvent affecter d'autres microorganismes et insectes. Par exemple, *Beauveria bassiana* produit une variété de métabolites secondaires chimiquement diversifiés, ce qui le distingue comme un champignon entomopathogène de premier ordre. Parmi ces métabolites, on trouve la beauvericine, la bassianolide, la bassianine, la tenelline et la cyclosporine A, qui constituent les principaux métabolites secondaires produits par cette espèce (Figure 06) (Liu *et al.*, 2016).

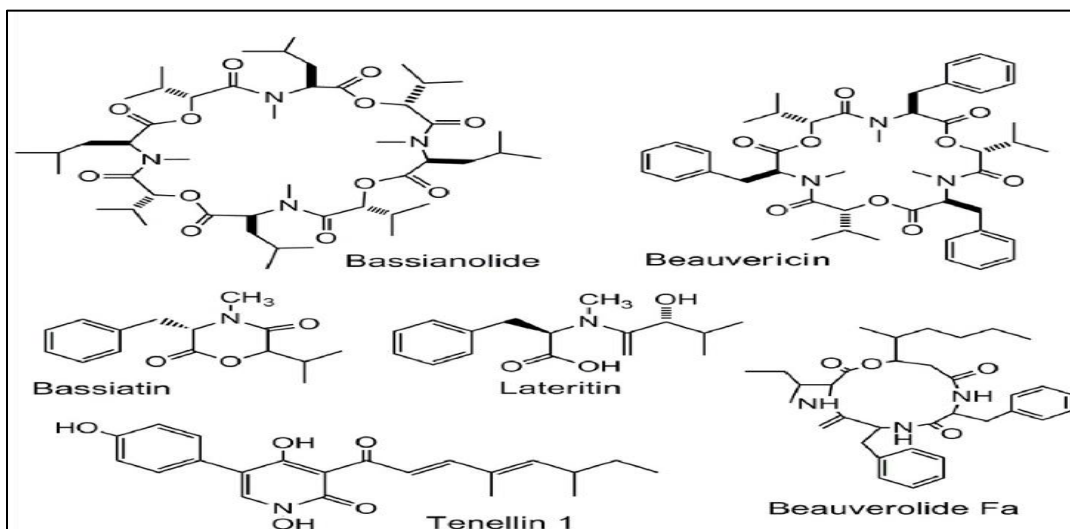


Figure 06 : Les métabolites produits par *Beauveria bassiana* (Liu *et al.*, 2016).

CHAPITRE 03 : LES MYCOTOXINES PRODUITES PAR *BEAUVERIA BASSIANA*

3.1. Définition des mycotoxines

Le terme "Mycotoxine" est dérivé de "Mycos" en grec ancien, qui signifie champignon, et de "Toxicum" en latin, qui signifie poison. Il a été introduit en 1962 à la suite d'une crise vétérinaire inhabituelle près de Londres, en Angleterre, où environ 100 000 dindonneaux sont décédés. Cette crise a été liée à une maladie mystérieuse appelée "maladie X de la dinde", causée par la consommation d'arachides contaminées par des métabolites secondaires d'*Aspergillus flavus*, connus sous le nom d'aflatoxines. Cet événement a attiré l'attention des scientifiques sur la possibilité que d'autres métabolites fongiques puissent être potentiellement mortels. Par conséquent, la catégorie des mycotoxines a été élargie pour inclure diverses toxines fongiques déjà identifiées, telles que les alcaloïdes de l'ergot de seigle, ainsi que certains composés initialement isolés comme des antibiotiques, comme la patuline. De plus, de nouveaux métabolites secondaires ont été découverts grâce à des analyses ciblées (Hela, 2020).

D'une façon générale les mycotoxines sont des composés organiques toxiques produits par certains champignons. Leur présence dans l'environnement peut avoir des conséquences néfastes sur la santé des humains, des animaux et des plantes. Ces toxines sont caractérisées par leur faible poids moléculaire, généralement inférieur à 1000 Da, et sont considérées comme des métabolites secondaires sécrétés par les champignons. Toutes les substances toxiques produites par les champignons ne sont pas automatiquement classées comme des mycotoxines. En effet, la dénomination de mycotoxine est réservée aux composés toxiques de faible poids moléculaire, généralement compris entre 200 et 500 Da, et qui appartiennent à diverses familles chimiques (Bravin, 2008 ; Al khouy *et al.*, 2019).

Certaines espèces de champignons entomopathogènes ont la capacité de produire des mycotoxines, considérées souvent comme des armes chimiques soit pour la défense des micro-organismes soit pour attaquer leur hôte. Ces toxines sont de deux types : les endotoxines, produites à l'intérieur de la cellule, et les exotoxines, sécrétées dans le milieu de culture par les cellules au cours de leur phase active de croissance (Burges et Hussey, 1971). Parmi les mycotoxines les plus courantes, on retrouve les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone (Tabuc, 2007).

3.2. Les principales mycotoxines produite par *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana est reconnu pour sa capacité à produire une variété de métabolites secondaires chimiquement diversifiés, ce qui en fait un champignon entomopathogène de premier plan, Parmi les métabolites les plus connus on peut citer la beauvéricine, le plus étudié , ainsi que d'autres composés comme : Bassianolide et les beauveriolidés (Al khouy *et al.*, 2019).

❖ Beauvéricine

C'est le composé le plus crucial découvert pour la première fois chez *Beauveria bassiana*. Il s'agit d'un hexadepsipeptide cyclique toxique qui contient une séquence répétitive de trois molécules de N-méthylphénylalanine alternant avec trois molécules d'acide 2-hydroxyisovalérique. Il est important de noter que tous les isolats de *B. bassiana* ne produisent pas de beauvéricine *in vitro* (Zimmermann, 2007).

La beauvéricine présente un large éventail d'activités biologiques bénéfiques, tel que son potentiel insecticide et acaricide contre divers ravageurs agricoles (Al khouy *et al.*, 2019). Il a été identifiée comme ayant une toxicité extrêmement élevée contre diverses lignées de cellules cancéreuses. Cela est dû à sa capacité à générer des complexes de sodium (Na⁺) et de potassium (K⁺), ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité des membranes naturelles et artificielles. Bien que leur toxicité a été principalement étudiée chez les insectes, des études récentes ont démontré une toxicité *in vitro* significative envers les lignées cellulaires murines et humaines (Strasser *et al.*, 2000).

❖ Bassianolide

Le bassianolide, extrait des mycéliums cultivés de *Beauveria bassiana*, est un cyclotétradepsipeptide, similaire à la beauvéricine en tant qu'antibiotique ionophore, mais avec une réaction distincte. Il montre une activité pathogène contre les insectes et provoque des symptômes atoniques chez les larves de vers à soie. C'est ainsi qu'il est reconnu comme un facteur de virulence crucial pour *Beauveria bassiana*, et il est envisagé comme un candidat prometteur pour des modifications structurelles à l'avenir (Patocka, 2016).

❖ Beauveriolidés et Beauverolidés

Les espèces de *Beauveria* produisent également des beauveriolidés et des beauverolidés, qui sont des peptides ayant une structure similaire à la beauvéricine et au bassianolide. Leur toxicité pour les animaux et les plantes, ainsi que leur activité insecticide, restent généralement méconnues. Bien que des tests aient été réalisés, les

résultats sont généralement négatifs, à l'exception du Beauvériolide. Dans l'ensemble, ces cyclodepsipeptides pourraient avoir des effets significatifs qui n'ont pas encore été documentés (**Strasser et al., 2000**).

3.3. La toxicité des métabolites de *Beauveria bassiana*

Les produits de métabolisme produits par *Beauveria bassiana* présentent des degrés variés de toxicité. Certains peuvent être des facteurs extracellulaires facilitant l'infection fongique, d'autres peuvent être des molécules produites de façon cryptique. Cependant, la majorité des métabolites produits par *Beauveria bassiana* est composée de peptides non ribosomiques et de polypeptides. Bien que leur fonction en ce qui concerne la virulence et leurs mécanismes d'action exacts soient inconnus, la plupart de ces molécules peuvent être liées à la faculté d'infection du champignon (**Pedrini, 2022**). Les toxines ont divers effets biologiques sur les insectes, les extraits mycéliens de l'espèce ont démontré une toxicité chez les larves et les pupes, suggérant qu'ils pourraient constituer une alternative aux insecticides chimiques pour le contrôle des larves de moustiques (**Vivekanandhan et al., 2018**).

3.4. Les facteurs influençant sur la production des mycotoxines

La libération des métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments est conditionnée par plusieurs variables. Ces variables peuvent être de nature physique, chimique ou biologique.

3.4.1. Facteurs Physiques

Les conditions environnementales telles que la température, l'humidité et le pH peuvent influencer la production de mycotoxines. Par exemple, des températures optimales et une humidité adéquate peuvent favoriser la croissance fongique et la production de mycotoxines.

3.4.2. Facteurs Chimiques

Certains composés chimiques présents dans l'environnement ex : CO₂, O₂... peuvent également affecter la production de mycotoxines. Cela pourrait inclure des substrats de croissance, des nutriments ou des produits chimiques présents dans le sol ou dans les cultures hôtes.

3.4.3. Facteurs Biologiques

Outre les facteurs physiques et chimiques, des interactions biologiques avec d'autres micro-organismes ou organismes hôtes peuvent également influencer la production

des mycotoxines. Ces interactions peuvent être compétitives ou symbiotiques, affectant ainsi la quantité et la composition des métabolites produits (Al Khouy *et al.*, 2019).

3.5. Les méthodes de détection et de dosage des mycotoxines

Il existe deux méthodes couramment utilisées : les techniques de criblage rapide, telles que les tests immunologiques (ELISA) et la chromatographie sur couche mince (CCM), ainsi que les techniques quantitatives telles que la chromatographie liquide ou gazeuse (HPLC et GPC). Ces dernières reposent principalement sur la séparation chromatographique des molécules, suivie de leur détection par fluorimétrie ou spectrométrie. Avant l'application de ces techniques, une extraction des mycotoxines est généralement réalisée, suivie parfois d'une purification visant à éliminer les interférences et à améliorer la précision de la mesure des mycotoxines (Tabuc, 2007 ; Houissa, 2020).

3.5.1. Chromatographie sur couche mince

Les mycotoxines peuvent être détectées de manière qualitative et semi-quantitative grâce à la chromatographie sur couche mince. Cette méthode est abordable, simple à utiliser et offre la possibilité de contrôler rapidement et simultanément plusieurs échantillons. Toutefois, sa sensibilité est faible et ses résultats sont moins précis par rapport aux techniques chromatographiques liquides et gazeuses. Différentes études ont été menées pour détecter les mycotoxines dans les céréales en utilisant la méthode CCM (Figure 07) (Houissa, 2020).

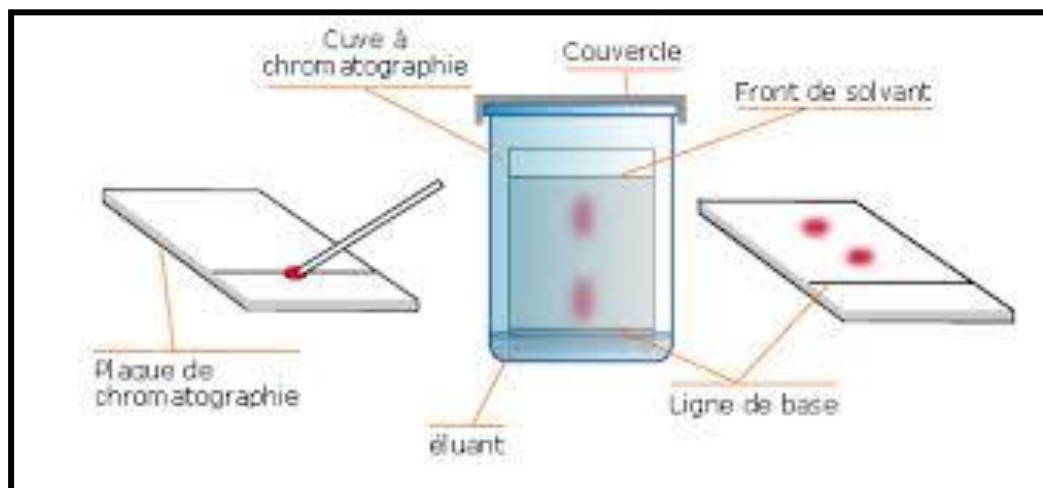


Figure 07 : Schéma de Chromatographie sur couche mince

(<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTSgoXE74mAcyg0-x0qDNS9KtbxE0ctj9-wrg&s>).

3.5.2. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

C'est une technique immunochimique couramment employée pour détecter les mycotoxines. Cette approche repose sur les interactions anticorps-antigènes que les mycotoxines représentent (Figure 08). Il est important de souligner que l'ELISA est une méthode rapide, pratique et abordable en termes de temps, mais elle présente un manque de précision, en particulier pour les concentrations très basses. Effectivement, en dehors de certaines concentrations, il est nécessaire de confirmer l'ELISA par chromatographie. De plus, il existe souvent un risque élevé d'interférence de la matrice ou des mycotoxines structurellement similaires dans la réaction antigène-anticorps. De plus, l'ELISA peut générer des résultats incorrects en générant des positifs incorrects. De plus, les contraintes de détection sont fréquemment élevées (Houissa, 2020).

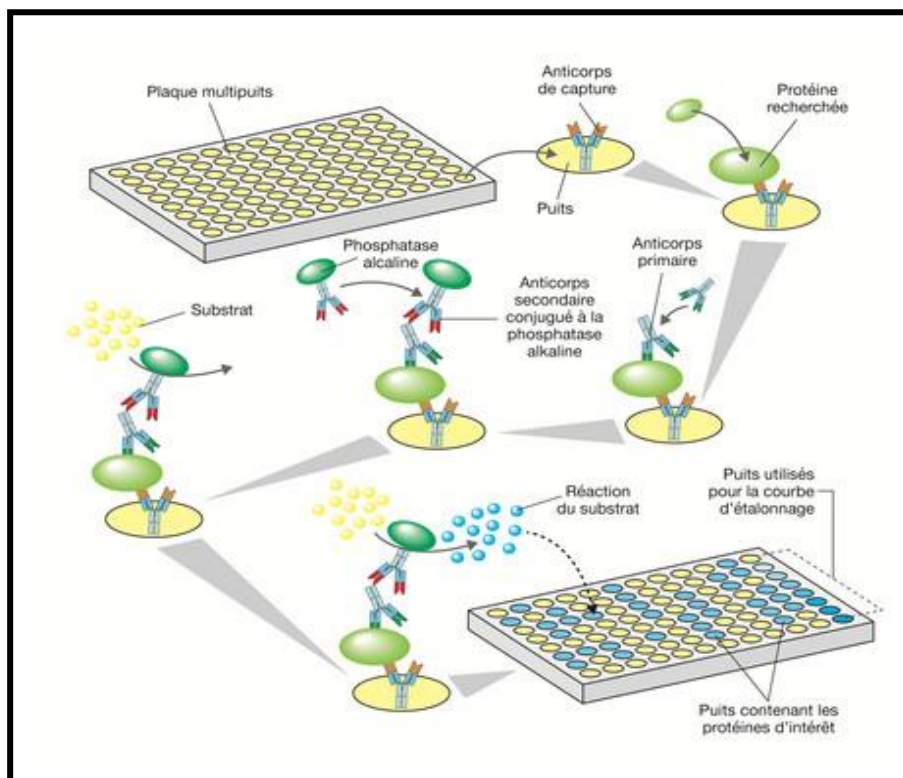


Figure 08 : Schématisation de la méthode ELISA

(<https://monde.ccdmd.qc.ca/media/image1024/119562.jpg>)

3.5.3. Les méthodes de séparations et de quantification

➤ Chromatographie phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la méthode la plus couramment utilisée pour la détermination quantitative simultanée des mycotoxines, notamment des

trichothécènes, dans les céréales et leurs dérivés, était la chromatographie en phase gazeuse couplée à des détecteurs à ionisation de flamme (FID), à l'électro capture (ECD) et à la spectrométrie de masse (MS). En effet, CPG est particulièrement adaptée à l'analyse des composés volatils. Compte tenu du fait que la majorité des mycotoxines ne sont pas volatiles, la dérivation est une étape essentielle avant d'effectuer les analyses par chromatographie en phase gazeuse.

➤ **Chromatographie liquide sous haute pression**

La technique de référence la plus couramment utilisée est la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) associée aux détecteurs à ultraviolet (UV), à barrette diode (PDA) ou à fluorescence (FD). En utilisant la fluorimétrie en combinaison, elle peut atteindre des limites de détection très basses (environ 10 ng/kg). Cette méthode, s'il est associé à une purification préalable par chromatographie d'immunoaffinité, est reconnue par les normes internationales.

➤ **Autres méthodes**

En plus des méthodes traditionnelles de chromatographie, une technique prometteuse de haute performance suscite un intérêt grandissant pour détecter et quantifier les mycotoxines et d'autres analytes. Cette technique est la chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse (LCMS) et, en particulier, la LCMS/MS. La LCMS/MS, grâce à sa grande sensibilité et sa sélectivité, permet de détecter et de quantifier simultanément plusieurs analytes, voire même des analytes et des composés très peu étudiés par les méthodes traditionnelles, comme les dérivées de mycotoxines et d'autres composés fongiques et bactériens. De plus, cette technique se distingue par sa simplicité de préparation des échantillons et ses limites de détection souvent très faibles (**Houissa, 2020**).

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGENE *BEAUVERIA BASSIANA*

1.1. Echantonnage

Le prélèvement a été effectué à partir d'un sol céréalière de la région d'El Khroub (station d'El Baaraouia) durant le mois de février 2024. Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol, une quantité de 20 grammes est prélevée puis déposée dans un flacon stérile. **Pochon et Tradieux (1962)**. Les échantillons ont été ensuite transportés au Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne.

1.2. Préparation du milieu d'isolement

Le milieu de culture utilisé est le PDA (pomme de terre dextrose agar) (Annexe), généralement recommandé pour la culture du *Beauveria bassiana*. Il est additionné d'un antibiotique (Augmentin) pour inhiber la croissance des bactéries et d'un fongicide (Dodine), qui inhibe la croissance des dermatophytes en permettant ainsi le développement exclusif des champignons entomopathogène qui présentent une résistance à ce produit.

1.3. Isolement de la flore fongique

Pour préparer la suspension mère, 1g de l'échantillon (sol) a été dilué dans 9 ml d'eau distillée stérile. Ensuite, une série de dilutions a été réalisée jusqu'à 10^4 , précédée à chaque fois par une agitation. Après agitation par vortex, 0.1 ml de chaque dilution a été ensemencé par étalement sur la surface des boîtes déjà coulées avec le milieu PDA. Les boîtes ont été incubées à 28-30°C pendant 15 à 20 jours (Figure 09) (**Benserradj, 2014**).

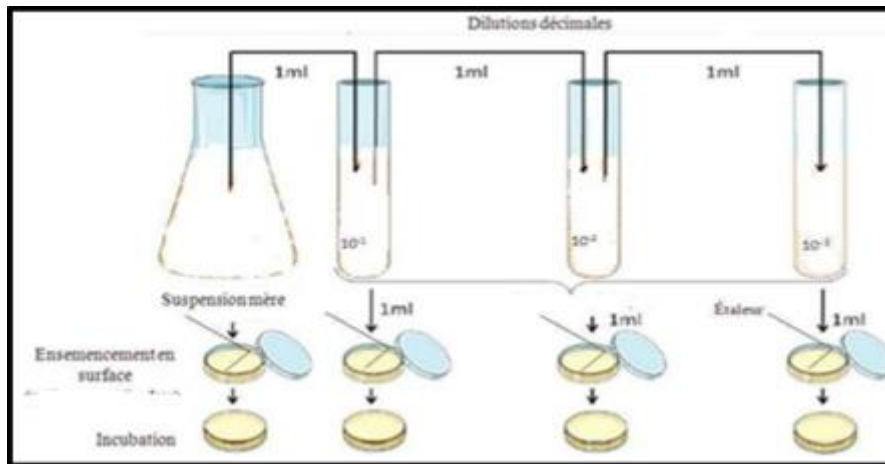


Figure 09 : Schéma explicative de la méthode d'isolement (https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSBUvuaGK8EoFZPt_gSkds14TT2615u_n7wE1NTXFpccw&w&s)

1.4. Purification de souches isolées

Les colonies obtenues après isolement, ont été transférées sur des nouvelles boîtes contenant le milieu PDA, connu pour fournir des conditions favorables à la croissance rapide des champignons et à la libération de spores (**Botton *et al.*, 1990**). Le repiquage a été réalisé dans le centre de la boîte de Pétri, à l'aide d'une anse de platine afin d'obtenir des isolats purs. Ces isolats sont ensuite incubés à nouveau pour assurer leur pureté. L'incubation est réalisée à une température 30C°, pendant 4 à 6 jours. En cas de contamination par une autre souche fongique, la purification peut nécessiter plusieurs repiquages.

1.5. Identification morphologique

L'identification morphologique des micro-organismes repose sur l'observation visuelle de leur caractéristique structurale : aspect des colonies, de leur revers (Identification macroscopique) et leur développement en colonies distinctes : aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,... (Identification microscopique) (**Tabuc, 2007**).

1.5.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique des champignons consiste à observer l'échantillon à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe pour en déterminer les caractéristiques suivantes (**Tabuc, 2007**) :

- L'aspect des colonies (duveteuses, cotonneuses, poudreuses ou granuleuses).
- Le relief des colonies (molle, friable, élastique ou dure).
- La taille des colonies (petites colonies, étendues, envahissantes).

- La couleur des colonies (blanc, le crème, le jaune...).
- Présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium.

1.5.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons implique l'analyse à l'aide d'un microscope des caractéristiques telles que :

- Le thalle (siphonné ou septé).
- Les spores (endogènes ou exogènes).
- Mode de groupement des conidies (grappes, masse, chaînes basipètes...).

Ces détails sont cruciaux pour différencier précisément les espèces de champignons. Pour ce faire, un fragment de la colonie est prélevé avec une anse de palatin stérile, déposé sur une lame colorée au bleu de méthylène, puis recouvert d'une lamelle et observé au microscope optique à divers grossissements.

2. ETUDES MYCOTOXICOLOGIQUE

2.1. Production des mycotoxines sur milieu de fermentation

La production des mycotoxines dans les milieux de fermentation est un sujet d'intérêt croissant dans le domaine de la sécurité alimentaire et de la microbiologie industrielle.

2.1.1. Préparation du milieu de fermentation

Le milieu qui favorise la production des mycotoxines élaboré par *Beauveria bassiana* est bien le PDB (Annexe). Pour cela, il est recommandé d'utiliser des erlenmeyers de 200 ml. Ensuite, il convient de stériliser les erlenmeyers pour débiter la fermentation.

2.1.2. Ensemencement du milieu de fermentation

La production des métabolites secondaires a été effectuée selon le protocole de **(Dennis et Webster, 1971)**. Chaque erlenmeyer contient un volume de milieu de fermentation inoculé par des carrés de gélose (PDA) contenant du mycélium de *Beauveria bassiana*. Le premier erlenmeyer contient 100 ml avec 8 disques de culture de *Beauveria*, tandis que le deuxième en contient 50 ml avec 4 disques. L'incubation doit être réalisée à 28°C sous agitation (Figure 10) pendant une période de 15 jours.



Figure 10 : Incubateur-agitateur

2.2. Extraction des mycotoxines à partir du milieu de fermentation

Après 15 jours de fermentation, le contenu des deux erlenmeyers a été filtré à travers du papier wattman N°1. Le filtrat obtenu a été récupéré et mélangé avec une quantité équivalente de chloroforme pour l'extraction des métabolites secondaires. Ce mélange a été ensuite transféré dans une ampoule à décantation (Figure 11) afin de séparer les phases aqueuse et organique, récupérant ainsi uniquement la dernière, qui contient les métabolites secondaires tels que la beauvericine et d'autres composés. Ensuite, le mélange organique a été évaporé à l'aide d'un ROTAVAP (Figure 11) sous vide à 40°C. La phase chloroforme a été évaporée jusqu'à ce qu'elle forme une couche sèche. Ensuite, ce résidu est récupéré en utilisant à nouveau du méthanol. Les extraits ainsi obtenus sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation pour la chromatographie sur couche mince.

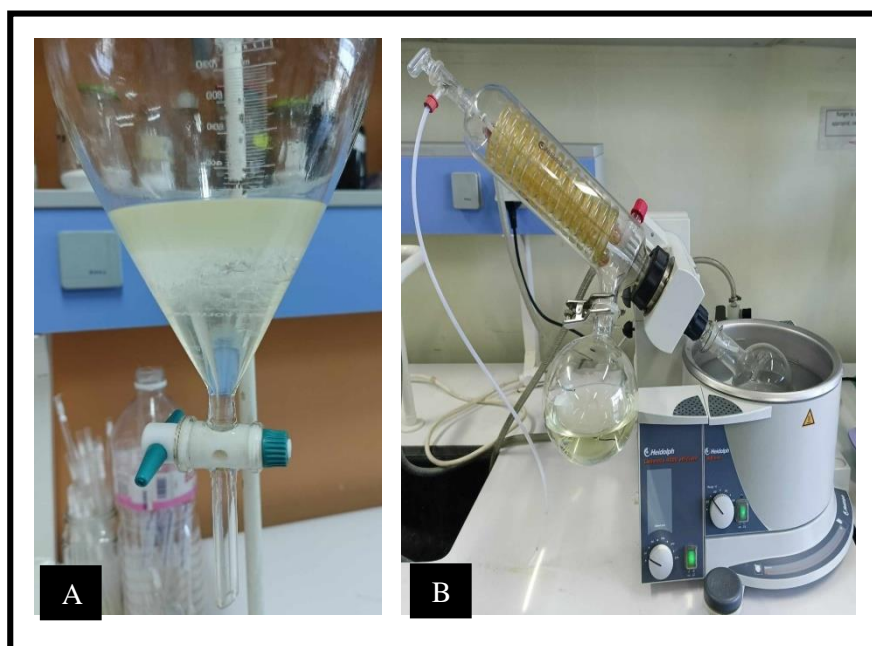


Figure 11 : Étapes d'extraction des métabolites secondaires par ampoule à décantation (A) et rotavapor (B).

2.3. Détection des mycotoxines par chromatographe sur couche mince

Pour mettre en évidence les métabolites présents dans l'extrait, la séparation a été réalisée par chromatographie sur couche mince en utilisant un système éluant constitué de chloroforme et de méthanol dans un rapport volumique de 9/1. La séparation a été réalisée sur des plaques de gel de silice préalablement préparées sur lesquelles 40 µl de l'extrait concentré ont été déposés. La plaque a ensuite été introduite dans une cuve contenant le solvant et après migration et évaporation du produit, cette dernière a été examinée sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence de mycotoxines est démontrée par la détection d'une fluorescence caractéristique (**Vivekanandhan *et al.*, 2018**).

RÉSULTATS ET
DISCUSSION

Le but de cette étude est basé sur l'isolement à partir du sol pour identifier un champignon entomopathogène, *Beauveria bassiana*, et évaluer sa capacité à produire des mycotoxines. Les mycotoxines sont ensuite identifiées en suivant la technique de séparation par chromatographie sur couche mince.

1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON ENTOPATHOGENE *BEAUVERIA BASSIANA*

1.1. Isolement

Dans des conditions totalement aseptiques, l'isolement a été réalisé à partir du sol, suivi d'une série de dilutions (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4) (Benserradj, 2014), utilisées pour ensemencher des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Après 16 jours d'incubation à 30°C , l'observation a révélé la présence de 2 petites colonies blanches dans la boîte correspondant à la dilution 10^2 . Une observation préliminaire au microscope, en utilisant la technique du scotch, confirme qu'il s'agit de *Beauveria bassiana*. Un repiquage est ensuite réalisé dans de nouvelles boîtes afin de procéder à la purification.

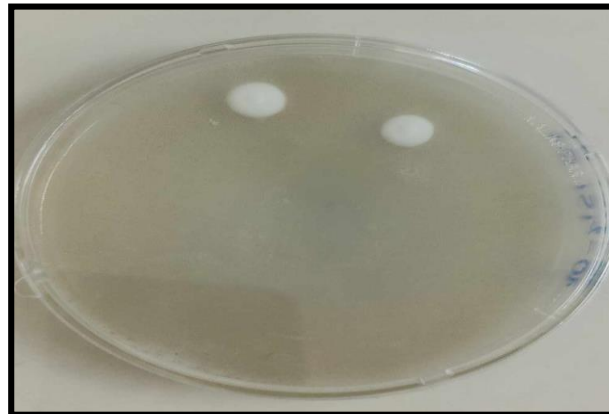


Figure 12 : Développement de Colonies de *Beauveria bassiana* après 16 Jours sur Milieu PDA, Suite à la Dilution 10^2

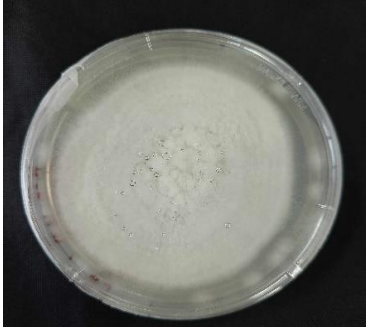



1.2. Identification

La caractérisation du *Beauveria Bassiana* repose sur les traits culturels et la morphologie, ainsi que sur des caractéristiques biochimiques. Cela demande un environnement propice à la croissance, notamment le milieu PDA pour le *Beauveria*. L'identification est fondée sur l'observation à la fois macroscopique et microscopique (Botton *et al.*, 1990 ; Ziani, 2008).

1.2.1. Étude macroscopique

Après 15 jours d'incubation à 28°C, les boîtes purifiées sur milieu PDA sont bien adaptées pour l'observation macroscopique. Le tableau 04 récapitule les caractéristiques microscopiques de *Beauveria bassiana*.

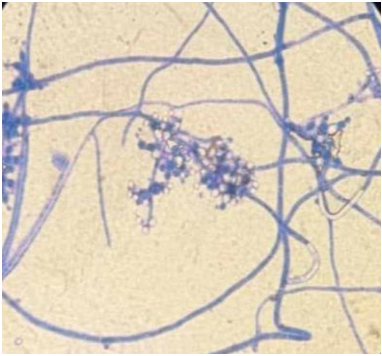
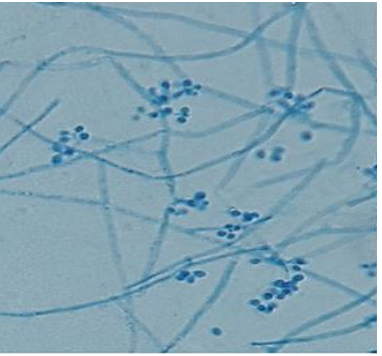
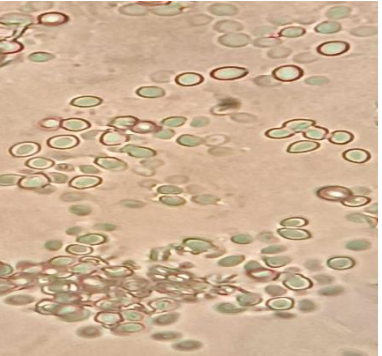

Tableau 04 : Caractères macroscopique de *Beauveria bassiana*

Observation Macroscopique	Caractères macroscopique	Références
<p>Recto :</p> 	<p>Couleur de colonie : blanchâtre à jaunâtre</p> <p>Aspect : colonies cotonneuses</p>	 <p>https://asset.kompas.com/crops/bjkqBapKB72DlCLV49Hv_xKjdZI=/100x37:400x338/340x340/data/photo/2023/06/27/649a9233ab616.jpg</p>
<p>Verso :</p> 	<p>Pas de pigment</p>	 <p>https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRDhoS6bsz51xfluZbQCaHeX_PWMyLbRbfIRT2Fit8I7Q&s</p>

1.2.2. Etude microscopique

L'identification microscopique implique l'observation au microscope optique de structures caractéristiques telles que les hyphes, les conidies et les spores. Ces éléments sont décrits en détail dans le tableau 05.

Tableau 05 : Caractères microscopiques de *Beauveria bassiana*

Observation microscopique	Caractères microscopiques	Références
	<ul style="list-style-type: none"> • Filaments mycéliens transparent fins et septaux • Cellules conidiogènes <p>Partie basale : courte, renflée, dilatée en ampoule</p> <p>Partie terminale : en zigzag</p>	 <p>https://assets.cureus.com/uploads/figure/file/219069/article_river_caac0da0b98e11ebbae9cd8950562b94-fig-1.png</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Spores : <ul style="list-style-type: none"> ○ Unicellulaires ○ Lisses ○ Globuleuses ○ Regroupement en grappes 	 <p>https://www.researchgate.net/figure/Spores-of-Beauveria-bassiana-on-conidiophores-photo-Sarah-Thomas-CABI_fig20_332223230</p>

D'après les travaux de Halouane en 1997 (**Halouane, 2008**), cette espèce génère des conidies courbées, de couleur blanche à jaunâtre. Les conidies ou spores sont portées par de longs filaments en zigzag, constitués d'hyphes transparents et septés, avec un diamètre variant de 2,5 à 25 μm . De plus, elle produit des conidiospores de forme sphérique, avec un diamètre compris entre 1 et 4 μm (**Ziani, 2008**). Par ailleurs, les résultats de notre étude concordent avec ceux des travaux précédents (**Benzina et al., 2018**) (Figure 13).

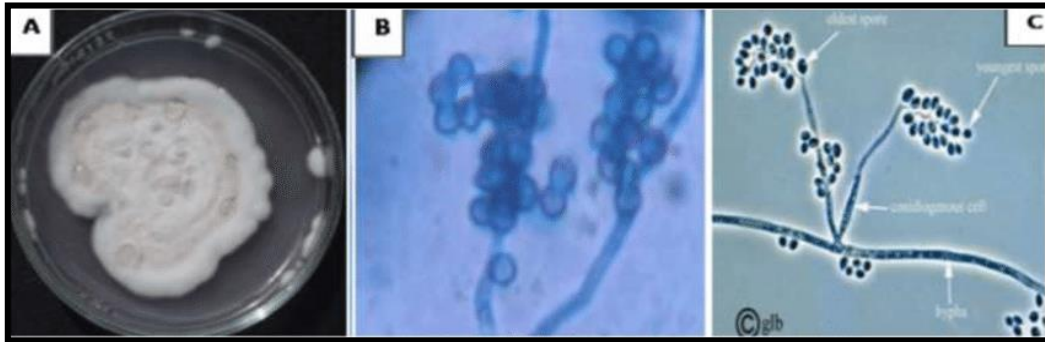


Figure 13 : Caractères macroscopiques (A) et microscopiques (B) de *Beauveria bassiana* (C) Schéma représentatif du genre *Beauveria* (Benzina *et al.*, 2018).

2. ETUDE MYCOTOXICOLOGIQUE

2.1. Extraction des mycotoxines élaborés par *Beauveria bassiana*

Après l'inoculation de *Beauveria bassiana*, des cultures en Erlenmeyer ont été développées et incubées à 28°C pendant 15 jours. Au cours de cette période, des observations ont révélé l'apparition de turbidité ainsi que la formation de mycélium se regroupant en amas de couleur blanc-jaunâtre. La croissance initiale a été constatée dès le huitième jour. La forme de ces structures fongiques est représentée dans la figure 14.



Figure 14 : Développement morphologique de *Beauveria bassiana* sur milieu de fermentation (PDB)

La fermentation liquide offre des avantages économiques en termes de mise à l'échelle pour la production de propagules fongiques alternatives dans des conditions nutritionnelles et environnementales contrôlées. Cela est dû à sa courte période de fermentation, généralement quelques jours seulement, à la facilité de récupération du produit, à l'automatisation du processus et à la disponibilité de composants de milieux de culture peu coûteux. Elle est également considérée comme la méthode la plus rentable pour produire des agents de lutte biologique (Mascardin *et al.*, 2015).

Le PDB était le milieu de culture le plus approprié pour induire la production de blastospores. La croissance fongique et la production de spores ont été influencées par les composants nutritifs présents dans le milieu, principalement le carbone et l'azote. *Beauveria bassiana* n'a pas besoin de sources complexes de carbone ou d'azote, puisque le champignon peut être bien cultivé sur un milieu contenant des composés carbonés simples tels que le saccharose ou le glucose, de l'azote et des composants minéraux (Roswanjaya *et al.*, 2022).

Après les 15 jours de fermentation, nous avons procédé à l'extraction des métabolites secondaires à l'aide d'un solvant organique (chloroforme) pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase organique ainsi obtenue est récupérée et concentrée sous pression à l'aide d'un ROTAVAP à 40°C afin d'éliminer le solvant volatil. L'extrait obtenu est illustré dans (Figure 15).



Figure 15 : Extrait brute de *Beauveria bassiana*.

2.2. Analyse des mycotoxines par Chromatographie sur couche mince

Pour une meilleure séparation chromatographique des différents composés éventuellement présents dans l'extrait de *Beauveria bassiana*, il faut utiliser le système d'éluant Chloroforme/méthanol (90/10 ; V/V). La plaque CCM a été disposée en position verticale dans la cuve, avec le front de la phase mobile située à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque. Ensuite, la plaque a été retirée et séchée à l'air libre, puis placée sous une lampe à ultraviolet (365 nm) pour élucider les composés chimiques (mycotoxines) invisibles à l'œil nu, les différentes taches correspondant aux constituants du mélange. Par la suite, la position du front doit être dessinée au crayon. La détection a

été effectuée sous l'effet du rayon ultraviolet et le rapport frontal a été calculé en utilisant la formule ci-dessous :

$$Rf = \frac{\text{La distance par courue par le substrat (h)}}{\text{La distance par courue par le solvant (H)}}$$

Une fois que l'échantillon est déposé sur le support, les composés se déplacent principalement par capillarité. Les forces électrostatiques qui retiennent le composant sur la phase stationnaire ainsi que sa solubilité dans la phase mobile influencent sa vitesse de déplacement. Les composés passent alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. En chromatographie sur couche mince (CCM), les composés de faible polarité ont tendance à se déplacer plus rapidement que les composés polaires (Vivekananda *et al.*, 2018).

D'après l'analyse chromatographique sous lampe UV (365 nm), la migration semble satisfaisante, avec une séparation appropriée des molécules, confirmant ainsi la présence de métabolites secondaires dans l'extrait de la souche *Beauveria bassiana* (Figure 16).

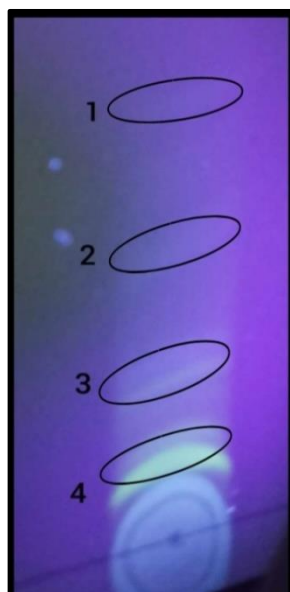


Figure 16 : Résultat de la CCM de l'extrait de *Beauveria bassiana* observés sous lumière UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) développées dans le système solvant (chloroforme/Méthanol 9/1 ; V/V).

Ces métabolites sont identifiés en calculant les rapports frontaux de chaque tache, puis en les comparant avec d'autres recherches. Cette comparaison permettra de déterminer avec précision la présence des mycotoxines dans l'échantillon. Le tableau 06 récapitule tous les résultats obtenus.

Tableau 06 : Le calcul des résultats des rapports frontaux de l'extrait du *Beauveria bassiana* Sur plaque CCM.

Les spots	H	Rapport frontal
1	10,2	Rf 1 = 10,2/13=0,78
2	9,2	Rf 2 = 9,2/13= 0,7
3	8	Rf 3 = 8/13 =0,61
4	7,2	Rf 4 = 7,2/13 = 0,55

H = 13 (la distance par courue par le solvant)

Les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince (CCM), après la séparation des molécules biologiques par le système de solvant (chloroforme/méthanol), montrent quatre types de mycotoxines avec des rapports frontaux de 0,78 ; 0,7 ; 0,61 ; 0,55. L'une de ces valeurs (0,55) est similaire à celle obtenue par (**Vivekanandhan et al., 2018**), qui ont trouvé des Rf de 0,33 ; 0,44 ; 0,55 en utilisant le même système. Une certaine similitude a également été observée avec les résultats de (**Berestetskiy et al., 2018**), qui ont trouvé des Rf de 0,22 ; 0,3 ; 0,45 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7, Ils ont conclu qu'il s'agissait de mycotoxines produites par *Beauveria bassiana* (beauvéicine, oosporeine, bassianine et tennéline), bien qu'ils aient utilisé des systèmes de solvants différents (chlorure de méthylène/méthanol et hexane/acétate d'éthyle). Les résultats ont montré une légère différence dans les valeurs de Rf par rapport aux études précédentes en raison des différents systèmes de solvants utilisés. Cette variation peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la quantité de matériau déposé, la température, le type de solvant et la nature chimique de l'adsorbant. La température, l'équilibre entre les phases liquide et vapeur dans le réservoir, ainsi que les impuretés présentes dans l'échantillon, sont des éléments clés influençant les valeurs élevées de Rf (**Al-Ani et Mohammed, 2020**).

CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

Dans cette étude, notre objectif était d'isoler et de purifier des souches fongiques entomopathogènes du genre *Beauveria* à partir d'échantillons provenant de sols agricoles céréaliers, et d'extraire et de caractériser les mycotoxines de ces souches grâce à la technique de chromatographie sur couche mince.

Le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Balsamo) est de plus en plus étudié pour son potentiel dans la lutte biologique contre les ravageurs. Il est largement utilisé à l'échelle mondiale comme agent de lutte biologique contre divers insectes et démontre une efficacité remarquable en tant que mycoinsecticide en agriculture, en grande partie grâce à sa capacité à produire diverses mycotoxines telles que la Beauvéricine, la Bassianolide, les Beauveriolides et les Beauverolides, considérées comme des armes chimiques pour la défense des micro-organismes ou pour attaquer leur hôte.

Les résultats de nos expériences sont plutôt positifs et prometteurs. Après la fermentation de notre échantillon de *Beauveria bassiana*, nous avons pu extraire efficacement des mycotoxines. Leur présence a été vérifiée à l'aide de la technique de chromatographie sur couche mince (CCM), mettant en évidence plusieurs composés bioactifs. Ces résultats soulignent le potentiel significatif de *bassiana* en tant que source prometteuse de mycotoxines pour la lutte biologique contre les ravageurs agricoles. Cependant, il est important de noter que cette étude ne constitue qu'une première étape dans l'exploration de ce potentiel. Pour aller plus loin, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées afin d'optimiser l'utilisation de ces mycotoxines dans des applications pratiques et durables :

- Optimisation des méthodes d'extraction pour améliorer le rendement et la qualité des mycotoxines.
- Approfondissement des études écotoxicologiques pour garantir la sécurité environnementale des mycotoxines.
- Tester la toxicité des mycotoxines dans des tests antifongiques sur d'autres souches pour évaluer leur efficacité potentielle contre une gamme plus large de pathogènes.
- Amélioration des souches de *Beauveria bassiana* par sélection et amélioration génétique afin d'augmenter la production de mycotoxines.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Al Khoury C., Guillot J. et Nemer N. (2019).** Activité létale de la beauvéricine, une mycotoxine de *Beauveria bassiana*, contre les deux-tétranyques tachetés, *Tetranychus urticae* Koch. *Journal d'entomologie appliquée*, 143(9), p : 974-983.
- **Amobonye A., Bhagwat P., Pandey A., Singh S., & Pillai S. (2020).** Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), p : 1019–1034.
- **Badaoui M. I. (2018).** Contribution à l'étude de la dynamique des populations de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera ; Gelechiidae) et essais de contrôle biologique sur la culture de tomate. Thèse de doctorat : Agronomie. Mostaganem. Université abdelhamid ibn badis de mostaganem, 200 p.
- **Bassi A. (1835).** Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge I bachi da seta. Lodi : Tipografia Orcesi [English translation by P.J. Yarrow: 1958. On the mark disease, calcinaccio or muscardine, a disease that affects silk worms. Ainsworth G.C., Yarrow P.J. (editors). APS Phytopathological Classics. P : 1-49.
- **Benmezdad A. (2018).** Introduction à la Mycologie médicale [en ligne]. (page consultée le 01/03/2024). <https://slidetodoc.com/introduction-la-mycologie-mdicale-dr-benmezdad-a-1/>.
- **Benserradj O. (2014).** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. Thèse de Doctorat 3ème cycle en Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques : Département de Microbiologie. Université Frères Mentouri Constantine 1. 208 p.
- **Benzina, F., Hamid, S., Mohand-Kaci, H., Bissaad, F., & Halouane, F. (2018).** Histological changes in the larvae of the domestic mosquito *Culex pipiens* treated with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Scientific Research and Essays*, 13(1), p : 1–10.
- **Berestetskiy, A. O., Ivanova, A. N., Petrova, M. O., Prokof'eva, D. S., Stepanycheva, E. A., Uspanov, A. M., & Lednev, G. R. (2018).** Comparative Analysis of the Biological Activity and Chromatographic Profiles of the

Extracts of *Beauveria bassiana* and *B. pseudobassiana* Cultures Grown on Different Nutrient Substrates. *Microbiology*, 87(2), 200–214.

- **Botton B., Breton A., Fevra M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. and Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Ed. Masson. Paris. p : 41-220.
- **Boucias D.G and Pendland J.C. (1998).** Champignons entomopathogènes : champignons imparfaits. Dans : Principes de pathologie des insectes. Springer. Boston. Massachusetts. P: 321–364.
- **Bravin F. (2008).** Etude du métabolisme et du transport de composés exogènes grâce à l'enrichissement isotopique uniforme au ¹³C. Thèse de doctorat : Sciences de l'ingénieur. École centrale paris : école centrale des arts et manufactures. 282 p.
- **Burges H.D. et Hussey N. W. (1971).** Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press L 11.50. London-New York , 861 p.
- **Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. (2002).** Les moisissures à intérêt médical. Cahier de formation Biologie Médicale. Bioforma. N° 25. France. p : 1-159.
- **Chamley A.K. (1984).** Physiological species of destructive pathogenesis in insects by fungi : Aspeculative review. In Invertebrate-Microbial Interactions. Eds. Anderson J.M., Rayner D.M., Walton D.W.H., British Mycological Society Symposium 6. Cambridge University Press, London. P : 229-270.
- **Dennis C. et Webster J. (1971).** Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, (57), P : 25-39.
- **Ferron P., Fargues J. et Riba G. (1993).** Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. In lutte biologique. Ed. fraval, A. Dossier de la cellule environnement de l'INRA, Paris. France, vol(5), 65-93.
- **Goettel M.S. (1992).** Fungal agents for biocontrol. In : Lomer C.J. and Prior C. (editors). Biological control of locusts and grasshoppers, proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin 29 April-1 May 1991. CAB International (Wallingford) p : 122-132.

- **Halouane F. (2008).** Recherche fondamentale sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota : Hypocreales) : Bioécologie, production et application sur *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Orthoptera, Acrididae). Thèse de doctorat : Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique d'El Harrache, 167 p.
- **Hegedus D.D., Bidcohka M.J., Miranpuri G.G., Khachatourians G.G. (1992).** A comparison of the virulence, stability, and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol (36), p : 785-789.
- **Hela H. (2020).** les mycotoxines du mil : occurrence et flore fongique. Thèse pour obtenir le grade de docteur : En Sciences Biologiques École doctorale GAIA Laboratoire Qualisud. Université de Montpellier, 229p.
- **Houissa H. (2020).** Les mycotoxines du mil : occurrence et flore fongique. Thèse de doctorat : Sciences Biologiques. École doctorale GAIA Laboratoire Qualisud : Université de Montpellier. 259 pages.
- **Humber R.A. (1997).** Fungi: Preservation of cultures. In: Lacey L.A. (editor). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press (London). p: 269-279.
- **Imoulan A., Muzammil H., Paul M.K., El Meziane A., Yaoa Yi. (2017).** Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20 (2017), 1204–1212.
- **Kamp AM et Bidochka MJ. (2002).** Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett.App.Microbiol.* v (35), p: 4-77.
- **Kirk M., Cannon P.F., David J.C. & Staplers J.A. (2001).** P. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi .9111 edition.CAB International, Egham, 655 pages.
- **Liu H., Linan X., Jing W., Qiannan G., Shengnan Y., Pei L., Chengshu W., Min L., Yuquan X. and Liwen Z. (2016).** The Stress-Responsive and Host-Oriented Role of Nonribosomal Peptide Synthetases in an

- Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Biotechnol*, 27(3), p: 439–449.
- **Madelin T. M. (1994)**. Fungal aerosols: A review. *Journal of Aerosol Science*, 25(8), p: 1405–1412.
 - **Mantzoukas spiridon., Kitsiou foteini., Natsiopoulos dimotrios., Eliopoulos lanagiotis a. (2022)**. Entomopathogenic fungi: intraction and applicatioins. *encyclopedia*, vol 2(2), p : 646-656.
 - **Mascarin G.M., Jackson M.A., Kobori N., Behle R.W.and Júnior Í. D. (2015)**. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, v (127), p: 11-20.
 - **McCay A., Quintela E. D. et Faria M. (1990)**. Environnemental Persistance of Entomopathogenic Fungi. In, *New direction in biological control*. R.R. Baker and P.E. Dunn (eds), A.R. Liss, New York. p: 139-159.
 - **Meyling N. V. & Eilenberg J. (2007)**. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), p : 145–155.
 - **Mohan M. C. (2008)**. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology*, vol. (18), no. 10 Dec. 2008, p: 975–989.
 - **Moura M. G. et Jarkovski S.T. (2016)**. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *In World Journal of Microbiology and Biotechnology*. September. *World J Microbiol Biotechnol*.vol. (32), 177p.
 - **Patocka J. (2016)**. Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Patocka: Bioactive Metabolites of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana*, 85(2), p: 80-88.
 - **Pedrini N. (2022)**. The Entomopathogenic Fungus *Beauveria Bassiana* Shows Its Toxic Side within Insects: Expression of Genes Encoding Secondary Metabolites during Pathogenesis. *Journal of Fungi*, 8(5, 7), p: 488.
 - **Rehner R.A. et Buckley E. (2005)**. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), p : 84-98.

- **Roswanjaya y.p., saryanah n.a. and devry l. (2022).** condida production of *beauvaria bassiana* in solide substrat fermentation using a biphasic system. *First Asian PGP Indonesian chapter international e-conference*, p: 653-654.
- **Scholte E. J., Knols, B. G. J., Samson R. A. & Takken W. (2004).** Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4(19), p: 1–24.
- **Senanayake I. C., Rathnayaka A. R., Marasinghe D. S., Calabon M. S., Gentekaki E., Lee H. B., Hurdeal V. G., Pem D., Dissanayake L. S., Wijesinghe S. N., Bundhun D., Nguyen T. T., Goonasekara I. D., Abeywickrama P. D., Bhunjun C. S., Jayawardena R. S., Wanasinghe D. N., Jeewon R., Bhat D. J., Xiang M. M. (2020).** Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere*, 11(1), p: 2678–2754.
- **Shah P. A. & Pell J. K. (2003).** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), p: 413–423.
- **Srei N. (2011).** identification des facteurs permettant d’optimiser la production de *Beauveria bassiana* et les impacts sur la virulence. Mémoire présenté pour l’obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.) : microbiologie appliquée. Université du Qubec INRS -Institut Armand-Frappier., 136 p.
- **Starnes., Robert L., Liu C. L. et Marone P. G. (1993).** History, use and future of microbial insecticides. *American Entomologist*, 39(2), p : 83-91.
- **Strasser H., Vey A. and Butt T. M. (2000).** Are there any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria species*. *Biocontrol Science and Technology*, vol 10(06), p : 717-735.
- **Tabuc C. (2007).** Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat : Pathologie, mycologie, genetique et nutrition. L’institut national polytechnique de toulouse : Universite de bucarest, 190 p.
- **UmaDevi K., Padmavathi J., Uma Maheswara Rao C., Khan A. A. P., & Mohan M. C. (2008).** A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology*, vol. (18), no. 10 Dec. 2008, pp. 975–989.

- **Vivekananda P., Kavitha T., Karthi S., Senthil-Nathan S. & Shivakumar M. (2018).** Toxicity of *Beauveria bassiana*-28 Mycelial Extracts on Larvae of *Culex quinquefasciatus* Mosquito (Diptera: Culicidae). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(3), p: 440.
- **Wagner B. L. & Lewis L. C. (2000).** Colonization of Corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), p : 3468–3473.
- **Wraight R. J. et Roberts D.W. (1987).** Insect control effort with fungi. *Devel. Industr. Microbiol*, v(28) p : 77-87.
- **Ziani J. (2008).** application de *Beauveria bassiana* contre la punaise terne *lygus lineolaris* (palisot de beauvois) (hémiptères: miridés) dans les vignobles. mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie : université du québec à montréal, 88p.
- **Zimmermann G. (2007).** Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(5/6), p: 553-596.

ANNEXE

Annexe

Composition du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (g/l)

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

pH final = 5,6

Composition du milieu PDB (Potato Dextrose Broth) (g/l)

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

pH final = 5,6

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : KOUHIL Rayene
KHEIRI Khouloud
BRIK Roumeissa

**Extraction et pré-caractérisation des mycotoxines du champignon entomopathogène
*Beauveria bassiana***

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé : Les champignons entomopathogènes, avec plus de 700 espèces, jouent un rôle crucial dans la régulation naturelle des populations d'insectes et dans la lutte biologique. Parmi eux, *Beauveria bassiana* est particulièrement notable en raison de sa capacité à produire divers métabolites secondaires, notamment des mycotoxines telles que la beauvéricine. Ce mémoire vise à isoler et identifier les souches de *Beauveria* d'un sol céréalier et à détecter les mycotoxines produites en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM). Pour ce faire, des échantillons de sol ont été prélevés et cultivés sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Les souches isolées ont été incubées puis identifiées par observation microscopique de leurs caractéristiques morphologiques. Elles ont été cultivées dans un milieu de fermentation, et les métabolites secondaires ont été extraits à l'aide de chloroforme. La présence de mycotoxines a été confirmée par CCM, révélant des bandes fluorescentes caractéristiques sous lampe UV à des valeurs Rf de 0,78 ; 0,7 ; 0,61 ; 0,55. En conclusion, l'étude a démontré que *Beauveria bassiana* a la capacité de produire des mycotoxines avec des degrés variés de toxicité, et les méthodes chromatographiques, principalement la CCM, ont confirmé la présence de ces métabolites. Ces résultats soulignent le potentiel de *Beauveria bassiana* en tant qu'agent de biocontrôle efficace, capable de produire des composés bioactifs utiles dans la gestion des populations d'insectes nuisibles.

Mots-clés : Champignons entomopathogènes, *Beauveria bassiana*, Mycotoxines, beauvéricine, Chromatographie sur couche mince.

Laboratoires de recherche : laboratoire de Mycologie, biotechnologie et de l'activité microbienne. (Chaabet erssas).

Président du jury : Mme BENSERRADJ Ouafa (MCA – Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Encadrant : Mme MIHOUBI Ilhem (Professeur. - Université Frères Mentouri, Constantine 1).
Examineur : Mme GHORRI Sana (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).