

---

## **Production de micro-organismes entomopathogènes pour lutter contre les moustiques et caractérisation de leurs métabolites**

**Auteur** : Druart, Florent

**Promoteur(s)** : Francis, Frédéric; Delvigne, Frank

**Faculté** : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme** : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique** : 2016-2017

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/3046>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**PRODUCTION DE MICRO-ORGANISMES  
ENTOMOPATHOGENES POUR LUTTER CONTRE LES  
MOUSTIQUES ET CARACTERISATION DE LEURS  
METABOLITES**

**DRUART FLORENT**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

**(CO)-PROMOTEURS: F. FRANCIS & F. DELVIGNE**

*« Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech. »*

**PRODUCTION DE MICRO-ORGANISMES  
ENTOMOPATHOGENES POUR LUTTER CONTRE LES  
MOUSTIQUES ET CARACTERISATION DE LEURS  
METABOLITES**

**DRUART FLORENT**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2016-2017**

**(CO)-PROMOTEURS: F. FRANCIS & F. DELVIGNE**

## Remerciements

Au terme de cette année, je voudrais remercier tout particulièrement les Professeurs Frédéric Francis et Frank Delvigne pour m'avoir accueilli dans leur unité (Entomologie fonctionnelle et évolutive et « Microbial, food and bio based technologies ») et pour avoir dirigé ce travail.

Je souhaite remercier le Directeur Sarah De Saeger et le Docteur Marthe De Boevre, pour avoir permis de réaliser les analyses de métabolites dans leur laboratoire, « Department of Bioanalysis in Laboratory of Food Analysis ».

Merci à Thomas Bawin pour m'avoir transmis toutes ses connaissances dans le domaine et pour m'avoir aidé dans les moments opportuns.

Merci au Docteur José Diana Di Mavungu pour m'avoir encadré durant les quelques jours passés à l'université de Gand et pour tous ces échanges fructueux.

Merci aux doctorants Emilie Bosquée et Laurent Sertheyn pour m'avoir encadré tout au long de ce travail, pour m'avoir donné de précieux conseils pour réaliser les expériences et pour la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Aurélien Legras et Cédric Tarayre pour leur encadrement efficace en microbiologie.

Merci à Zoure Abdou Azaque pour m'avoir initié à l'élevage des moustiques.

J'aimerais remercier particulièrement Nicolas Poncelet pour son aide, son encadrement précieux tout au long de mon travail de fin d'études et pour les bons moments partagés au laboratoire.

Je remercie tout le personnel de l'unité d'Entomologie fonctionnelle et évolutive pour la bonne ambiance de travail.

Merci également au personnel administratif et technique de l'unité « Microbial, food and bio based technologies » et plus particulièrement Samuel, Cathy, Benoît, Margue et Marina pour avoir toujours répondu à mes questions ; merci aussi à Frédéric et Valdet de l'Université de Gand.

Merci à tous mes copains de la Fac pour tous ces moments partagés ensemble durant toutes ces années. Pour éviter d'en oublier, je ne citerai aucun nom...

Pour terminer, je souhaiterais remercier ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur soutien de tous les jours.

## Résumé

Plusieurs micro-organismes, deux champignons (*Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) E. Cohn et une bactérie *Streptomyces albus* (Rossi-Doria) Waksman & Henrici), ont été cultivés selon deux modes de culture (culture submergée et en biofilm) dans le but d'utiliser leurs métabolites contre les larves de moustique *Culex quinquefasciatus* Say. Au niveau des champignons, les résultats de toxicité montrent qu'il y a des différences de mortalité en fonction des espèces et des modes de culture. *A. flavus* est plus toxique qu'*A. oryzae* ; les cultures en biofilm sont plus efficaces. L'analyse protéomique montre des différences entre les espèces et les modes de cultures. Les métabolites secondaires retrouvés dans les cultures d'*Aspergillus* sont l'acide aspergillique, l'acide beta-cyclopiazonique, l'acide cyclopiazonique, la ferrineoaspergilline, le flavacol et la speradine A. De manière générale, ces métabolites sont présents en concentrations plus importantes dans les surnageants d'*A. flavus* et en culture en biofilm. Ces résultats peuvent être corrélés avec une activité insecticide plus importante. Les CL10, 50, 90 en surnageant varient entre 0,34 % (v/v) et 12,71 % (v/v) pour des temps d'incubation de 24 à 72 heures. Au niveau de *S. albus*, les surnageants de la culture submergée ont permis de calculer une LT50 de 23,1 heures à une concentration de 20% (v/v). La validamycine n'a pas été détectée dans les surnageants produits par cette bactérie.

Mots clefs : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces albus*, métabolites secondaires, *Culex quinquefasciatus*, culture submergée, biofilm, contrôle biologique, micro-organisme entomopathogène.

## Abstracts and keywords

Several microorganisms, two fungi (*Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) E. Cohn and a bacterium *Streptomyces albus* (Rossi-Doria) Waksman & Henrici), are cultivated according to two culture methods (submerged culture and biofilm) to use their metabolites against mosquito larvae *Culex quinquefasciatus* Say. For fungi, toxicity results show that there are differences in mortality depending on species and culture patterns. *A. flavus* is more toxic than *A. Oryzae*; biofilm cultures are more effective. Proteomic analysis shows differences between species and modes of cultivation. The secondary metabolites found in *Aspergillus* cultures are: aspergillic acid, beta-cyclopiazonic acid, cyclopiazonic acid, ferrineospergillin, flavacol and spermadin A. Generally, these metabolites are present in higher concentrations in the supernatants of *A. Flavus* and in biofilm culture. These results can be correlated with a greater insecticidal activity. The supernatant CL10, 50, and 90 vary between 0.34% (v / v) and 12.71% (v / v) for incubation times of 24 to 72 hours. At the *S. albus* level, the supernatants of the submerged culture made it possible to calculate an LT50 of 23.1 hours at a concentration of 20% (v / v). Valamycin was not detected in the supernatants produced by this bacterium.

Key words: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces albus*, secondary metabolites, *Culex quinquefasciatus*, submerged culture, biofilm, biological control, entomopathogenic microorganism.

## Liste des abréviations

AMCA : Association Américaine de contrôle des moustiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

CL : Concentration létale

DL : dose létale

TL : temps léthal

ATCC : American Type Culture Collection

PDA : potato dextrose agar

YPD : yeast extract peptone dextrose

2D-dige : 2-dimensions difference gel electrophoresis

DTT : dithiothreitol

IAA : iodoacétamide

HPE : High performance electrophoresis

PMF : Peptid mass fingerprinting

pI : point isoélectrique

BLAST : Basic Local Alignment Search tool

LC-MS : Liquid Chromatography mass spectrometry

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

ESI : source d'ionisation par électrospray

NRPS : non ribosomal peptide synthase

PKS : polyketide synthase

## Contenu

I.	Introduction.....	1
II.	Bibliographie.....	2
1.	Moustique .....	2
2.1.	Caractéristiques anatomiques.....	2
2.2.	Cycle biologique .....	3
2.3.	<i>Culex quinquefasciatus</i> Say .....	4
2.	Maladies transmises par le moustique .....	4
3.	Lutte contre le moustique .....	7
3.1.	Gestion environnementale du moustique .....	7
3.2.	Lutte chimique.....	7
3.3.	Lutte physique .....	8
3.4.	Lutte génétique .....	8
3.5.	Lutte biologique.....	9
4.	Champignons entomopathogènes .....	11
5.	Bactéries entomopathogènes .....	15
6.	Conditions de cultures de ces micro-organismes.....	18
III.	Objectif général .....	21
IV.	Matériel et méthodes.....	22
1.	Elevage des moustiques .....	22
2.	Culture d' <i>Aspergillus flavus</i> Link et <i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) E. Cohn .....	22
3.	Culture de <i>Streptomyces albus</i> (Rossi-Doria) Waksman & Henrici .....	23
4.	Test de toxicité .....	23
5.	Analyse protéomique .....	24
5.1.	Extraction des protéines.....	24
5.2.	Electrophorèse 2D-dige .....	24
5.3.	Identification des protéines. ....	26
6.	Analyse métabolomique des jus de fermentation d' <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus oryzae</i> ..	27
7.	Analyse de la validamycine.....	28
8.	Analyses statistiques .....	30
V.	Résultats .....	31
1.	Biomasse microbienne .....	31
1.1.	Mesure de la biomasse produite par les deux espèces d' <i>Aspergillus</i> .....	31



1.2.	Mesure de la biomasse produite par <i>Streptomyces albus</i> .....	31
2.	Tests de toxicité.....	32
2.1.	Test de toxicité des surnageants d' <i>A. flavus</i> .....	32
2.2.	Test de toxicité des surnageants d' <i>A. oryzae</i> .....	35
2.3.	Comparaison entre le test de toxicité d' <i>A. flavus</i> et celui d' <i>A. oryzae</i> .....	37
2.4.	Test de toxicité des surnageants de <i>S. albus</i> .....	38
3.	Analyse des surnageants .....	40
3.1.	Analyse protéomique des surnageants d' <i>A. flavus</i> et <i>A. oryzae</i> .....	40
3.2.	Analyse des métabolites secondaires des surnageants d' <i>A. flavus</i> et <i>A. oryzae</i> . .....	43
3.3.	Dosage de la validamycine dans les surnageants.....	47
VI.	Discussion .....	48
	À propos d' <i>Aspergillus flavus</i> et d' <i>Aspergillus oryzae</i> .....	48
	Au niveau de la biomasse .....	48
	Au niveau de la toxicité .....	48
	Au niveau des protéines .....	49
	Au niveau des mycotoxines .....	50
	Au niveau de la corrélation entre les paramètres analysés. ....	52
	À propos de <i>Streptomyces albus</i> .....	53
	Au niveau de la biomasse .....	53
	Au niveau de la toxicité .....	53
	Au niveau de la validamycine .....	54
	À propos du développement d'un insecticide microbien .....	55
VII.	Conclusions et perspectives .....	56
VIII.	Références bibliographiques .....	58
IX.	Annexe.....	66

Figure 1 Anatomie d'un moustique (Villarreal, 2012) .....	2
Figure 2 Cycle biologique du moustique (La biodiversité en Wallonie, 2015) .....	3
Figure 3 Classification des protéines sécrétées par <i>A. Flavus</i> (Medina <i>et al.</i> , 2005). .....	13
Figure 4 Cycle de vie du <i>Streptomyces</i> (Sousa & Olivares, 2016).....	16
Figure 5 Structures chimiques de la valienamine et de ses dérivés (Chen <i>et al.</i> , 2017). .....	17
Figure 6 Développement d'un biofilm selon différents processus (Claessen <i>et al.</i> , 2014) .....	19
Figure 7 Droites d'étalonnage établies lors de la mise au point du dosage de la validamycine.....	29
Figure 8 Biomasse produite par <i>A. flavus</i> et <i>A. oryzae</i> après 5 jours selon les deux modes de culture, pour 100 mL de milieu.....	31
Figure 9 Evolution de la biomasse produite par <i>S. albus</i> en fonction du temps selon les deux modes de culture, pour 100 mL de milieu .....	32
Figure 10 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant produit par <i>A. flavus</i> en culture submergée.....	33
Figure 11 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant produit par <i>A. flavus</i> en biofilm.....	33
Figure 12 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction des concentrations en surnageant produit par <i>A. flavus</i> après 48 heures.....	34
Figure 13 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant produit par <i>A. oryzae</i> en culture submergée.....	36
Figure 14 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant produit par <i>A. oryzae</i> en biofilm.....	36
Figure 15 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant produit par <i>A. oryzae</i> après 48 heures.....	37
Figure 16 Evolution de la mortalité (20 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction du temps pour une concentration en surnageant de 10%, comparaison de la toxicité entre les deux espèces d' <i>Aspergillus</i> . .....	37
Figure 17 Evolution de la mortalité (10 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant de <i>S. albus</i> produit en culture submergée. ....	38
Figure 18 Evolution de la mortalité (10 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction de la concentration en surnageant produit par <i>S. albus</i> en biofilm. ....	38
Figure 19 Evolution de la mortalité (10 larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> ) en fonction des surnageants produits par <i>S. albus</i> selon les deux modes de culture après 48 heures. ....	39
Figure 20 Gel préparatif reprenant les différents spots protéiques analysés des surnageants d' <i>A. flavus</i> , d' <i>A. oryzae</i> et du milieu .....	41

Tableau 1 Principales maladies véhiculées par les moustiques (Liehne, 2009).....	5
Tableau 2 Champignons affectant les moustiques (Scholte <i>et al.</i> , 2004) .....	11
Tableau 3 Protéines sécrétées par <i>A. Flavus</i> selon différents milieux (Medina <i>et al.</i> , 2005). .....	13
Tableau 4 Protéines sécrétées par <i>A. oryzae</i> selon différentes conditions de cultures Oda <i>et al.</i> (2006). .....	14
Tableau 5 Conditions de migration (en journée) des protéines selon leur poids moléculaire.....	26
Tableau 6 Paramètres MS pour l'acquisition en mode « multiple reaction monitoring ».....	29
Tableau 7 Concentrations létales (CL10, CL50, CL90, exprimées en pourcentage en surnageant) en fonction du temps d'exposition pour <i>A. flavus</i> cultivé en biofilm. ....	35
Tableau 8 Concentrations létales (CL10, CL50, exprimées en pourcentage en surnageant) en fonction du temps d'exposition pour <i>S. albus</i> en culture submergée.....	40
Tableau 9 Identification des protéines par LC-MS-MS dans les surnageants d' <i>A. flavus</i> et <i>A. oryzae</i> produits selon les deux modes de cultures (B : biofilm et S : submergée) et dans le milieu.....	42
Tableau 10 Métabolites secondaires des deux espèces d' <i>Aspergillus</i> .....	44
Tableau 11 Dosage de la validamycine dans les surnageants de <i>Streptomyces</i> et d' <i>Aspergillus</i> produits selon 2 modes de production.....	47
Tableau 12 Métabolites secondaires retrouvés dans des spores d' <i>A. flavus</i> , du son de blé (substrat d' <i>A. flavus</i> ), larves traitées par <i>A. flavus</i> (Bawin, communication personnelle).....	52
Tableau 13 Métabolites secondaires sécrétés par <i>A. flavus</i> recensés dans la littérature. ....	66

## I. Introduction

La plupart des espèces de moustiques sont vecteurs d'agents pathogènes transmissibles à l'homme et aux animaux. Ces agents pathogènes peuvent être responsables de maladies dont les plus connues sont la dengue, la malaria, le chikungunya, la fièvre du Nil occidental, la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise ou la filariose lymphatique,... (Becker *et al.* 2010). Ils peuvent être de trois types : virus, protozoaires ou nématodes (Goddard, 2008). Selon l'Association Américaine de contrôle des Moustiques (AMCA), plus d'un million de personnes meurent chaque année à cause des maladies transmises par les moustiques. Plus de 60% de la population mondiale est exposée à ces maladies (Organisation des Nations Unies, 2016). La lutte anti-vectorielle contre le moustique est un enjeu majeur afin de lutter contre les maladies infectieuses citées ci-dessus. De plus, les conditions climatiques plus chaudes permettent aux moustiques de se multiplier plus rapidement et par conséquent d'accélérer la transmission des maladies infectieuses (Rossati, 2017). Au vu de ces changements climatiques et des approches de développement durable actuels, il est donc important de trouver des solutions efficaces et respectueuses de l'environnement pour réduire les populations de moustiques. Une gestion intégrée du contrôle des moustiques est d'ailleurs préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé mais il n'existe, à ce jour, pas encore de règle formelle en Europe auxquels les opérateurs publics peuvent se référer (Agence nationale pour la démoustication et la gestion des espaces naturels démoustiqués & Commission européenne, 2013).

C'est dans ce cadre que se situe notre travail de fin d'études. Il s'intéresse plus particulièrement à l'utilisation de micro-organismes entomopathogènes pour lutter contre les moustiques et s'insère dans les différentes approches développées dans l'unité Entomologie fonctionnelle et l'unité « Microbial, food and biobased technologies ». Le moustique cible est le *Culex quinquefasciatus* Say et les micro-organismes pathogènes produits sont : *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) E. Cohn et *Streptomyces albus* (Rossi-Doria) Waksman & Henrici.

## II. Bibliographie

### 1. Moustique

Les moustiques sont des diptères qui font partie de la famille des Culicidae. C'est un groupe important qui compte de l'ordre de 3 500 espèces classées dans 2 sous-familles (Anophelinae et Culicinae) réparties dans 112 genres (Harbach, 2008).

#### 2.1. Caractéristiques anatomiques

Le moustique mesure entre 8 et 10 mm. Les pattes et le corps sont de couleur brun-noir et peut présenter des tâches ou bandes. Le thorax, constitué de 3 segments, est porteur d'une paire d'ailes, d'une paire de petits balanciers et de 3 paires de pattes. Les pattes sont formées de cinq pièces et le tarse, se terminant par deux griffes, de cinq articles. L'abdomen est plus étroit que le thorax et est composé de neuf segments. A la fin de l'abdomen se trouvent 2 cerques. La femelle porte l'orifice de ponte et le mâle un appareil génital externe avec une ou deux paires d'appendices copulateurs et un pénis (Figure 1) (Terrien, 2008).

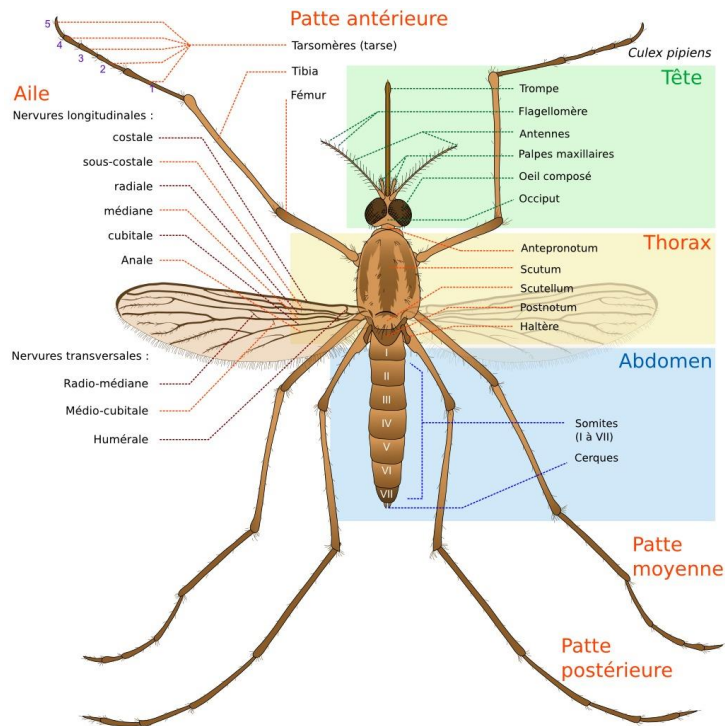


Figure 1 Anatomie d'un moustique (Villarreal, 2012)

## 2.2. Cycle biologique

Deux à quatre jours après un repas de sang, la femelle pond entre 50 et 500 œufs dans l'eau. L'oviposition peut avoir lieu dans des eaux temporaires, permanentes, naturelles ou encore artificielles. Le site d'oviposition est fonction de l'espèce. L'éclosion de l'œuf dépend de la température et de l'espèce, elle a lieu entre 1 et 10 jours après la ponte. La larve aquatique passe par 4 stades différents et se métamorphose ensuite en puppe aquatique. Les larves se nourrissent de matières organiques et de petits organismes (bactéries, protozoaires, champignons, algues, micro-invertébrés). Le développement des larves dépend de la température, de la nutrition et de la densité de population. Enfin, la puppe aquatique se métamorphose en adulte après deux jours (Figure 2). L'accouplement est suivi d'un repas sanguin qui permet la maturation des œufs (Becker *et al.*, 2010 ; Bhattacharya & Basu, 2016).

La nécessité de se nourrir de sang pour les femelles, que ce soit du sang humain ou d'autres animaux, entraîne la transmission de pathogènes (Harbach, 2008). Le moustique peut passer l'hiver sous ses différentes formes, celle-ci dépend de l'espèce (Office pour les insectes, 2009).

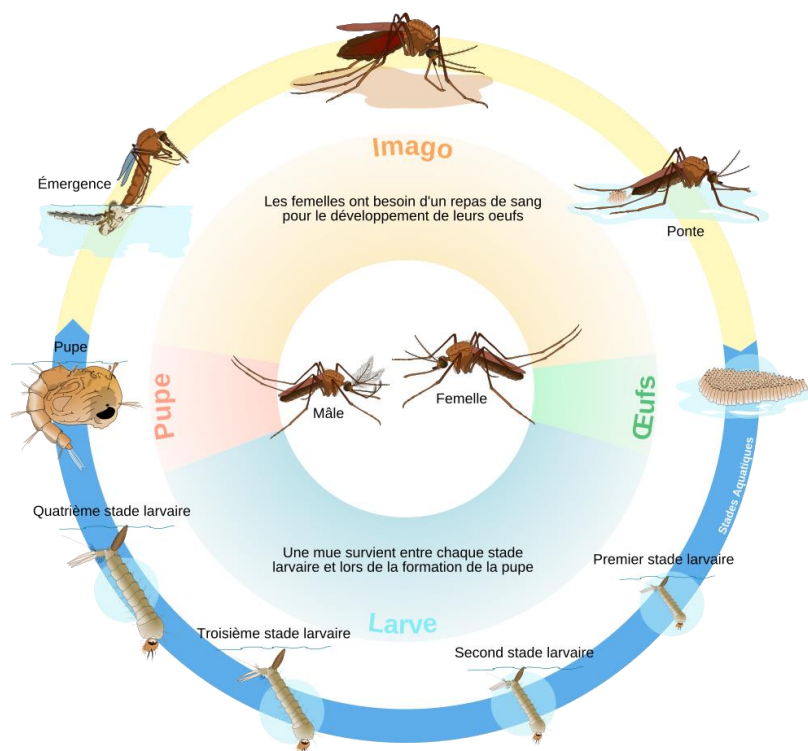


Figure 2 Cycle biologique du moustique (La biodiversité en Wallonie, 2015)

### 2.3. *Culex quinquefasciatus* Say

Il existe une différence morphologique entre les moustiques appartenant à la famille des anophelinés et les moustiques appartenant à la famille des culicinés. En effet, ces derniers possèdent des palpes plus courts que la trompe, ce qui n'est pas le cas chez les anophélinés (Terrien, 2008).

La température optimale pour le développement embryonnaire de *Cx. quinquefasciatus* se situe entre 24 à 29°C avec une limite de survie entre 12°C et 32°C. Le milieu favorable pour le développement des larves est une eau alcaline avec du NaCl (0,5%), CaCl<sub>2</sub> et Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Bhattacharya & Basu, 2016).

*Cx. quinquefasciatus* peut s'adapter dans diverses niches écologiques (zones urbaines, zones périurbaines, zones rurales) et la femelle est capable de piquer non seulement l'homme mais également les amphibiens, les cochons, les chevaux, les bovins, les moutons, les chiens et les lapins. En Inde, il est possible qu'elle accomplisse jusqu'à 4 à 8 cycles gonotrophes durant la saison froide. Comme le signalent Bhattacharya & Basu (2016), la diversité génétique de *Cx. quinquefasciatus* lui permet de résister à certains insecticides et les œufs sont résistants à la dessiccation. Toutes ces caractéristiques lui permettent d'être une espèce envahissante.

## 2. Maladies transmises par le moustique

Le Tableau 1 reprend les principales maladies véhiculées par les moustiques. Certaines maladies nécessitent une attention particulière. Les données ci-dessous émanent de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé, 2017).

Tableau 1 Principales maladies véhiculées par les moustiques (Liehne, 2009).

Les maladies principales, leurs hôtes invertébrés, en lien avec les zones humides en Afrique.			
Maladies	Parasites responsables de la maladie	Hôtes invertébrés	Distribution géographique
Malaria	Plasmodium spp. En Afrique du Sud : <i>Plasmodium falciparum</i> Marchiafava et Celli	Les moustiques anophèles <i>A. arabiensis</i> Patton <i>A. gambiae</i> sensu lato <i>A.funestus</i> Giles	Afrique
La fièvre de la vallée du Rift	Arbovirus	<i>Aedes spp.</i>	Afrique centrale mais occasionnellement en Afrique du Sud
La fièvre de l'ouest du Nil et Sindbis	Arbovirus	<i>Culex univittatus</i> Theobald et <i>Culex. neavei</i> Druce	Afrique centrale mais occasionnellement en Afrique du Sud
Chikungunya	Arbovirus	<i>Aedes spp.</i> Et particulièrement <i>Aedes Aegypti</i> Linnaeus	Partout en Afrique mais occasionnellement en Afrique du Sud
Dengue	Arbovirus	<i>Aedes aegypti</i> Linnaeus	La plupart des régions tropicales et subtropicales. Pas en Afrique du Sud mais présent en Mozambique
Fièvre jaune	Arbovirus	<i>Aedes simpsoni</i> Theobald, <i>Aedes africanus</i> Roque, <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus	Afrique centrale
Filariose	Nématodes : <i>Wuchereria bancrofti</i> Cobbold <i>Onchocerca volvulus</i> Leuckart	<i>Culex spp.</i>	Afrique centrale
Onchocerciose	Nematode : <i>Onchocerca volvulus</i> Leuckart	<i>Simulium damonsum</i> Latreille	Afrique centrale

- 3,2 milliards de personnes sont exposées à la malaria. Cette maladie est fortement présente en Afrique subsaharienne. En effet, cette région africaine reprend 90% des décès mondiaux. Les espèces du genre *Anopheles* en sont les principaux vecteurs. Les premiers symptômes sont la fièvre, des céphalées, des frissons et des vomissements et apparaissent généralement 10-15 jours après l'infection. Mais cette maladie peut rapidement entraîner la mort. Contre la malaria, il est vivement recommandé de suivre un traitement dès les 24-48h qui suivent l'apparition des symptômes.
- Le virus du Nil occidental est transmis par le genre *Culex* qui se nourrit sur des oiseaux infectés. Ce moustique peut ensuite le transmettre à l'homme et au cheval. Dans 20% des cas, ce virus provoque des céphalées, fortes fièvres, raideurs de la nuque, désorientations, comas, tremblements, convulsions, faiblesses musculaires et paralysies. Cette maladie peut entraîner la mort. Le virus du Nil occidental peut être



traité symptomatiquement par des perfusions intraveineuses, une assistance respiratoire et une prévention des infections secondaires.

- Le chikungunya est une maladie transmise par le genre *Aedes*. On peut observer des symptômes comme la fièvre, des douleurs articulaires et musculaires sévères, des céphalées, des nausées, de la fatigue et une éruption cutanée. Les symptômes apparaissent 2 à 12 jours après l'infection. Généralement, les personnes infectées peuvent être soignées complètement mais il est possible que des douleurs articulaires persistent. Il faut souligner que chez les personnes âgées le chikungunya peut entraîner la mort. Encore une fois, cette maladie ne peut être soignée complètement. Il est seulement possible d'en diminuer les symptômes en pratiquant l'arthralgie, au moyen d'antipyrétiques, d'analgésiques et par une hydratation optimale.
- La dengue est également transmise par le genre *Aedes*. Près de 4 milliards de personnes y sont exposées. Les symptômes sont divers : fortes fièvres, céphalées sévères, douleurs rétroorbitaires, douleurs musculaires et articulaires, des nausées, des vomissements, une adénopathie ou éruption cutanée. Il est possible aussi que la dengue évolue vers une forme plus sévère avec l'apparition d'hypothermie, douleurs abdominales sévères, vomissements persistants parfois accompagnés de sang, respiration rapide, saignements des gencives, fatigue, agitation. Elle peut entraîner la mort. Il est recommandé de commencer un traitement 24-48 heures après l'apparition des symptômes. Le maintien d'un volume liquidien chez le patient est important pour la dengue sévère. Un vaccin est disponible mais l'OMS préconise son utilisation dans les zones géographiques où il y a un risque d'épidémie.
- *Aedes* peut également transmettre la fièvre jaune. La transmission se fait dans un premier temps sur le singe ensuite le moustique le transmet à l'être humain. Il est possible que les symptômes apparaissent déjà après 3-6 jours. Parmi les symptômes citons : la fièvre, des douleurs musculaires, dorsales, des céphalées, des frissons, une anorexie, des nausées et des vomissements. Il existe une phase plus virulente mais plus rare qui provoque une forte fièvre, un ictère avec des douleurs abdominales et vomissements, saignements de la bouche, du nez, des yeux ou de l'estomac et dans 50% des cas la mort. Un traitement symptomatique à l'hôpital contre la déshydratation, l'insuffisance hépatique et rénale et la fièvre diminue le taux de mortalité chez les patients. il existe un vaccin également pour la fièvre jaune.

Diverses précautions peuvent être prises de manière générale: prise de médicaments préventifs et vaccination, gestion des gîtes larvaires en limitant les endroits où l'eau pourrait s'y accumuler, moustiquaires à imprégnation durable d'insecticides, pulvérisations régulières d'insecticides, utiliser des répulsifs, porter des vêtements à manches longues et des pantalons.

### **3. Lutte contre le moustique**

Il existe différentes méthodes de lutte contre le moustique : la lutte chimique, le contrôle physique, le contrôle génétique et le contrôle biologique.

#### **3.1. Gestion environnementale du moustique**

Selon l'OMS « La gestion environnementale vise à modifier l'environnement afin de prévenir ou de limiter la propagation des vecteurs et les contacts entre l'homme et les vecteurs pathogènes ». L'objectif de la gestion environnementale n'a pas pour but de tuer directement les insectes. Elle est utilisée en prévention (Becker *et al.*, 2010). Elle a pour but de modifier ou de supprimer tout habitat qui serait propice au développement de moustiques (OMS, 2017).

L'OMS (2017) distingue trois types de gestion environnementale

- La modification environnementale durable afin de limiter les habitats larvaires (exemple : l'installation d'un réseau fiable d'approvisionnement en eau canalisé)
- La manipulation environnementale temporaire des habitats des vecteurs (exemples : vider et nettoyer régulièrement les réservoirs d'eaux, éviter de laisser des récipients qui retiendraient l'eau,...)
- Les modifications de l'habitat ou du comportement humain pour limiter les rencontres entre l'humain et le vecteur (exemple : moustiquaires, écrans anti-insectes aux fenêtres et aux portes).

La gestion environnementale des moustiques reprend un ensemble d'action dont l'amélioration des infrastructures urbaines, leurs entretiens, l'assainissement et l'évacuation des déchets.

#### **3.2. Lutte chimique**

La lutte chimique contre le moustique a commencé en 1892 avec le dinitro-o-crésol. À l'approche de la seconde guerre mondiale, la production de pesticides s'est intensifiée. Parmi ces pesticides, nous pouvons citer le DDT, un insecticide qui fait partie de la famille des organochlorés apparu en 1939. Ensuite, d'autres familles d'insecticides sont arrivées : les organosphosphates, les carbamates en 1950 et pour terminer des pyréthriinoïdes en 1960. Ces derniers sont particulièrement dangereux pour les espèces aquatiques. En 1962, dans

une publication intitulée « Silent Spring », Rachel Carson a mis en avant les effets indésirables des organochlorés et plus particulièrement celui du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane). Dans cette même publication, elle proposait déjà des alternatives aux méthodes de lutte chimique existantes comme l'utilisation de perturbateurs métaboliques, des inhibiteurs de mue et de modifications de comportements des insectes ainsi que les hormones juvéniles (Becker *et al.*, 2010; Sibanda, 2013).

### **3.3. Lutte physique**

La lutte physique en entomologie correspond à l'utilisation de processus mécanique ou physique afin d'éliminer les insectes nuisibles. Parmi les techniques de lutte physique contre les moustiques non matures citons l'épandage d'huile, de surfactant et de molécules organiques (Liparol, perles en polystyrène). Ces molécules empêchent l'oxygénation de l'insecte et agit sur la tension superficielle de l'eau. Le liparol est une substance organique contenant de la lécithine qui est une macromolécule connue pour ses propriétés hydrophiles, hydrophobes et également insecticides (Aly, 1987). Une autre solution est de piéger l'insecte adulte en utilisant des combinaisons de lumière et de substances attractives. Le moustique meurt ensuite soit d'un choc électrique au contact d'une grille à haute tension soit par manque de nourriture. Compte tenu du taux de reproduction important des moustiques, certains scientifiques sont sceptiques sur l'efficacité de cette méthode (Quarles, 2003). Une technologie à énergie laser a aussi fait son apparition. Ce laser aurait la capacité de sexer le moustique et de le tuer si celui-ci est une femelle. La lutte physique se diversifie dans ces techniques. Elle fait encore l'objet d'études malgré son efficacité limitée. L'intérêt que certains scientifiques portent sur ce type de lutte est dû, d'une part, au fait qu'elle n'est pas soumise aux contraintes strictes d'homologation des pesticides et, d'autre part, au fait qu'il est peu probable que des moustiques résistants apparaissent (Becker *et al.*, 2010; Zyga, 2009 ; OMS, 2009).

### **3.4. Lutte génétique**

Le contrôle génétique consiste à éliminer ou remplacer une population d'insectes nuisibles en utilisant la modification ou l'altération génétique. Pour le contrôle génétique des moustiques, il y a deux approches principales, l'élimination de la population et le remplacement de population. La technique des mâles stériles consistent à lâcher des mâles rendus stériles par irradiation (Sibanda *et al.*, 2013). Ceux-ci s'accouplent avec les femelles indigènes, sans donner de progéniture. Si cette technique est réalisée sur un temps suffisamment long avec un nombre de mâles stériles important, il est possible de diminuer fortement la population de moustiques. Cette méthode possède de nombreux avantages

notamment, une très haute spécificité et elle est plus efficace sur les espèces peu nombreuses. La deuxième approche consiste à libérer une souche de moustique génétiquement modifiée qui ne peut pas être vecteur du parasite ciblé. Cette souche est censée remplacer la souche indigène et de cette manière rendre le moustique inoffensif pour l'homme (Becker *et al.*, 2010 ; Center for Health Protection, 2004; Resnik, 2015).

### **3.5. Lutte biologique**

La lutte biologique a pour objectif de ramener une population cible à un niveau « acceptable » en utilisant des micro-organismes mais aussi des macroorganismes ou encore des toxines produites par des micro-organismes. C'est au 19<sup>ème</sup> siècle que les premières introductions de prédateurs de moustiques ont eu lieu. Parmi ces prédateurs, citons la libellule et les poissons mangeurs de larves de moustiques (*Gambusia affinis* et *Gambusia holbrooki*)(Sibanda *et al.*, 2013). Malheureusement, avec l'apparition des insecticides de synthèse en 1940, la lutte biologique a été écartée pendant quelques années. La réapparition de la lutte biologique contre les moustiques n'a eu lieu qu'à partir des années 1960 lors de la prise de conscience des dommages écologiques que pouvaient engendrer les insecticides de synthèse (Becker *et al.*, 2010).

#### **3.5.1. Prédateurs**

Il y a deux stratégies d'exploitation des prédateurs de moustiques : l'inoculation et l'inondation. L'inoculation a pour objectif d'introduire un prédateur ou un parasite dans le but qu'il puisse s'établir dans l'environnement et contrôler la population de moustiques cibles. Un exemple de cette stratégie est l'introduction de poisson mangeur de moustiques dans les cultures de riz immergées. Par contre, l'inondation consiste à libérer un grand nombre de prédateurs, parasites, pathogènes ou toxines dans l'environnement afin de réduire significativement la population cible sans que ceux-ci ne s'établissent à long terme dans l'environnement (Bawin, 2016 ; Fraval, 1999). Parmi les entomophages certains ont plus de succès que d'autres notamment les poissons tels que le gambusie et le guppy. Beaucoup de mammifères, oiseaux, amphibiens, cnidaires, plathelminthes et arachnides se nourrissent de moustiques mais leur production massive est souvent trop compliquée et surtout coûteuse (Shaalán & Canyon, 2009 ; Raghavendra *et al.*, 2008). De plus, leur régime est peu spécifique ce qui pourrait engendrer des déséquilibres écosystémiques. Une liste exhaustive des prédateurs de moustiques est reprise dans la thèse de Bawin (2016).

### **3.5.2. Pathogènes**

Une alternative intéressante à la lutte chimique repose sur l'utilisation d'organismes entomopathogènes. Ces organismes sont des micro-organismes et peuvent être des champignons, des bactéries, des virus ou encore des protozoaires (Regnaut-Roger, 2005). Ils agissent en infectant leur hôte, ils s'y développent et tuent l'hôte en émettant des substances toxiques. Les micro-organismes sont très intéressants car ils possèdent un spectre d'action étroit grâce à leur mode d'action. Il existe plusieurs stratégies d'application. Il est possible de pulvériser le micro-organisme ou de traiter avec des molécules dérivées de ce micro-organisme. Dans le cas de l'utilisation d'organisme microscopique soit on promeut sa présence dans l'environnement de l'hôte, soit on les introduit en essayant de les acclimater dans un espace-temps défini (Bawin, 2016).

### **3.5.3. Développement d'un biopesticide microbien**

Un biopesticide « organisme vivant ou produit issu de cet organisme ayant la particularité de supprimer ou limiter les ennemis des cultures » se développe selon les étapes suivantes. Il faut dans un premier temps définir le marché ou l'objectif de lutte en mettant en avant les avantages que pourraient apporter ce biopesticide. Ensuite, vient la phase de sélection qui consiste à isoler l'organisme depuis l'environnement et de l'identifier clairement au niveau de sa taxonomie. Une fois l'organisme sélectionné, il est nécessaire de pouvoir le produire en masse. Ce qui signifie qu'il est nécessaire de mettre au point le milieu de culture adéquat pour son développement. Il est important ensuite de déterminer les souches les plus efficaces pour l'objectif de lutte défini. Cette efficacité est exprimée en CL50 (concentration létale occasionnant 50% de mortalité), DL50 (dose létale occasionnant 50% de mortalité) ou encore TL50 (temps pour lequel 50% des individus sont morts). Après l'efficacité, vient la spécificité. Des tests de toxicité sur des organismes non cibles sont nécessaires pour pouvoir déterminer le spectre d'action du micro-organisme. Enfin, la formulation est essentielle pour le stockage, l'application du produit et l'efficacité (OMS, 2005; Jijakli, 1995).

Dans le cadre de notre travail de fin d'études, nous nous intéresserons plus particulièrement aux champignons et bactéries entomopathogènes et à leurs conditions de culture pour comprendre leur incidence sur leur activité biologique.

#### 4. Champignons entomopathogènes

Il existe actuellement environ 700 espèces de champignons répertoriées comme agent de lutte contre les insectes. La plupart de ces champignons sont repris par les groupes des Zygomycètes, Ascomycètes, Chytridiomycètes, Oomycètes (Scholt *et al.*, 2004). Les principales espèces sont reprises dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 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>
			<i>Smittium morbosum</i>
			<i>Culicinomyces clavisporus</i>
	Ascomycota	Hypocreales	<i>Beauveria bassiana</i>
			<i>Beauveria brongniartii</i>
			<i>Metarhizium anisopliae</i>
			<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>

De nombreuses recherches de myco-insecticides sont effectuées dans l'ordre des Hypocréales. Dans cet ordre, nous retrouvons différents genres plus connus comme *Beauveria*, *Metarhizium* ou encore *Culicinomyces*.

Les Hypocréales peuvent pénétrer dans l'insecte par voie orale ou au travers du tégument externe. En ce qui concerne cette dernière voie d'infestation, le développement se déroule en 4 phases. (1) Les spores se fixent à la cuticule grâce à leur nature hydrophobe mais aussi grâce à la sécrétion de substances mucilagineuses. (2) Les spores germent ensuite en fonction des conditions environnementales et de l'hôte. Durant cette phase de germination, des enzymes sont produits pour permettre le développement du tube germinal. (3) L'apparition d'appressoria signifie que le champignon est en phase de différenciation. (4) Les filaments infectieux pénètrent la cuticule par une action mécanique et enzymatique et permettent aux champignons de se développer et de produire des métabolites toxiques pour l'insecte (Bawin, 2016).

Pour développer des mycoïnsecticides efficaces, peu coûteux et stables, de nombreux travaux s'intéressent également au genre *Aspergillus* dont certaines espèces sont déjà bien connues industriellement (*A. niger* pour la production d'acide citrique, *A. oryzae* pour la production de glucoamylase).

*Aspergillus* est un genre qui compte 250 espèces de champignons filamenteux saprophytes appartenant aux Ascomycètes. Le cycle de vie des *Aspergillus* comprend des scénarios asexués, parasexués et sexués. Lors de la germination, les spores asexuées haploïdes se développent en filaments ramifiés ou hyphes, formant ainsi un mycélium. Les hyphes peuvent fusionner ce qui marque le début de la phase parasexuée. Cette phase est suivie par des événements de mitose. Alternativement, les hyphes peuvent rentrer dans la phase sexuée. L'espèce hétérothallique s'accouple obligatoirement avec un individu de type opposé. L'espèce homothallique peut non seulement s'accoupler avec un individu de type opposé mais elle est capable aussi de se reproduire seul. La cellule qui contient deux noyaux issus soit du même organisme soit de différents organismes produise par division un asque (structure de formation de spores). Les deux noyaux vont ensuite fusionner pour former une cellule diploïde qui subit une méiose et produit des ascospores haploïdes. Les *Aspergillus* digèrent les éléments nutritifs à l'extérieur de leurs cellules, ces organismes possèdent des capacités étonnantes dans l'exportation d'enzymes spécialisées. *A. oryzae*, le «champignon national» du Japon, possède la capacité de transformer les grains riches en amidon, comme le riz et les graines de soja en sucres, plusieurs traditions en sont issues comme le saké au vin de riz et la sauce soja. Néanmoins, certains *Aspergillus* produisent des toxines qui peuvent être à l'origine de maladie humaines comme c'est le cas pour *A. flavus* qui produit une aflatoxine cancérogène qu'on retrouve dans les aliments. *A. fumigatus* connu pour être un agent pathogène opportuniste mortel peut causer des cas de méningite fongique (Rokas, 2013). Différentes espèces d'*Aspergillus* se retrouvent dans l'environnement de l'insecte. Mais peu ont un effet insecticide direct (Bawin, 2016). Les espèces les plus souvent citées sont *A. flavus*, *A. parasiticus*. Elles concernent différents insectes (*Apis mellifera carnica*, *Hyblaea puer*a,...). Ces études sont reprises dans la thèse de Bawin (2016).

Concernant le mode d'action d'*Aspergillus*, deux hypothèses sont émises suite aux observations effectuées. En effet, des développements de mycélium ont été observés sur la cuticule de l'insecte mais aussi dans le tube digestif. Ce qui rejoint le mécanisme d'action des hypocréales (Seye *et al.*, 2014).

Les essais réalisés sur *Cx. quinquefasciatus*, par Bawin (2016) montrent que les spores d'*A. flavus* et *A. clavatus* peuvent atteindre des niveaux de virulence comparables à celle de *M. anisopliae*. Ces spores peuvent être produites aisément en milieu semi-solide sur un substrat peu coûteux à base de son de blé et à haute concentration ( $10^9$  spores/g).

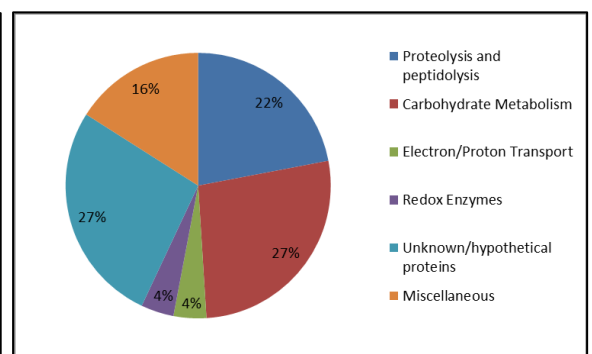
Les métabolites produits par *Aspergillus*, qui pourraient intervenir dans leur activité insecticide, sont principalement les protéines enzymatiques et des métabolites secondaires comme des toxines. Ainsi Medina *et al.* (2015) ont montré l'influence de la composition du

milieu de culture sur l'excrétion des protéines par *A. flavus*. Dans cette étude, une analyse protéomique a été utilisée pour identifier les protéines sécrétées par *A. flavus* cultivé en culture submergée sur du rutoside seul ou additionné de glucose ou d'extrait de pomme de terre dextrosé (Tableau 3), le rutoside étant un flavonoïde que le champignon est capable de dégrader. Dix protéines étaient particulières au rutoside, cinq au glucose et une à l'extrait de pomme de terre dextrosé. Seize protéines sécrétées étaient communes aux trois médias. Quatorze identifications étaient des protéines hypothétiques ou de fonctions inconnues. La moitié des protéines identifiées sont des enzymes (27% + 22%) qui interviennent dans le catabolisme des protéines et des hydrates de carbone (Figure 3).

**Tableau 3 Protéines sécrétées par *A. Flavus* selon différents milieux (Medina et al., 2005).**

**Figure 3 Classification des protéines sécrétées par *A. Flavus* (Medina et al., 2005).**

Protéine	Rutoside	Glucose	Dextrose de pomme de terre
Proteolysis and peptidolysis			
Leucine aminopeptidase	x	x	
Carboxypeptidase S1	x	x	x
Aminopeptidase	x	x	x
Alanyl dipeptidyl peptidase	x	x	x
Alkaline protease	x	x	x
Prolyl peptidyl peptidase	x	x	x
Oryzin precursor	x		x
Carboxypeptidase D	x	x	x
Metalloprotéinase 23 kDa precursor	x		
Aminopeptidase Y		x	
Neutral protease I		x	
Carbohydrate metabolism			
Beta-galactosidase	x		
Alpha-amylase	x	x	x
Beta-glucosidase	x	x	x
Glucosylase	x	x	x
Beta(1-3)endoglucanase	x	x	x
Beta-N-acetylglucosaminidase	x	x	x
Alpha-mannosidase	x	x	x
Exo-1,3-beta glucanase	x	x	x
Beta-glucosidase 1	x	x	
Endo-1,4-beta-xylanase	x		
Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase A precursor	x	x	
Alpha-glucosidase		x	
Alpha-glucosidase B		x	
Chitinase	x		
Putative glucanase precursor		x	
Electron/proton transport			
Isoamyl alcohol oxidase	x	x	x
Catalase	x	x	x
Redox Enzymes			
Manganese superoxide dismutase	x		
Cu, Zn superoxide dismutase	x		
Miscellaneous			
Glutaminase	x	x	x
ATP synthase beta subunit	x		
Quercetin 2,3-dioxygenase	x		
Phosphoglyceromutase	x	x	
Probable cyanate lyase	x		
Malate dehydrogenase	x		
Ribonuclease T2 precursor			x





Oda *et al.* (2006) ont étudié la protéomique d'*A. oryzae* en culture submergée et en culture semi-solide. La majorité des 29 protéines identifiées sont aussi des enzymes qui interviennent dans le catabolisme des protéines et des hydrates de carbone. Certaines protéines sont communes aux deux types de cultures et d'autres sont spécifiques à chacun des modes de culture.

Tableau 4 Protéines sécrétées par *A. oryzae* selon différentes conditions de cultures Oda *et al.* (2006).

Conditions de culture et spots	Données			Annotation			Score	Coverage (%)	Peptides matchés
	donnée sur le génôme d' <i>A. oryzae</i>	Base de données EST	Base de donnéesNCBI	Protéines	Espèce	E-valeur			
<b>Substrat solide</b>									
GlaB	Con1580_homo100- Con1580-4329		gil 2980896	GlaB (solid-specific glucoamyl)	<i>A. oryzae</i>	0	101	26	8/25
DppV			gil 5305698	Alanyl dipeptidyl peptidase	<i>A. oryzae</i>	0	167	29	16/40
Form	Con1345_gdraw-f6			Formamidase	<i>Emericella nidulans</i>	0	75	39	13/63
Man	Con0944_h_218			$\alpha$ -Mannosidase	<i>A. phoenisis</i>	0	65	28	
JZ2941		JZ002941		Transaldolase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	137	53	16/62
con1555	Con1555_h_1073			Probable d-amino acid oxidase	<i>S. pombe</i>	1.00E-26	62	19	7/15
con1454	Con1454_gdraw-f12			Hypothetical protein T04F3.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	2	61	61	7/36
con1393	Con1393_gdraw-r7	JZ004859		Unknown	<i>Pseudomonas syringae</i>	5	62	39	1/5
con1482	Con1482_gdraw_f6			Hypothetical ORF Yil105cp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1E-52	61	11	7/20
con1512	Con1512_gdraw-f3			Putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.00E-03	61	36	8/15
con0855	Con0855_gdraw-f1	JZ000734		Hypothetical protein PAB05188E-08	<i>Pyrococcus abyssi</i>	0.42	60	15	7/36
<b>Submergé</b>									
XynG2			gil 12082170	Xylanase G2	<i>A. oryzae</i>	0	62	34	2/5
GlaA	Con1350_e_3		gil 543806	GlaA (glucoamylase precursor)	<i>A. oryzae</i>	0	225	35	16/32
AgdA	Con1713_h_1547	JZ000452	gil 3023272	$\alpha$ -Glucosidase (AgdA)	<i>A. oryzae</i>	0	62	7	7/17
GtaA	Con0816_e_0		gil 6456478	Glutaminase A	<i>A. oryzae</i>	0	61	13	7/24
Lac	Con0970_h_248			$\beta$ -Galactosidase precursor	<i>A. niger</i>	0	69	8	9/28
CelB	Con1438_headtail- Con1438-3307-r1			1,4- $\beta$ -d-Glucanhydrolase B	<i>A. niger</i>	0	103	32	1/2
Chi	Con1459_gdraw-f6			Chitinase	<i>E. nidulans</i>	E-167	80	15	5/12
NagA	Con1525_headtail- Con1525-3904-f1			N-Acetylglucosaminidase	<i>E. nidulans</i>	0	60	18	4/15
rAsp f9	Con1553_gdraw-r4			rAsp f9	<i>A. fumigatus</i>	E-104	64	11	7/27
MreA			gil 10119790	Isoamyl alcohol oxidase	<i>A. oryzae</i>	0	64	8	5/7
Asp f13	Con1184_h_480			Allergen Asp f15 (Asp f13)	<i>A. fumigatus</i>	1.00E-37	63	18	3/8
<b>Substrat solide et submergé</b>									
TAA	Con1713_h_1548		gil 4139860	$\alpha$ -Amylasec	<i>A. oryzae</i>	0	108	25	11/83
Bgl	Con0854_h_130			$\beta$ -Glucosidasec	<i>A. aculeatus</i>	0	87	26	15/47
Ory	Con1418_h_836		gil 129234	Oryzin alkaline protease precursor	<i>A. oryzae</i>	0	66	24	3/20
XynF3	Con1587_e_6		gil 15823785	Xylanase F3	<i>A. oryzae</i>	E-130	105	57	3/20
AbfB	Con0723_h_62		gil 16754882	$\alpha$ -l-Arabinofuranosidase	<i>A. oryzae</i>	0	135	27	11/28
XynG1			gil 1945601	Xylanase G1	<i>A. oryzae</i>	0	61	29	5/32
CatB	Con1475_h_928	JZ002907		Catalase B	<i>A. oryzae</i>	0	149	23	12/25
XylA	Con1679_gdraw-r16			Xylosidase/arabinosidase	<i>Thermanaero bacter etha</i>	E-128	111	25	13/38

Dans une autre étude, Kang *et al.* (2013) ont montré qu'un milieu liquide basique complété par du galactose, du raffinose et de l'extrait de levure permet d'avoir une production maximale d' $\alpha$ -galactosidase par *A. parasiticus*.

Les champignons du genre *Aspergillus* produisent des métabolites secondaires qui agissent comme un système de défense chimique contre les prédateurs fungivores. Ceux-ci incluent des composés insecticides tels que les acides tétramiques, les terpénoïdes d'indole, les pyridones et les dicétopipérazines (Calvo & Cary, 2015). Une liste plus complète des métabolites secondaires d'*A. flavus* ayant servi de base à nos analyses est reprise en annexe.

## 5. Bactéries entomopathogènes

Les bactéries entomopathogènes, appartiennent aux familles des Bacillaceae et Enterobacteriaceae (Regnaut-Roger, 2005). Les principaux groupes ont été synthétisés dans la thèse de Bawin 2016. La plus connue est *Bacillus thuringiensis* car elle a fait l'objet de développement de plusieurs produits commerciaux. Cette espèce produit des toxines sous forme de cristaux lors de la sporulation. Les préparations commerciales contiennent directement le principe actif (Chaufaux, 1989).

Lors de ce travail de fin d'étude, nous nous sommes intéressés à une famille de la classe des Actinobactéries, les *Streptomycetaceae*.

Les Actinobactéries produisent des substances naturelles qui sont beaucoup utilisées pour traiter des maladies infectieuses (Pazhanimurugan *et al.*, 2016). Ce sont des bactéries gram-positives qui forment des filaments (Tobias Kieser *et al.*, 2000). A ce jour, il existe plus de 500 espèces de *Streptomyces*. Plus de 13 700 métabolites provenant de cette classe ont été découverts depuis 1940 (Pazhanimurugan *et al.*, 2016).

Elles sont connues pour leurs applications dans le secteur médical puisqu'elles produisent des antibiotiques (streptomycine produite par *Streptomyces griseus*). Dans le secteur agricole, Sousa & Olivares (2016) mentionnent le potentiel de *Streptomyces* à améliorer la croissance des plantes. En effet, ces bactéries produisent des métabolites qui ont des propriétés phytohormonales et permettent de stimuler la croissance des plantes. Pour exemple, citons les travaux effectués sur *Streptomyces* spp. produisant de l'acide indole-3-acétique pour favoriser la croissance de *Arabidopsis thaliana* (Lin & Xu, 2013).

En conditions environnementales favorables, les spores de *Streptomyces* spp. germent et produisent des hyphes dont la structure est semblable à celle des mycéliums de champignons. Si la bactérie est soumise à un stress, une différenciation cellulaire a lieu et donne des hyphes aériens. Ces hyphes aériens produisent les spores pour assurer la future génération (Tobias Kieser *et al.*, 2000). Ce cycle est représenté dans la Figure 4 ci-dessous.

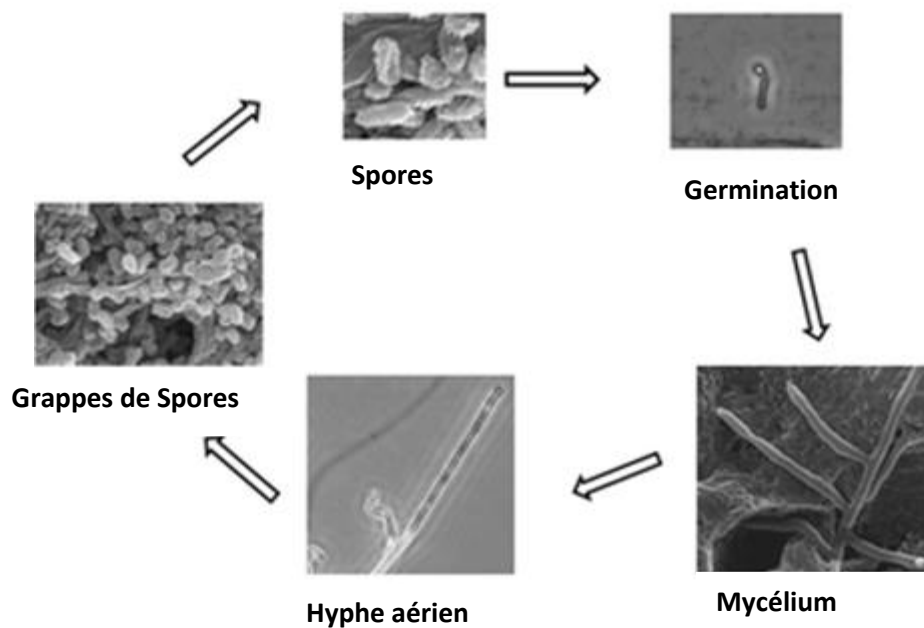


Figure 4 Cycle de vie du *Streptomyces* (Sousa & Olivares, 2016)

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à une souche de *Streptomyces albus*. Des propriétés insecticides de cette espèce ont été mises en évidence contre le puceron du coton *Aphis gossipi* (Shi *et al.*, 2013). De nombreux composés à propriétés insecticides sont produits par le genre *Streptomyces* incluant des antibiotiques aminoglycosides (mycines), des composés organiques macrocycliques (avermectines), spinosine (Lacey, 2017).

La souche utilisée dans notre travail a été isolée à partir de sol au Japon. C'est une souche reconnue non pathogène et capable de produire de la salinomycine et de la salbostatine. La salbostatine est un précurseur biochimique de la validamycine bien connue pour ses propriétés biologiques (Catalogue ATCC, 2016).

La validamycine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides produit par *Streptomyces hygroscopicus* var. *Limoneus* ou *S. hygroscopicus* var. *Jinggagensis*. Quant à la souche de *Streptomyces albus* que nous étudierons, elle produit une 2 *epi*-5-*epi*-valiolone qui est un précurseur de la validamycine et d'autres produits naturels contenant du C<sub>7</sub>-N-aminocyclitol (Choi *et al.*, 2008). Il existe différentes formes de validamycine : A, B, C, D, E, F. La validamycine A est la plus active. Elle a été utilisée comme antifongique pour lutter contre *Rhizoctonia solani* chez le riz. En effet, la validamycine a une structure proche du tréhalose et agit comme un inhibiteur de tréhalase. La formule chimique de la validamycine A est la suivante : [1L-(1,3,4/2,6)-2,3-dihydroxy-6-hydroxyméthyl-4-[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxyméthylcyclohex-2-enylamino]cyclohexyl]-D-glucopyranoside. Elle a une masse molaire de 497,5 g/mol (Chen *et al.*, 2017; Hsiao & Lo, 1999). Outre son excellent effet de

contrôle, son bas prix, une faible résistance aux médicaments et une faible toxicité sont les autres mérites remarquables de la validamycine. C'est maintenant l'un des antibiotiques agricoles les plus importants en volume de production en Chine (Chen *et al.*, 2017).

La validamycine possède un bon nombre de dérivés à propriétés thérapeutiques, parmi ceux-ci, la valienamine, la validamine, l'hydroxyvalidamine, la valioline et le voglibose (Figure 5). Ce dernier est connu pour lutter contre l'hyperglycémie ou le diabète. La valienamine peut être synthétisée sous forme N-octyl-4-epi- $\beta$ -valienamine et en N-octyl- $\beta$ -valienamine. Ces deux substances agissent contre les troubles de déficience en  $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -glucosidase (Chen *et al.*, 2017).

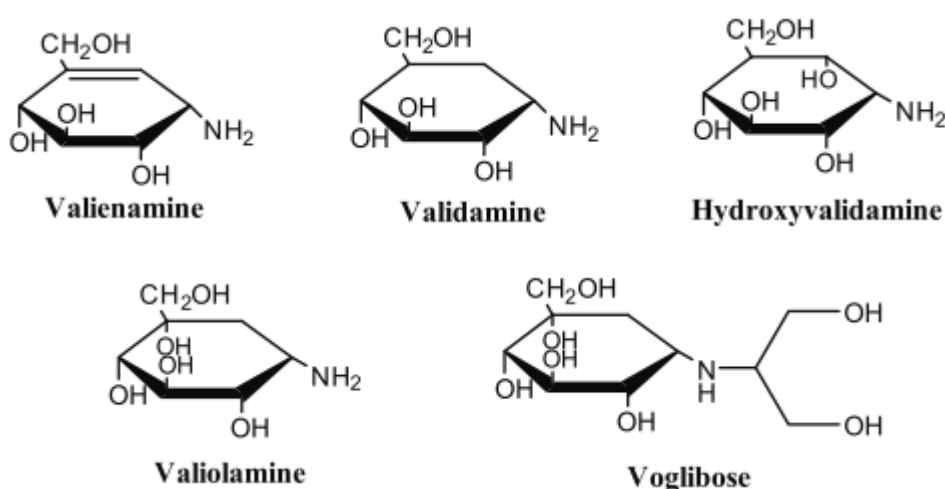


Figure 5 Structures chimiques de la valienamine et de ses dérivés (Chen *et al.*, 2017).

Il existe différentes méthodes de mise en évidence et de dosage de la validamycine. La première est la méthode biologique qui permet de mettre en évidence l'efficacité antifongique de la validamycine. Les autres sont des méthodes chimiques qui permettent de mesurer directement la validamycine ou indirectement des composés liés à sa biosynthèse. Les méthodes directes sont la chromatographie gazeuse après avoir transformé la validamycine en composé volatile triméthylesilylé et l'HPLC en utilisant des résines échangeuses d'ions. Une autre méthode proposée par Jin He *et al.* (2003), est l'électrophorèse capillaire couplée à une détection par spectrophotométrie UV, technique qui permet de doser les différents composés de la famille des validamycines. Parmi ces méthodes, la plus utilisée est la high performance liquid chromatography (HPLC) (Guirao-Abad *et al.*, 2013; He *et al.*, 2003; Hsiao & Lo, 1999; Li *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Il est possible également d'analyser indirectement la validamycine A par spectrophotométrie d'absorption à 450 nm. En effet, certaines espèces de *Streptomyces* sécrètent des pigments qui sont produits lors de la biosynthèse de la validamycine A (Li *et al.*, 2016).

## 6. Conditions de cultures de ces micro-organismes

La culture à grande échelle de micro-organismes peut se faire selon différentes technologies en fonction de la souche et de ses exigences nutritives et environnementales :

La culture submergée où le micro-organisme est produit dans un réacteur en milieu liquide

La culture en milieu semi-solide où le micro-organisme est produit sur un milieu solide

La culture sous forme de biofilm où le micro-organisme s'attache à un support biotique ou abiotique.

Les deux premières technologies sont bien connues. Mais il faut signaler que dans une culture submergée, les micro-organismes filamenteux forment des agrégats (pellets) qui peuvent atteindre parfois plusieurs centimètres de diamètre. Ce qui mène à un état physiologique hétérogène. La croissance ne se produit qu'en surface de l'agrégat mycélien en raison de l'indisponibilité des éléments nutritifs dans la région centrale (Braun & Vecht-Lifshitz, 1991) . Différents facteurs affectent la quantité et la forme de ces pellets : le type et la concentration du substrat carboné, la concentration en azote et en phosphate, la nature et la concentration des oligo-éléments, la concentration en oxygène dissous, la concentration en dioxyde de carbone, la concentration en inoculum, le pH et la température du milieu, la géométrie du fermenteur, les systèmes d'agitation, la rhéologie (Papagianni, 2004).

La technologie du biofilm fait de plus en plus l'objet d'études approfondies. Elle est intéressante car elle permet de combiner les avantages de la culture en milieu semi-solide et le contrôle des conditions opératoires de la culture submergée. Elle permet une récupération plus aisée des métabolites (Zune *et al.*, 2015).

La formation de biofilm peut se faire selon 3 processus différents :

- par agrégation de cellules individuelles (Figure 6a),
- par fission cellulaire incomplète après division cellulaire pour produire des chaînes de cellules (caractéristiques des cyanobactéries filamenteuses) (Figure 6b),
- par formation de filaments syncytiaux (Figure 6c).

Pour l'agrégation de cellules individuelles, le micro-organisme adhère à une surface biotique ou abiotique. Ensuite, Une série de substances diverses (des exopolysaccharides, des fibrilles amyloïdes, des acides nucléiques, des lipides) sont excrétées pour former une matrice extracellulaire. Cette matrice va permettre aux cellules de s'agglutiner et va créer une barrière pour l'environnement Cette barrière exclut les substances toxiques (comme les antibiotiques) et conserve l'eau et les enzymes proches de la surface de la cellule. Pour

terminer, les cellules peuvent se détacher et se disperser pour reformer un nouveau biofilm (Tremblay *et al.*, 2014) (Figure 6a). La fission cellulaire incomplète conduit à la formation de chaînes ou de grappes de cellules. La fragmentation de ces agrégats peut conduire à la formation de nouvelles propagules (Figure 6b). L'arrêt de la division cellulaire conduit à la formation de cellules filamenteuses et syncytiales. La croissance sans séparation de cellule se poursuit par des septations et des ramifications. Les nouvelles propagules sont formées par fragmentation (Figure 6c) (Claessen *et al.*, 2014).

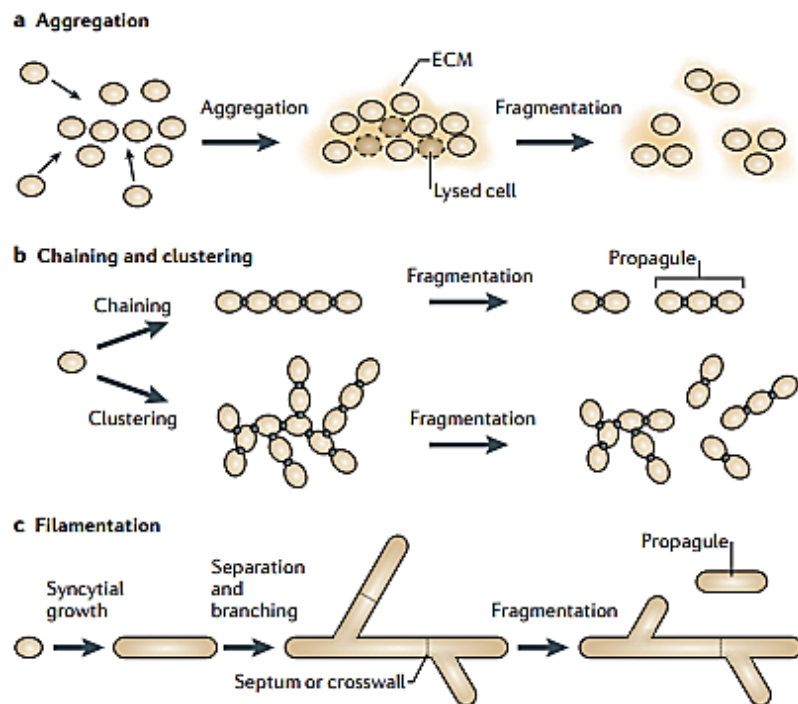


Figure 6 Développement d'un biofilm selon différents processus (Claessen *et al.*, 2014)

Bien que suivant un schéma de développement différent de celui décrits au niveau de la figure 6, les moisissures et les bactéries filamenteuses sont bien adaptées à ce mode de développement (Harding *et al.*, 2009).

Le biofilm peut présenter des inconvénients dans des infections bactériennes et engendrer des difficultés de traitement en santé animale à la ferme à l'abattoir ou dans des usines de transformation agroalimentaire (Tremblay *et al.*, 2014). Par contre, cette technologie de formation de biofilm peut être exploitée à l'échelle pilote ou semi-industrielle pour produire des métabolites d'intérêt en combinant les avantages déjà cités précédemment de la culture semi solide et de la culture submergée. C'est ainsi que Zune *et al.* (2015) ont réussi à extrapoler les conditions rencontrées dans une fiole avec un support métallique à un bioréacteur de deux litres muni d'un packing. Un système de circulation continu de milieu nutritif a permis l'apport d'oxygène et d'éléments nutritifs à *A. oryzae*

pour produire et améliorer la qualité d'une protéine de fusion excrétée. Khaledi *et al.* (2014) ont montré que *Trichoderma reesei*, cultivé selon les mêmes modes de production que celles de Zune *et al.* (2015), produit plus d'hydrophobine HFBII en culture sous forme de biofilm qu'en culture submergée classique. Une étude de Bawin *et al.* (2014) a prouvé que les métabolites secondaires produits en biofilm par *A. flavus* présentaient une efficacité contre les moustiques supérieure à ceux de la culture submergée.

### III. Objectif général

L'objectif général de ce travail est le développement d'insecticides microbiens destinés à lutter contre les moustiques. Il s'insère dans le cadre général des recherches menées par les laboratoires d'Entomologie fonctionnelle et évolutive et de « Microbial, food and biobased technologies ». Le moustique cible est *Culex quinquefasciatus*. C'est une espèce invasive, vecteur de maladies pour l'homme et les animaux. Son élevage est bien maîtrisé.

Des études antérieures ont mis en évidence l'efficacité des spores de deux champignons *A. flavus* et *A. oryzae* contre ce moustique (Bawin *et al*, 2015). Selon ses résultats, la virulence varie avec l'espèce et le mode de production des spores. Il a en effet été démontré que les spores d'*A. flavus* étaient plus efficaces que celles d'*A. oryzae* surtout si elles étaient produites sous forme de biofilm. Différentes hypothèses ont été émises quant au mode d'action et à la production de métabolites toxiques. De plus, d'autres travaux ont montré aussi l'intérêt du biofilm pour la production de protéines recombinantes par *A. oryzae*. Notre travail, basé sur ces différents résultats et hypothèses a pour but de poursuivre ces investigations en analysant les métabolites microbiens produits en relation avec leur efficacité et leurs conditions de culture : submergée et en biofilm. Les différentes étapes à réaliser seront donc :

- La production de ces deux champignons en culture submergée et en biofilm,
- la mesure de l'efficacité insecticide des surnageants de culture,
- l'analyse des métabolites secondaires produits,
- l'analyse protéomique des protéines excrétées.

D'autre part, un autre micro-organisme, la bactérie filamenteuse *Streptomyces albus* a également été retenue. Cette souche est filamenteuse et donc apte à être cultivée en biofilm. Elle est capable de produire de la validamycine, antibiotique connu pour ses propriétés antifongiques.

Pour cette bactérie, les étapes à réaliser seront :

- la production en culture submergée et en biofilm,
- la mesure de l'efficacité insecticide de ces préparations,
- la recherche de la présence de validamycine dans les surnageants.

Les analyses des métabolites secondaires et de la validamycine seront réalisées à l'université de Gand dans le « Department of Bioanalysis in Laboratory of Food Analysis ». L'analyse protéomique sera réalisée à Gembloux Agro-BioTech dans le laboratoire d'Entomologie fonctionnelle et évolutive et au Giga.



## IV. Matériel et méthodes

### 1. Elevage des moustiques

Le moustique *Culex quinquefasciatus* Say, souche S-lab, est originaire de Riverside en Californie aux Etats-Unis et a été fourni par le Professeur Mylène Weill (Génétique de l'adaptation, Université de Montpellier II en France).

Les adultes sont élevés à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  avec une humidité relative de  $70 \pm 5\%$  et une photopériode de 16 heures, dans des cages de 50 x 50 x 50 cm (Bug Dorm, Megaview Science, Taïchung, Taiwan). Ils sont nourris avec des éponges imprégnées d'une solution de sucrose à 10%.

Les adultes femelles sont exposées une à trois fois par semaine à un repas sanguin pour assurer leur reproduction. Trois à cinq jours après le repas sanguin, l'oviposition se produit dans un point d'eau mis à disposition dans la cage. Les œufs sont ensuite récoltés et disposés dans un récipient (25 x 15 cm) rempli d'eau distillée.

Les larves sont nourries 2 à 3 fois par semaine avec un aliment pour poisson réduit en poudre (TetraMin, Tetra, Blacksburg, USA) et de la levure de bière (Biover, Brugge, Belgique). L'eau est remplacée à raison d'une fois par semaine pour éviter l'asphyxie et les infections.

Les nymphes sont prélevées à l'aide d'une pipette et transposées dans un petit récipient placé dans la cage à adultes où aura lieu l'émergence des adultes.

### 2. Culture d'*Aspergillus flavus* Link et *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) E. Cohn

*A. flavus* (numéro d'accès MUCL 55276) a été isolé des larves d'*Agriotes lineatus* (L.) (Coleoptera: Elateridae). La souche d'*A. oryzae* provient d'une transgénèse entre *A. oryzae* ATCC16868pyrG, connue pour exprimer sa production de glucoamylase, (Te Biesebeke *et al.*, 2002) et un plasmide pAB4.1 comme source de marqueur de sélection (Hartingsveldt *et al.*, 1987).

Les deux espèces d'*Aspergillus* sont cultivées de la même manière. Elles sont maintenues sur un milieu potato dextrose agar (PDA) en boîte de pétri à  $30^\circ\text{C}$ . Les spores sont mises en suspension, en raclant les cultures fraîches, dans de l'eau distillée avec du tween 80 à 10% et du NaCl 8,5g/L. La concentration en spores est estimée par l'utilisation de cellule de burker. Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL ( $121^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes), chacune contenant 100 mL de milieu « yeast extract peptone dextrose » (YPD) dont la composition est : 10 g/L d'extrait de levure, 10 g/L de peptone de

caséine, 20 g/L de glucose. Le tout est autoclavé à 121°C pendant 20 minutes avant inoculation des spores à environ  $10^6$  spores/ 100 mL de milieu.

Deux types de cultures sont réalisées : en conditions submergées en fioles classiques et en conditions de formation de biofilm en fioles munies d'un support partiellement immergé. Ce support est composé de deux morceaux en acier inoxydable poreux Imax 316 (Zulser, Winterthour, Suisse) de 70 mm x 60 mm disposés en opposition et attaché à l'aide de colson (100 mm x 2,5 mm). Les cultures sont mises dans un agitateur rotatif à 30°C et à 125 rpm pendant 5 jours. La biomasse est retirée à l'aide d'un filtre MN 615 (MACHEREY-NAGEL®). Le liquide de culture est ensuite filtré avec un filtre seringue stérile de taille de pores de 0,22 µm (Sigma-Aldrichh Millex® GV) pour éliminer toutes les spores et les filaments mycéliens. Enfin, le filtrat est stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

### **3. Culture de *Streptomyces albus* (Rossi-Doria) Waksman & Henrici**

La culture de *Streptomyces albus* ATCC21838 est réalisée dans les mêmes conditions générales que les cultures d'*Aspergillus* (2 mêmes modes de productions). Seuls les milieux de cultures et le support diffèrent. Le support est composé d'un morceau en acier inoxydable 316L (Zulser, Winterthour, Suisse) de 150 mm x 70 mm. Cette bactérie est cultivée en boîte de pétri sur un milieu contenant 4g de glucose, 4g d'extrait de levure, 10g d'extrait de malt, 2g de CaCO<sub>3</sub>, 15g d'agar pour 1L d'eau distillée à un pH 7,2. Pour la culture en milieu liquide, le même milieu est utilisé, mais sans l'agar et le CaCO<sub>3</sub>. Les fioles sont également inoculées avec  $10^6$  spores/ 100mL de milieu.

### **4. Test de toxicité**

Les tests de toxicité sont conduits selon les méthodes préconisées par l'organisation mondiale de la santé (2005). Seuls les filtrats débarrassés de la biomasse microbienne sont utilisés, tels quels ou dilués dans de l'eau distillée.

Les conditions de température, humidité et lumière sont similaires à celles de l'élevage. Les différentes concentrations (v/v) testées pour *A. flavus*, *A. oryzae* et *S. albus* sont respectivement : 1% - 2% - 4% - 6% - 8% - 10% ; 10% - 50% ; 10% - 20% - 30% - 50%. La gamme de concentrations testées avec *A. flavus* est plus restreinte car ce micro-organisme a déjà fait l'objet d'expérimentations plus approfondies (communication orale T. Bawin).

Pour chaque essai, un groupe témoin est mis en contact avec de l'eau distillée.

Dix larves de *Cx. quinquefasciatus* de stades 3 sont placées dans 50 mL du milieu liquide à tester. Trois répétitions sont réalisées pour chaque dilution testée. Les larves mortes sont comptées et retirées du milieu après 24, 48 et 72 heures d'exposition. Le test est refusé quand il y a plus de 20% de mortalité et plus de 10% de larves qui deviennent nymphes dans le groupe témoin.

## **5. Analyse protéomique**

### **5.1. Extraction des protéines**

Les surnageants des deux espèces d'*Aspergillus* produit dans les deux conditions de cultures et le milieu seul sont filtrés en utilisant des falcons d'ultrafiltration Vivaspin (Sartorius®) d'une masse moléculaire de 10kDa pour éliminer les peptides non consommés du milieu de culture. Les protéines concentrées sont ensuite suspendues dans une solution de tampon phosphate à 100 mM (pH 6.5). La quantification des protéines de chaque échantillon est effectuée à l'aide du kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad, Hannover, Allemagne®).

### **5.2. Electrophorèse 2D-dige.**

Un 2D-DIGE (2-Dimensions Difference gel electrophoresis) est une méthode d'analyse protéomique permettant de comparer différents échantillons de protéines à l'aide de colorants fluorescents appelé CyDye (Lumiprobe®). Cette analyse protéomique sépare les protéines selon leur point isoélectrique mais aussi selon le poids moléculaire. Cette méthode permet de donner des informations qualitatives mais aussi quantitatives sur les protéines des échantillons.

#### ***5.2.1. Préparation des échantillons et marquages à l'aide de CyDye***

La concentration de tous les échantillons est ajustée à 5µg/µL par ajout d'UT-Tris et au pH de 8-8,5 à l'aide de NaOH 100mM. Des fractions égales des cinq échantillons de protéines du jus de fermentation (correspondant aux deux espèces d'*Aspergillus* selon les deux modes de culture et le milieu) sont mélangées et marquées avec Cy2 pour former un standard de référence interne. Chacun des échantillons sont chacun marqués alternativement avec les deux CyDye (Cy3 et Cy5) à raison d'1µL de marqueur (200pmole/µL) pour 25µg de protéines. Ensuite, ils sont comparés par paire. Un mélange protéines comprend deux échantillons de protéines marquées l'un avec Cy3 et l'autre avec Cy5 ainsi

qu'un standard de référence interne marqué. Un excès de protéines (125 µg) est ajouté à un mélange de protéines quelconque afin de former un gel préparatif sur lequel les spots de protéines seront prélevés pour l'analyse d'identification. Dix gels sont donc réalisés.

### **5.2.2. Première dimension**

Les mélanges de protéines marquées sont ajustés à un volume de 450 µL et sont mélangés avec 5mL d'huile minérale pour réaliser l'électrophorèse à l'aide d'un Protean i12™ IEF Cell (Bio-Rad®) pendant 5h50 à 25-30°C en présence de bandes de polyacrylamide (bandes ReadyStrip IPG, BIO-RAD) de 24 cm avec un gradient de pH qui varie entre 3-10 non linéaire. Les protéines vont migrer sur les bandes de polyacrylamide. La programmation se détaille en cinq étapes :

- Première étape : 28 mA à une tension de 100 V et à une puissance de 4 W pendant 30 minutes
- Deuxième étape : 52 mA à une tension de 200 V et à une puissance de 12 W pendant 30 minutes
- Troisième étape : 80 mA à une tension de 300 V et à une puissance de 20 W pendant 10 minutes
- Quatrième étape : 160 mA à une tension de 1500 V et à une puissance de 120 W pendant 3h50
- Cinquième étape : 180 mA à une tension de 1500 V et à une puissance de 160 W pendant 50 minutes.

Par après, ces bandes IPG sont rincées avec de l'eau distillée et mises à l'obscurité pendant 15 minutes dans une solution de dithiothreitol (DTT) (pour 4 gels : 200 g DTT, 7.2 g d'urée, 20mL de tampon d'équilibration), pour une phase de réduction, dans un premier temps et dans une solution d'iodoacetamide (IAA) pendant 15 minutes (pour 4 gels : 500 g d'IAA, 7.2 g d'urée, 20 mL de tampon d'équilibration), pour une phase d'alkylation, dans un deuxième temps.

### **5.2.3. Deuxième dimension**

Ces bandes IPG sont ensuite mis en contact avec un Gel large 2D HPE NF 12,5% (Serva). Les protéines se trouvant sur la bande IPG migrent ensuite sur le gel selon leur poids moléculaire grâce à un high performance electrophoresis (HPE) FlatTop Tower (Gelcompany, Heidelberg, Allemagne). Cette HPE suit un programme de cinq étapes (Tableau 5).

Tableau 5 Conditions de migration (en journée) des protéines selon leur poids moléculaire.

Etapes	Voltage	Courant	Puissance	Temps
1	100 V	28 mA	4 W	30 min
2	200 V	52 mA	12 W	30 min
3	300 V	80 mA	20 W	10 min
4	1500 V	160 mA	120 W	3h50
5	1500 V	180 mA	160 W	50 min

Ensuite, les gels sont mis dans une solution de 15% d'éthanol et 10% d'acide acétique pendant 4 heures pour fixer les protéines. Après ces 4 heures, ils sont conservés dans une solution à 10% d'acide acétique.

Les gels sont scannés avec un scanner de fluorescence Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) à des expositions correspondant à chaque CyDye (Cy2 : 0,6 ; Cy3 : 0,6 ; Cy5 : 0,4). Les images sont analysées avec le logiciel Ettan DIGE imager 1.0 (GE Healthcare).

### 5.3. Identification des protéines.

Les spots de protéines sélectionnés avec Progenesis SameSpots (Dynamique non linéaire, Newcastle, UK). Ce programme localise automatiquement les spots de protéines contenus sur les gels. Il compare le signal des spots similaires parmi les différents gels. Lorsque la différence entre les échantillons était significative ( $p < 0,05$ ), les spots de protéines sont sélectionnés pour une analyse plus approfondies. Les spots sont échantillonnés manuellement sur le gel préparatif coloré au bleu de Coomassie à l'aide « Screen picking » (Proteomic consult, Kampenhout, Belgique). Chaque spot excisé est placé dans un puits d'une plaque à 96 puits et recouverte de 50  $\mu$ L d'eau distillée. La plaque est stockée à 4 ° C jusqu'à ce qu'elle soit envoyée au Giga (Université de Liège) pour l'identification.

La digestion du gel par la trypsine est réalisée dans un format de plaque à 96 puits sur la station de travail Janus (Perkin Elmer). Les analyses PMF (peptide mass fingerprinting) et MS/MS (mass spectrometry) sont effectuées sur un Ultra-Xtreme (Bruker) MALDI-TOF-TOF-MS. L'acquisition automatique des spectres est mise à l'essai avec le contrôle logiciel Flex control™ 3.4 et l'analyse en temps réel par Flex analysis™ vs 3,4 (Bruker). La recherche sur les bases de données est gérée en temps réel avec BioTools™ vs 3.2 (Bruker) sur le serveur Mascot vs2.2.06.

La recherche est exécutée avec la base de données SwissProt sur les champignons avec 100 ppm de tolérance d'erreur de masse dans MS et MS/MS. Une deuxième recherche est

effectuée avec les mêmes données sur la base de données NCBI sans restriction taxonomique.

Les scores des protéines sont jugés suffisantes lorsqu'ils ont atteint 45 ou plus. Les points isoélectriques (pI) et les masses moléculaires des protéines suggérées sont comparées à la localisation des spots excisées sur les gels. Pour affiner l'identification de plusieurs protéines, une recherche avec BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a été effectuée. Le BLAST permet d'élargir ou de rétrécir la base de données utilisée afin de trouver une protéine similaire retrouvée dans un organisme plus proche génétiquement d'*Aspergillus*. Plusieurs paramètres sont prendre en compte pour choisir une protéine : la masse moléculaire, le pI, le pourcentage d'identification (le pourcentage de similarité) et la valeur E (probabilité que l'identification soit faite par hasard). Le rôle de chaque protéine identifiée est recherché sur

## **6. Analyse métabolomique des jus de fermentation d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus oryzae*.**

Dix mL d'échantillon sont placés dans un tube falcon de 50 mL. Quinze mL d'acétonitrile (ACN) sont ajoutés au tube qui est vortexé pendant 2 min. Un mélange de sels (4 g de MgSO<sub>4</sub> et 1 g de NaCl) est ajouté et le tube est vigoureusement secoué à la main pendant 1 min et par vortex pendant 2 min. Ensuite, il est centrifugé à 4500 tr / min pendant 5 minutes et 5 mL du surnageant sont transférés dans un tube en verre. L'échantillon est évaporé à sec sous un courant doux d'azote. Le tout est remis en suspension avec 250 µL de MeOH / ACN / H<sub>2</sub>O (30:30:40, v / v / v) et centrifugé dans un dispositif de centrifugation Ultrafree-MC<sup>®</sup> pendant 5 min à 14 000 g. Enfin, l'extrait est transféré dans un flacon LC-MS.

La séparation chromatographique est réalisée par un système FTN UPLC classe 1 (Waters, Manchester, Royaume-Uni) en utilisant un ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (1,8µm, 3,1 x 100mm). La phase mobile est constituée d'H<sub>2</sub>O:MeOH (99 :1, v/v) contenant 0,05% HCOOH et 5mM d'HCOONH<sub>4</sub> (solvant A) et MeOH (solvant B). Un programme d'élution en gradient est appliqué comme suit : 0-0,5 min : 5% B, 0,5-20 min: 5-95% B, 20-21 min: 95% B, 21-24 min: 95-5% B, 24 -28 min: 5% B. Le débit est de 0,3 mL / min. La température de la colonne est réglée à 40 ° C et la température de l'échantillonneur automatique est de 10 ° C. Cinq microlitres de l'échantillon sont injectés.

Les analyses de spectrométrie de masse (MS) sont réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse à haute définition hybride quadripôle Synapt G2-Si HDMS (Waters), équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). Les données sont acquises en polarité positive (ESI+) et négative (ESI-) en mode résolution (>20 000 FWHM). Les paramètres MS sont les suivants : une tension capillaire de 2,8 kV en mode positif et -1,5 kV en mode négatif; une tension de cône d'échantillon de 30 V; une température de source de

150 ° C; un flux de gaz de désolvatation de 800 L / h chauffé à une température de 550 ° C et un débit de gaz cône de 50 L / h. L'azote est utilisé comme gaz de désolvatation. L'argon est utilisé comme gaz de collision à une pression  $9,28 \times 10^{-3}$  mbar. L'instrument est calibré à l'aide de formiate de sodium. Au cours de l'analyse MS, une solution de leucine-encéphaline (200pg/ $\mu$ L) a été infusée en continu dans le spectromètre de masse à un débit de 20  $\mu$ L/min, générant l'ion de référence ( $[M+H]^+$  = 556,2771 ;  $[M-H]^+$  = 554,2615) utilisé pour la correction de masse. Les spectres de masse sont collectés en mode continu de 50 à 1200 m/z avec un temps de balayage de 0,1s, un délai de balayage inter-scan de 0,01 s et une fréquence de verrouillage de 20 secondes. Un mode d'acquisition dépendant de la donnée est mis en place pour obtenir l'acquisition simultanée de données de masse exactes pour les ions. Les cinq premiers ions sont sélectionnés pour MS/MS à partir d'un seul examen de l'enquête MS. Le temps de balayage pour MS/MS est de 0,2 secondes. L'énergie de collision dans la cellule du piège est ramenée à partir de 10/15 V (faible masse, début/fin) jusqu'à 60/150V (masse élevée, début/fin). Le contrôle des instruments et le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel Masslynx 4.1 (Waters).

## 7. Analyse de la validamycine

Deux standards sont utilisés : un standard interne, le deepoxy-deoxynivalenol (Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Allemagne) et la validamycine A (...). Les solutions standards sont préparées dans du méthanol (MeOH) à une concentration de 1mg/mL et stockées à -18°C.

Les solvants sont de grade LC-MS : acétate d'ammonium (Sigma Aldrich), acétonitrile et méthanol (Biosolve chimie, Dieuze, France). De l'eau ultrapure (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA, USA) est utilisée durant l'analyse. Une filtration des échantillons est effectuée à l'aide d'un filtre centrifuge avec membrane Durapore® de 0,22  $\mu$ m (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) avant leur injection dans le système chromatographique.

La séparation chromatographique est obtenue à l'aide d'un système UPLC (gestionnaire de solvants binaires, passeurs d'échantillons automatiques) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La colonne de chromatographie liquide à interaction hydrophile (Waters Acquity BEH) est de dimensions : 100 mm  $\times$  2,1 mm, 1,7  $\mu$ m. La phase mobile est constituée d'acétonitrile (solvant A) et d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 2mM (solvant B) à un débit de 0,3 mL/min. Le profil du gradient d'éluant est le suivant : 0 min : 90% B; 2 min: 85% B; 4 min: 85% B; 4,1 min: 90% B et 5 min: 90% B. La température de la colonne est de 45°C et le volume d'injection est de 5 $\mu$ L.

Les mesures de spectrométrie de masse sont effectuées sur un spectromètre de masse triple quadripôle (Waters Xevo TQ-S) équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). Le spectromètre de masse a fonctionné en mode ESI positif dans les conditions de surveillance à réaction multiple indiquées dans le Tableau 6.

Tableau 6 Paramètres MS pour l'acquisition en mode « multiple reaction monitoring ».

Compound	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Cone energy (V)	Collision energy (eV)
DOM*	281.1	215.1	40	9
	281.1	233.1	40	9
Validamycin	498.2	178.0**	70	25
	498.2	318.0	70	20
	498.2	340.0	70	20

Les paramètres de la source d'ionisation sont les suivants : tension capillaire de 3,5 kV ; température de la source de 150°C ; gaz nébuliseur (azote) 7 bars; tension de décalage de source 60V ; un débit de gaz de 150 L/h et une température de désolvatation du gaz réglée à 350°C avec un débit de 550L/h. Un ion précurseur est sélectionné et au moins deux ions produits (l'ion le plus abondant est utilisé pour la quantification et les autres utilisés pour la confirmation) sont surveillés. Les données sont collectées à l'aide du logiciel MassLynx® version 4.1 (Waters). La préparation de l'échantillon est basée sur l'approche dilute-and-shoot. L'échantillon est dilué avec une quantité égale d'eau avant l'analyse de la LC-MS.

Les droites d'étalonnage obtenues avec les différentes concentrations des standards préparés sont reprises à la Figure 7 :

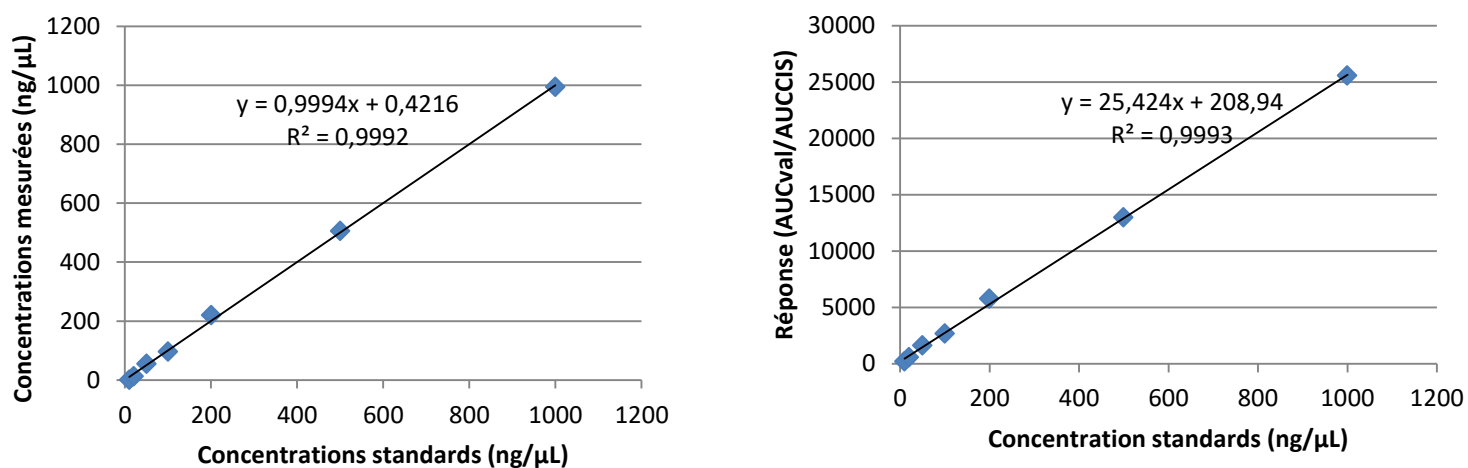


Figure 7 Droites d'étalonnage établies lors de la mise au point du dosage de la validamycine.



## 8. Analyses statistiques

L'analyse de Kaplan-Meier avec une comparaison par paire sur le test log-rank a été utilisée pour vérifier les différences de survie chez les larves exposées aux métabolites produits par *S. albus* en culture submergée pendant la période de traitement de 48 heures avec un relevé du taux de mortalité toutes les 6 heures (Butt *et al.* 2013).

Pour évaluer les concentrations létales (CL10, CL50 et CL90), les proportions de mortalité corrigées (Abbott, 1925) ont été linéarisées à l'aide de la transformation logit (Dagnelie, 1970):  $\text{logit}(P) = \ln(P / 1-P)$ . Une régression linéaire simple a été utilisée pour modéliser la relation entre la mortalité transformée par logit et les valeurs transformées par logarithme des concentrations fongiques comme variable explicative:  $\text{logit}(P) = \text{pente} \times \ln(\text{concentration}) + \text{interception}$ . La relation entre la mortalité larvaire et les concentrations de spores a été évaluée en fonction de la distribution de Snedecor-F et des valeurs p.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Minitab® v.16 (<http://www.minitab.com/frFR/default.aspx>). Pour tous les tests, le seuil significatif était  $p < 0,05$ .

## V. Résultats

### 1. Biomasse microbienne

#### 1.1. Mesure de la biomasse produite par les deux espèces d'*Aspergillus*.

La matière sèche produite par *A. flavus* en culture submergée est en moyenne de 1,04 g pour 100 mL de milieu après 5 jours. En biofilm, elle est de 1,16 g. Les rendements en matières obtenues sont donc respectivement de 0,52 g et de 0,58 g/g de source de carbone puisque le milieu initial contient 2 g de glucose pour 100 mL.

La matière sèche produite par *A. oryzae* en culture submergée se situe en moyenne à 0,61 g pour 100 mL de milieu après 5 jours ; en biofilm, elle est de 0,55 g. Les rendements en matières obtenues sont donc respectivement de 0,30 g et de 0,27g/g de source de carbone puisque le milieu initial contient 2 g pour 100 mL de matières sèches (Figure 8).

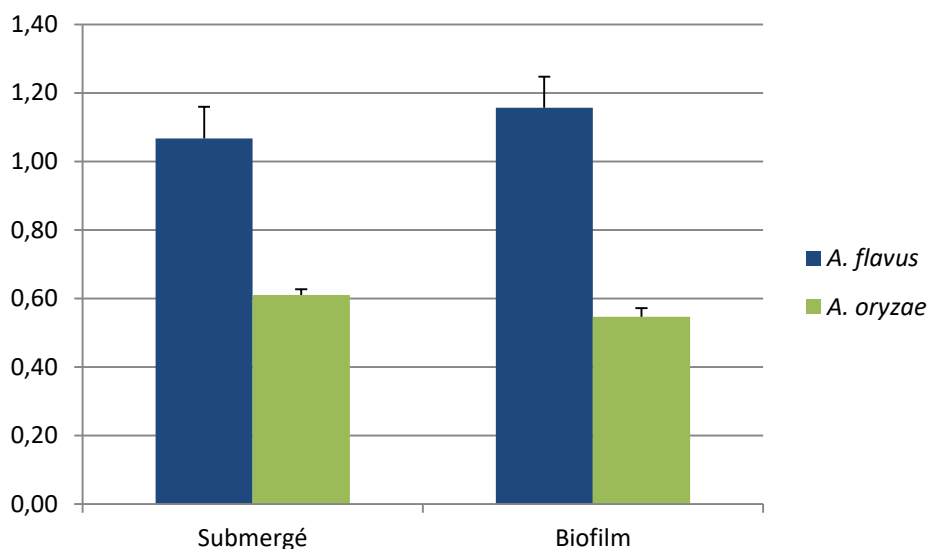


Figure 8 Biomasse produite par *A. flavus* et *A. oryzae* après 5 jours selon les deux modes de culture, pour 100 mL de milieu.

#### 1.2. Mesure de la biomasse produite par *Streptomyces albus*

La matière sèche produite par *Streptomyces albus* en culture submergée se situe au maximum à 0,47 g qui est aussi égal à 0,47 g / g de source de carbone (100 mL de milieu contient 1 g de glucose + maltose), elle diminue si la culture est prolongée au-delà de 3 jours. En biofilm, elle est de 0,45 g/g de source de carbone pour 4 jours (Figure 9).

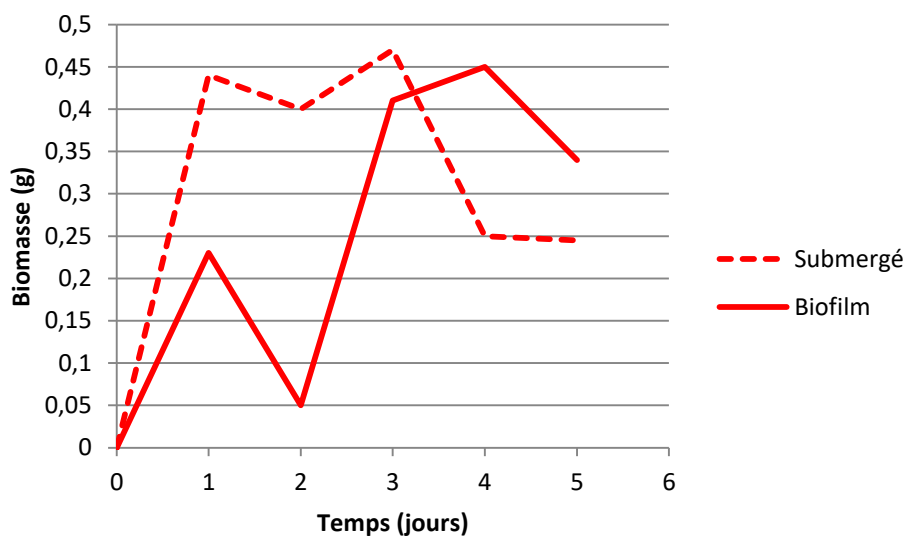


Figure 9 Evolution de la biomasse produite par *S. albus* en fonction du temps selon les deux modes de culture, pour 100 mL de milieu

## 2. Tests de toxicité

Tous les tests de toxicité ont été réalisés avec les surnageants de culture de la biomasse microbienne. Les milieux non inoculés des *Aspergillus* ont engendré une faible mortalité (maximum 1%) qui a été déduite des résultats présentés ci-après au point 2.1 et 2.2. Pour *S. albus*, c'est de l'eau distillée qui a été utilisée comme témoin et dont la mortalité a également été déduite des résultats présentés au point 2.3.

### 2.1. Test de toxicité des surnageants d'*A. flavus*

La mortalité augmente en fonction du temps et en fonction de la concentration en surnageant (Figure 10 et Figure 11).

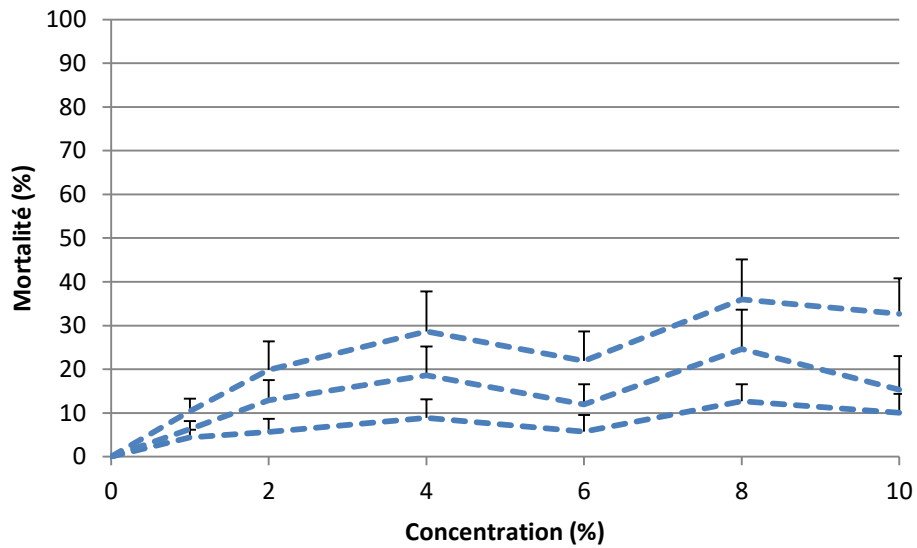


Figure 10 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant produit par *A. flavus* en culture submergée.

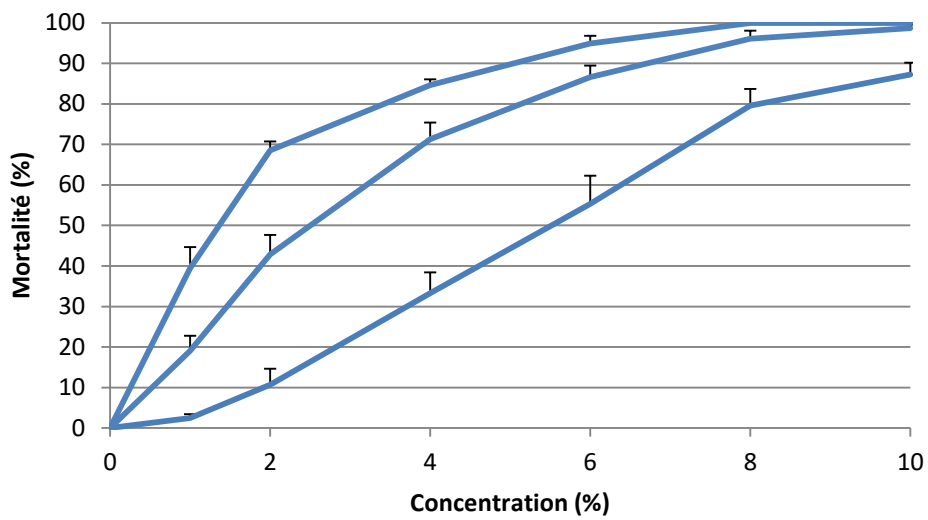


Figure 11 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant produit par *A. flavus* en biofilm.

La concentration en surnageant permettant d'atteindre la mortalité la plus haute est de 8% en culture submergée et de 10% en biofilm. Mais cette mortalité est de 25% pour la culture submergée alors qu'elle est de 99% pour la culture en biofilm déjà après 48 heures (Figure 12).

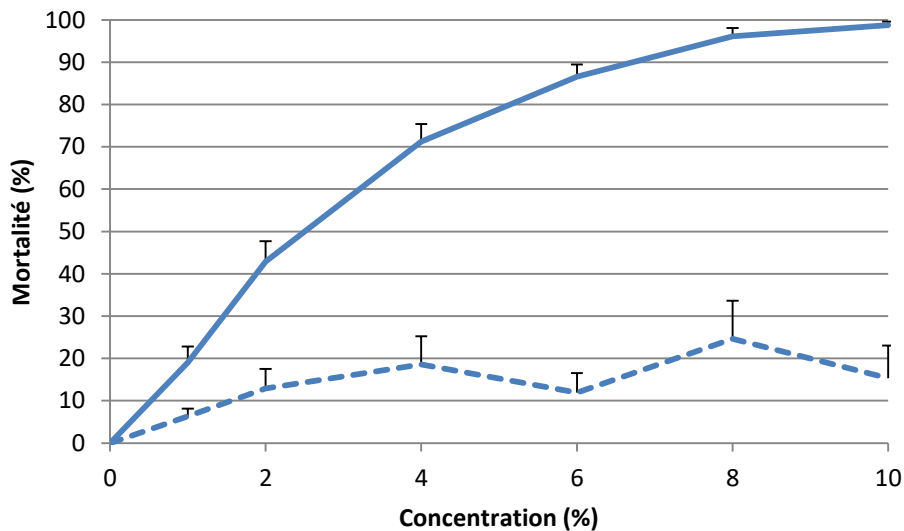


Figure 12 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction des concentrations en surnageant produit par *A. flavus* après 48 heures.

Etant donné le peu de mortalité pour la culture submergée de cette moisissure, seules les concentrations létales (CL10, CL50, CL90) en surnageant peuvent être calculées pour ceux produits en biofilm (Tableau 7). Les concentrations létales calculées diminuent logiquement avec le temps d'incubation et augmentent en fonction de la mortalité. Elles varient entre 0,34 % et 12,71 %.

Tableau 7 Concentrations létales (CL10, CL50, CL90, exprimées en pourcentage en surnageant) en fonction du temps d'exposition pour *A. flavus* cultivé en biofilm.

Temps d'exposition (heures)	Concentration létale	Dose létale (%)
24	CL 10	1,68 (F(1,38)= 147,56 ; p<0,001)
24	CL 50	4,62 (F(1,38)= 147,56 ; p<0,001)
24	CL 90	12,71 (F(1,38)= 147,56 ; p<0,001)
48	CL 10	0,69 (F(1,34)= 201,125 ; p<0,001)
48	CL 50	2,24 (F(1,34)= 201,125 ; p<0,001)
48	CL 90	7,20 (F(1,34)= 201,125 ; p<0,001)
72	CL 10	0,34 (F(1,27)= 158,53 ; p<0,001)
72	CL 50	1,30 (F(1,27)= 158,53 ; p<0,001)
72	CL 90	5,06 (F(1,27)= 158,53 ; p<0,001)

## 2.2. Test de toxicité des surnageants d'*A. oryzae*

La mortalité augmente en fonction du temps pour les deux modes de culture. Elle s'accroît en fonction de la concentration en surnageants pour la culture en biofilm mais pas pour la culture submergée (Figure 13 et Figure 14).

La concentration en surnageant permettant d'atteindre la mortalité la plus haute est de 10% en culture submergée et de 50% en biofilm. Mais cette mortalité est de 36% pour la culture submergée alors qu'elle est de 89% pour la culture en biofilm déjà après 48 heures (Figure 15).

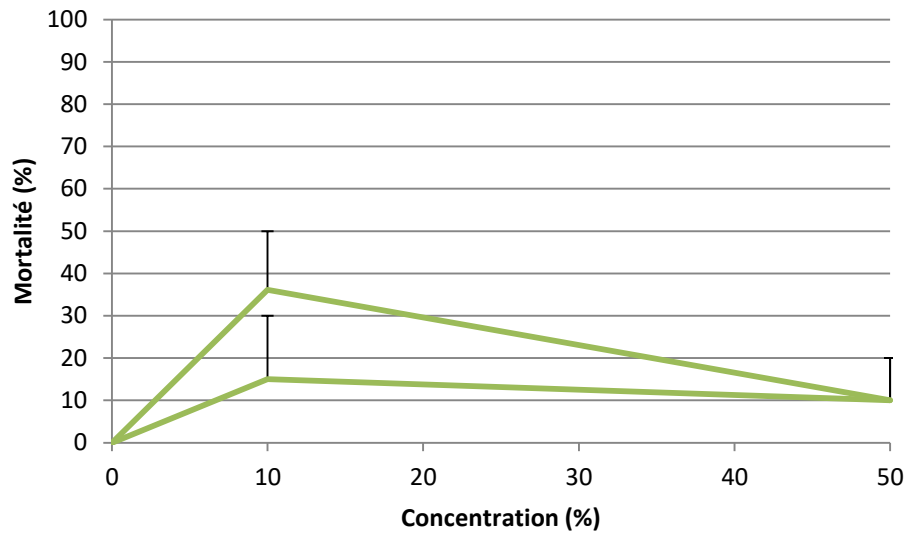


Figure 13 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant produit par *A. oryzae* en culture submergée.

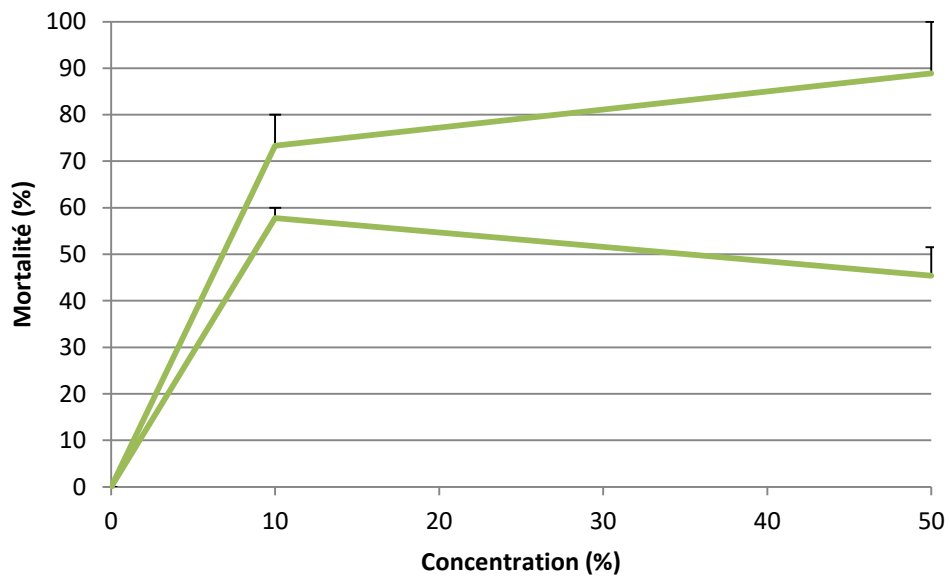


Figure 14 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant produit par *A. oryzae* en biofilm.

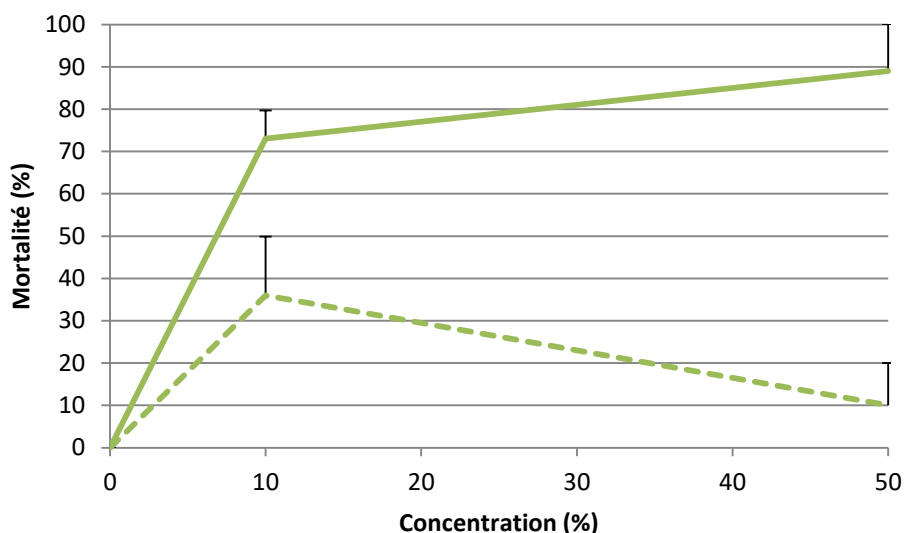


Figure 15 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant produit par *A. oryzae* après 48 heures.

Etant donné le peu de concentrations testées pour cette moisissure et le peu de données relatives aux mortalités, les concentrations létales n'ont pu être calculées.

### 2.3. Comparaison entre le test de toxicité d'*A. flavus* et celui d'*A. oryzae*.

Un temps d'incubation de 48 heures et une dilution 10 fois permet d'atteindre une mortalité maximale pour *A. flavus* en culture en biofilm, ce qui n'est pas le cas pour *A. oryzae* (Figure 16).

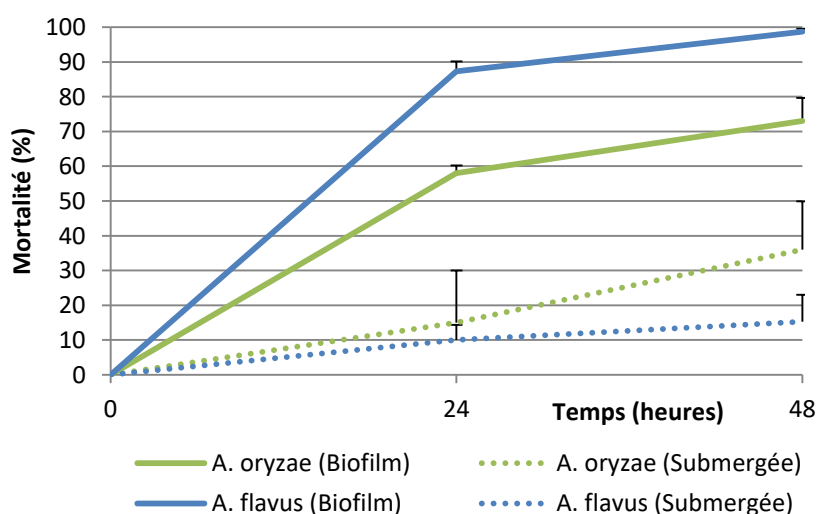


Figure 16 Evolution de la mortalité (20 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction du temps pour une concentration en surnageant de 10%, comparaison de la toxicité entre les deux espèces d'*Aspergillus*.



#### 2.4. Test de toxicité des surnageants de *S. albus*.

La mortalité augmente en fonction du temps pour les deux modes de culture. Elle s'accroît en fonction de la concentration en surnageant pour la culture submergée mais pas pour la culture en biofilm (Figure 17 et Figure 18).

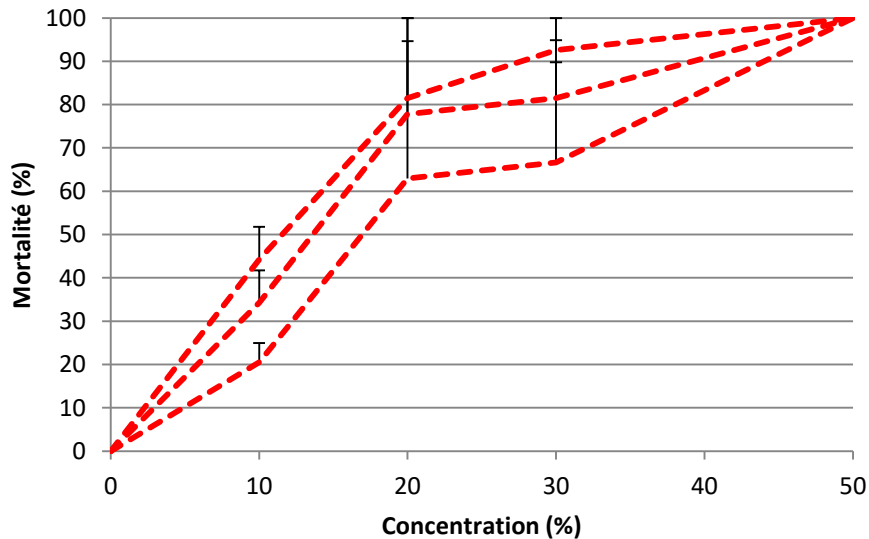


Figure 17 Evolution de la mortalité (10 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant de *S. albus* produit en culture submergée.

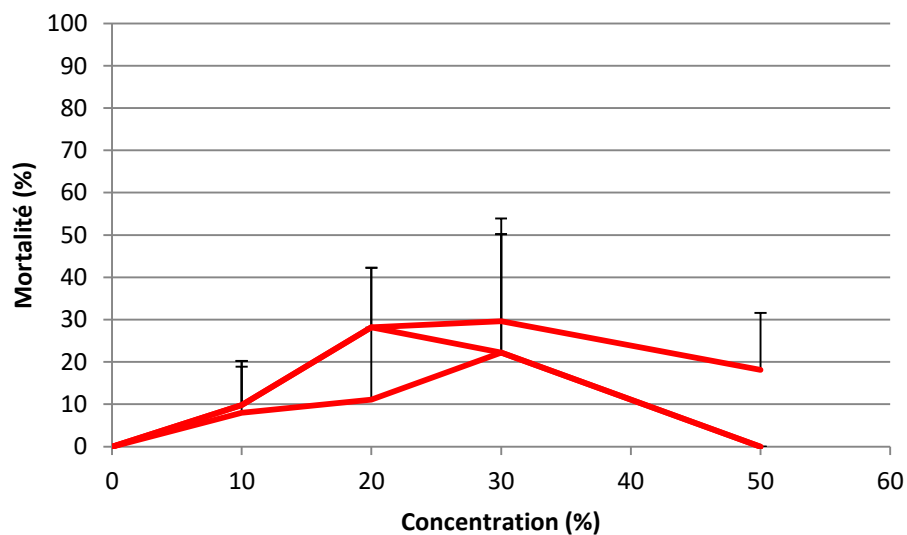


Figure 18 Evolution de la mortalité (10 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction de la concentration en surnageant produit par *S. albus* en biofilm.

Après 48 heures, la concentration en surnageant permettant d'atteindre la mortalité la plus haute est de 20% en biofilm et de 50% en culture submergée. Mais cette mortalité est de 28% pour la culture en biofilm alors qu'elle est de 100% pour la culture submergée (Figure 19).

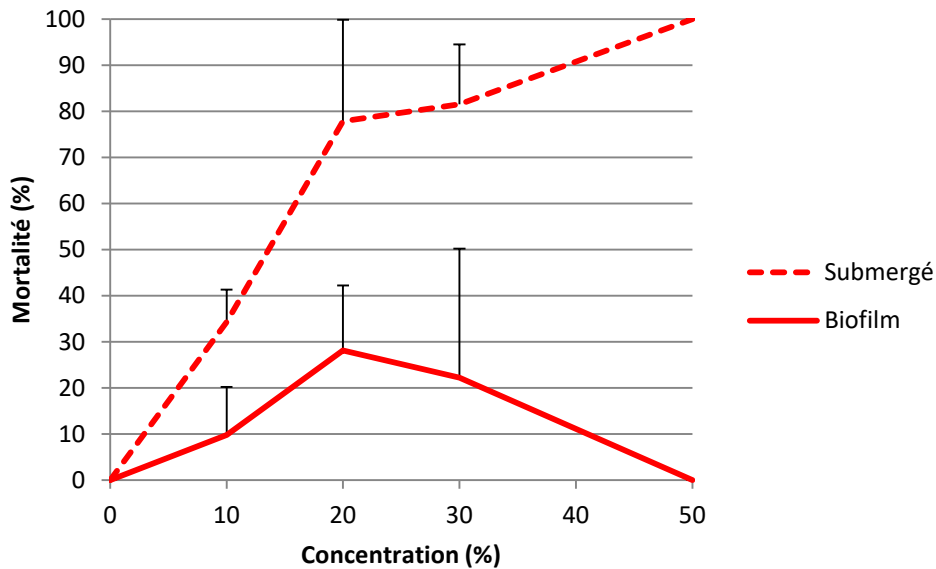


Figure 19 Evolution de la mortalité (10 larves de *Cx. quinquefasciatus*) en fonction des surnageants produits par *S. albus* selon les deux modes de culture après 48 heures.

Etant donné le peu de mortalités pour la culture biofilm et le manque de données pour la culture en biofilm de cette bactérie, seules les concentrations létales (CL10, CL50) en surnageant peuvent être calculées pour ceux issus de la culture submergée (Tableau 8). Les concentrations létales calculées diminuent logiquement avec le temps d'incubation et augmente en fonction de la mortalité. Elles varient entre 1,94% et 20,68%. Cependant la p-valeur est supérieure à 0,05, ce qui indique que statistiquement il n'y a pas de relation entre la mortalité et la gamme de concentrations testée contrairement aux tendances des graphiques.

Tableau 8 Concentrations létales (CL10, CL50, exprimées en pourcentage en surnageant) en fonction du temps d'exposition pour *S. albus* en culture submergée.

Temps d'exposition (heures)	Concentration létale	Dose létale (%)
24	CL10	6,17 (F(1,7)= 4,19 ; p>0,05)
24	CL50	20,68 (F(1,7)= 4,19 ; p>0,05)
48	CL10	4,06 (F(1,7)= 4,59 ; p>0,05)
48	CL50	17,11 (F(1,7)= 4,59 ; p>0,05)
72	CL10	1,94 (F(1,6)= 1,84 ; p>0,05)
72	CL50	13,92 (F(1,6)= 1,84 ; p>0,05)

Le test de Kaplan-Meier montre que qu'il y a une différence significative de la survie des larves entre le groupe traité avec 20% de surnageant et le groupe témoin ( $\chi^2(0,95 ; 1) = 35,11 ; p < 0,001$ ). La LT50 est de  $23,2 \pm 3,1$  heures pour une concentration en surnageant de 20%.

### 3. Analyse des surnageants

#### 3.1. Analyse protéomique des surnageants d'*A. flavus* et *A. oryzae*

Les résultats de l'analyse protéomique sont issus des deux bases de données mentionnées dans la partie matériel et méthodes. Dans cette analyse qui visait à comparer les protéines excrétées dans les surnageants d'*A. flavus* et d'*A. oryzae* cultivés en culture submergée et en biofilm, 18 spots ont pu être mis en évidence par la méthode électrophorèse à deux dimensions (Figure 20). Onze protéines ont pu être répertoriées (Tableau 9). Ces protéines ont un point isoélectrique compris entre 3.9 et 5,2 et une masse moléculaire supérieure à 13 kDa.

Cinq ont pu être identifiées dont 4 enzymes: une glucoamylase, une phosphohydrolase, une exonucléase, une formyle-Coa transférase et une autre protéine impliquée dans la division cellulaire : cell division protein. Le milieu utilisé ne contient que peu de ces protéines. La glucoamylase et la phosphohydrolase ont été retrouvées dans les surnageants d'*A. oryzae*. La première a été retrouvée dans les deux modes de production et la deuxième a été retrouvée seulement en culture submergée. Une protéine originaire d'une souche d'*A. oryzae* a été retrouvée majoritairement en culture submergée. Dans les surnageants d'*A. flavus* en culture submergée, on retrouve la phosphohydrolase, la formyl-

Coa transférase et l'exonucléase Rrp41. Une protéine originaire d'une souche d'*A. oryzae* a été retrouvée majoritairement en culture submergée.

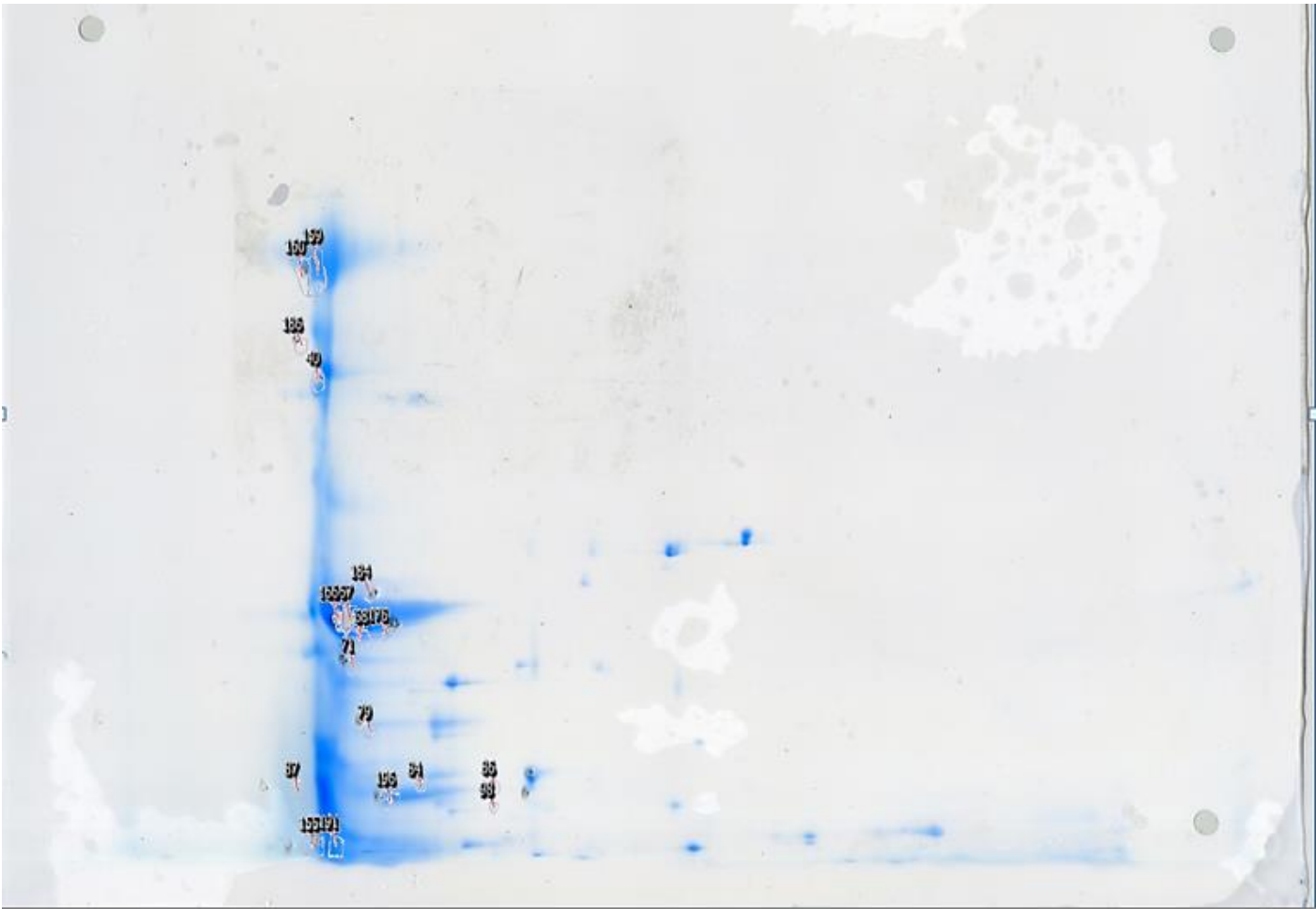


Figure 20 Gel préparatif reprenant les différents spots protéiques analysés des surnageants d'*A. flavus*, d'*A. oryzae* et du milieu

Tableau 9 Identification des protéines par LC-MS-MS dans les surnageants d'*A. flavus* et *A. oryzae* produits selon les deux modes de cultures (B : biofilm et S : submergée) et dans le milieu.

Numéro du spot	Valeur moyenne normalisée					Fold	Identification de la protéine	Numéro d'accension NCBI	Score mascot	Assurance	Poid moléculaire	Valeur pI	Nbr de peptides	Organisme	Rôle
	A. oryzae S	A. oryzae B	A. flavus S.	A. flavus B	Milieu										
40						15,7	Glucoamylase	AMYG_ASPAW	52	15	68837	4,1	640	<i>Aspergillus awamori</i>	Hydrolyse l'amidon
71						3,2	Phosphohydrolase	WP_066372067.1	84	23	24463	5,2	216	<i>Bacillus sp.</i> FJAT-27264	Hydrolyse la liaison phosphate
79						18,3	Hypothetical protein	WP_027406331.1	87	31	13278	3,9	300	<i>Anaerovibrio sp.</i> RM50	/
86						8,7	/	/	/	/	/	/		/	/
87						7,8	/	/	/	/	/	/		/	/
84						5,1	/	/	/	/	/	/		/	/
98						6,0	Cell division protein	WP_062096136.1	72	31	24637	5	228	<i>Arthrobacter sp.</i> ATCC 21022	Division cellulaire
155						8,3	/	/	/	/	/	/		/	/
159						22,4	Glucoamylase	AMYG_ASPAW	67	20	68837	4,1	640	<i>Aspergillus awamori</i>	Hydrolyse l'amidon
160						45,0	Glucoamylase	AMYG_ASPAW	68	20	68837	4,1	640	<i>Aspergillus awamori</i>	Hydrolyse l'amidon
166						32,0	Unnamed protein product	BAE63852.1	91	47	26086	4,7	227	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	/
167						48,4	Unnamed protein product	BAE63852.1	87	37	26086	4,7	227	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	/
68						13,8	/	/	/	/	/	/		/	/
184						20,1	Formyl-CoA transferase	WP_066772048.1	88	22	44240	5	401	<i>Croceicoccus mobilis</i>	Catalyse le transfert de la fraction CoA du formyl-CoA à l'oxalate et inversément
186						17,3	/	/	/	/	/	/		/	/
191						4,5	/	/	/	/	/	/		/	/
196						10,8	Hypothetical protein	WP_064318324.1	93	44	21046	4,7	210	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	/
176						11,0	Exosome complex exonuclease Rrp41	WP_048094625.1	93	29	28821	5,1	250	<i>Geoglobus ahangari</i>	Clive l'ARN



### 3.2. Analyse des métabolites secondaires des surnageants d'*A. flavus* et *A. oryzae*.

Dans le Tableau 10 ci-dessous, des couleurs sont utilisés pour comparer les quantités de mycotoxines produites en fonction de la modalité expérimentée et non en fonction des mycotoxines entre elles. Une case plus foncée signifie que le surnageant contient plus en quantité de la mycotoxine en question.

En mode ESI positif, sur un total de 97 composés recherchés, 6 mycotoxines ont pu être mises en évidence dans les surnageants de culture. Il s'agit de l'acide aspergillique, l'acide beta-cyclopiazonique, l'acide cyclopiazonique, la ferrineaspergilline, le flavacol et la speradine A. La ferrineaspergilline ne se retrouve pas dans les jus d'*A. oryzae*. *A. flavus* excrète généralement plus des autres molécules. Cette excrétion est plus importante lorsque la moisissure est cultivée en biofilm qu'en culture submergée. L'analyse MS en mode ESI négatif a révélé la présence de 3 des composés déjà identifiés en ESI positif, à savoir l'acide beta-cyclopiazonique, l'acide cyclopiazonique et la speradine A. Aucun des autres composés qui sont généralement plus facilement analysables en mode négatif n'a été détecté dans ce mode.

Tableau 10 Métabolites secondaires des deux espèces d'*Aspergillus*.

Métabolites secondaires	Formule chimique	Poids moléculaire exacte (Da)	Produit d'addition	[M+H] théorique (Da)	[M+H] mesuré (Da)			A. <i>Flavus</i> submerged	A. <i>Flavus</i> Biofilm	A. <i>Oryzae</i> Submerged	A. <i>Oryzae</i> Biofilm
						RRT mesuré (min)	RT (min)				
10,23,24,25-tetrahydro-24-hydroxyafloavinine	C28H41NO2	423,31373	+H	424,32101	/	/	/	/	/	/	/
13-Desoxyxypaxilline	C27H33NO3	419,24604	+H	420,25332	/	/	/	/	/	/	/
14,25-Dihydroxyafloavinine + epi.	C28H39NO3	437,29299	+H	438,30027	/	/	/	/	/	/	/
14-Hydroxyafloavinine + epimer	C28H39NO2	421,29808	+H	422,30536	/	/	/	/	/	/	/
14-Hydroxyisoafloavinine + epimer	C28H39NO2	421,29808	+H	422,30536	/	/	/	/	/	/	/
17-Hydroxy-14,15-dihydro-leporin C	C22H27NO3	353,19910	+H	354,20640	/	/	/	/	/	/	/
21-oxo-isoafloavinine	C28H37NO2	419,28243	+H	420,28971	/	/	/	/	/	/	/
2-hydroxy-2,5-di-(p-hydroxybenzyl) morpholine	C18H21NO4	315,14706	+H	316,15433	/	/	/	/	/	/	/
2-oxoCPA	C20H20N2O4	352,14231	+H	353,14958	/	/	/	/	/	/	/
3-(p-hydroxybenzyl)	C14H16N2O3	260,11610	+H	261,12340	/	/	/	/	/	/	/
3-(p-Hydroxyphenyl)propandiol	C9H12O3	168,07860	+H	169,08590	/	/	/	/	/	/	/
3,8'-Bisiderin	C24H22O8	438,13147	+H	439,13874	/	/	/	/	/	/	/
4'-Hydroxyasperentin	C16H20O6	308,12599	+H	309,13327	/	/	/	/	/	/	/
5,7-Dihydroxy-4-methylphthalide	C9H8O4	180,04226	+H	181,04954	/	/	/	/	/	/	/
5-Acetoxyethylfuran-3-carboxylic acid	C8H8O5	184,03720	+H	185,04440	/	/	/	/	/	/	/
5'-Hydroxyasperentin	C16H20O6	308,12599	+H	309,13327	/	/	/	/	/	/	/
5-Hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid	C6H6O4	142,02660	+H	143,03390	/	/	/	/	/	/	/
6,8-Dimethylcitreoisocoumarin	C16H18O6	306,11034	+H	307,11762	/	/	/	/	/	/	/
7,7'-O-Didemethyl-3,8'-bisiderin	C22H18O8	410,10017	+H	411,10744	/	/	/	/	/	/	/
7-O-acetylkojic acid	C8H8O5	184,03717	+H	185,04444	/	/	/	/	/	/	/
7'-O-Demethyl-3,8'-bisiderin	C23H20O8	424,11582	+H	425,12309	/	/	/	/	/	/	/
7-O-Demethyl-aflavarin	C23H20O9	440,11073	+H	441,11801	/	/	/	/	/	/	/
8-Demethyl-leporin C	C21H23NO2	321,17288	+H	322,18016	/	/	/	/	/	/	/
8-O-Methyl-5'-hydroxyasperentin	C17H22O6	322,14160	+H	323,14890	/	/	/	/	/	/	/
9,10-Dehydro-leporin B	C22H23NO3	349,16780	+H	350,17510	/	/	/	/	/	/	/
9,10-Dehydro-leporin C	C22H23NO2	333,17290	+H	334,18200	/	/	/	/	/	/	/
Actinopolymorphol C	C18H16N2O2	292,12118	+H	293,12845	/	/	/	/	/	/	/
Aflatoxicol	C17H14O6	314,07904	+H	315,08631	/	/	/	/	/	/	/
Aflatoxin B1 (AFB1)	C17H12O6	312,06339	+H	313,07066	/	/	10,84	0,6973	/	/	/
Aflatoxin B2 (AFB2)	C17H14O6	314,07904	+H	315,08631	/	/	10,33	0,6643	/	/	/
Aflatoxin G1 (AFG1)	C17H12O7	328,05830	+H	329,06558	/	/	9,77	0,6281	/	/	/
Aflatoxin G2 (AFG2)	C17H14O7	330,07395	+H	331,08123	/	/	9,21	0,5925	/	/	/

Aflatrem	C32H39NO4	501,28791	+H	502,29519	/	/	/	/	/	/	/	/
Aflavarin	C24H22O9	454,12638	+H	455,13366	/	/	/	/	/	/	/	/
Aflavazole	C28H35NO2	417,26678	+H	418,27406	/	/	/	/	/	/	/	/
Aflavinine	C28H39NO	405,30317	+H	406,31044	/	/	/	/	/	/	/	/
Aflavinine-like metabolite	C28H37NO4	451,27230	+H	452,27950	/	/	/	/	/	/	/	/
AFOH	C17H14O6	314,07904	+H	315,08631	/	/	/	/	/	/	/	/
alfa-CPA	C20H20N2O3	336,14739	+H	337,15467	/	/	/	/	/	/	/	/
alfa-CPA imine	C20H21N3O2	335,16338	+H	336,17065	/	/	/	/	/	/	/	/
Anhydroasperflavin	C16H14O4	270,08921	+H	271,09649	/	/	/	/	/	/	/	/
Asparasone A	C18H14O8	358,06887	+H	359,07614	/	/	/	/	/	/	/	/
Asperentin	C16H20O5	292,13107	+H	293,13835	/	/	/	/	/	/	/	/
Asperentin 6-methyl ether	C17H22O5	306,14672	+H	307,15400	/	/	/	/	/	/	/	/
Asperentin 8-methyl ether	C17H22O5	306,14672	+H	307,15400	/	/	/	/	/	/	/	/
Asperflavin	C16H16O5	288,09977	+H	289,10705	/	/	/	/	/	/	/	/
Asperfuran	C13H14O3	218,09429	+H	219,10157	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Aspergilliacid</b>	<b>C12H20N2O2</b>	<b>224,15248</b>	<b>+H</b>	<b>225,15975</b>	<b>225,1600835</b>	<b>12,93505</b>	<b>13,64</b>	<b>0,877</b>				
Aspertoxin	C19H14O7	354,07395	+H	355,08123	/	/	/	/	/	/	/	/
Aspirochlorine	C12H9ClN2O5S2	359,96414	+H	360,97142	/	/	/	/	/	/	/	/
Beta-aflatrem	C32H39NO4	501,28791	+H	502,29519	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Beta-Cyclopiazonic acid</b>	<b>C20H22N2O3</b>	<b>338,16306</b>	<b>+NH4</b>	<b>355,17033</b>	<b>356,1941734</b>	<b>10,9803</b>	<b>15,44</b>	<b>0,993</b>				
cis-2,5-di-(p-hydroxybenzyl) piperazine	C18H22N2O2	298,16813	+H	299,17540	/	/	/	/	/	/	/	/
Cyclo (D-N-methyl-Leu-L-Trp)	C18H23N3O2	313,17900	+H	314,18630	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Cyclopiazonic acid</b>	<b>C20H20N2O3</b>	<b>336,14740</b>	<b>+H</b>	<b>337,15467</b>	<b>336,148238</b>	<b>14,5486</b>	<b>15,55</b>	<b>1</b>				
Deacetylasparasone A	C16H12O7	316,05830	+H	317,06558	/	/	/	/	/	/	/	/
Dehydroaflavarin	C24H20O9	452,11073	+H	453,11801	/	/	/	/	/	/	/	/
Dehydroxyasparasone A	C18H12O7	340,05830	+H	341,06558	/	/	/	/	/	/	/	/
deoxy-AFB1	C17H12O5	296,06850	+H	297,07577	/	/	/	/	/	/	/	/
DHDMST	C17H12O6	312,06339	+H	313,07066	/	/	/	/	/	/	/	/
DHOMST	C19H16O6	340,09469	+H	341,10196	/	/	/	/	/	/	/	/
DHST	C18H14O6	326,07904	+H	327,08631	/	/	/	/	/	/	/	/
Dihydroxy-aflavinine	C28H39NO3	437,29300	+H	438,30027	/	/	/	/	/	/	/	/
Ditryptophenaline	C42H40N6O4	692,31110	+H	693,31838	/	/	/	/	/	/	/	/
DMST	C17H10O6	310,04774	+H	311,05501	/	/	/	/	/	/	/	/
Fe Complex (Iron trioxoleporin B)	C66H72FeN3O9	110,64618	+H	110,74690	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Ferrineaspergillin</b>	<b>C36H57FeN6O6</b>	<b>725,3689</b>	<b>+H</b>	<b>726,37617</b>	<b>726,3782236</b>	<b>21,06166667</b>	<b>20,90</b>	<b>1,344</b>			/	/



<b>flavacol</b>	<b>C12H20N2O</b>	<b>208,15756</b>	<b>+H</b>	<b>209,16483</b>	<b>209,1651615</b>	<b>12,59518333</b>	<b>13,09</b>	<b>0,842</b>				
Hydroxyaflatrem	C32H39NO5	517,28282	+H	518,29010	/	/	/	/	/	/	/	/
Hydroxyaspergillilic Acid	C12H20N2O3	240,14739	+H	241,15520	241,1547	/	9,85	0,633	/	/	/	/
Hydroxyflavacol	C12H20N2O2	224,15248	+H	225,15975	/	/	/	/	/	/	/	/
Isoaflavinine	C28H39NO	405,30317	+H	406,31044	/	/	/	/	/	/	/	/
Kojic Acid	C6H6O4	142,02661	+H	143,03389	/	/	/	/	/	/	/	/
Leporin A	C23H27NO3	365,19909	+H	366,20637	/	/	/	/	/	/	/	/
Leporin B	C22H25NO3	351,18344	+H	352,19072	/	/	/	/	/	/	/	/
Leporin C	C22H25O2N	335,18854	+H	336,19581	/	/	/	/	/	/	/	/
Miyakamides A1	C31H32N4O3	508,24744	+H	509,25472	/	/	/	/	/	/	/	/
Miyakamides A2	C31H32N4O3	508,24744	+H	509,25472	/	/	/	/	/	/	/	/
Miyakamides B1	C31H32N4O4	524,24236	+H	525,24963	/	/	/	/	/	/	/	/
Miyakamides B2	C31H32N4O4	524,24236	+H	525,24963	/	/	/	/	/	/	/	/
Mutaspergillilic acid	C11H18N2O3	226,13174	+H	227,13902	/	/	/	/	/	/	/	/
Neospergillilic acid	C12H20N2O2	224,15248	+H	22,51598	/	/	/	/	/	/	/	/
Neohydroxyaspergillilic acid	C12H20N2O3	240,14739	+H	241,15467	/	/	/	/	/	/	/	/
OMST	C19H14O6	338,07904	+H	339,08631	/	/	/	/	/	/	/	/
Orsellinic acid	C8H8O4	168,04226	+H	169,04954	/	/	/	/	/	/	/	/
Oximoaspergillimide	C11H20N2O3	228,14739	+H	229,15467	/	/	/	/	/	/	/	/
Oxyasparasone A	C18H14O9	374,06378	+H	375,07106	/	/	/	/	/	/	/	/
Paspalicine	C27H31NO3	417,23039	+H	418,23767	/	/	/	/	/	/	/	/
Paspaline	C28H39NO2	421,29808	+H	422,30536	/	/	/	/	/	/	/	/
Paspalinine	C27H31NO4	433,22531	+H	434,23259	/	/	/	/	/	/	/	/
Paspalininol	C27H33NO4	435,24096	+H	436,24824	/	/	/	/	/	/	/	/
Paxilline	C27H33NO4	435,24096	+H	436,24824	/	/	/	/	/	/	/	/
PCM6	C27H35NO3	421,26169	+H	422,26897	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Speradine A</b>	<b>C21H22N2O4</b>	<b>366,15796</b>	<b>+H</b>	<b>367,16523</b>	<b>367,1650262</b>	<b>366,157959</b>	<b>14,26</b>	<b>0,917</b>				
β-Nitropropanoic Acid	C3H5NO4	119,02186	+H	120,02913	/	/	/	/	/	/	/	/
ST	C18H12O6	324,06339	+H	325,07066	/	/	/	/	/	/	/	/
Tetrathioaspirochlorine	C12H9ClN2O5S4	423,90829	+H	424,91556	/	/	/	/	/	/	/	/
trans-2,5-di-(p-hydroxybenzyl) piperazine	C18H22N2O2	298,16813	+H	299,17540	/	/	/	/	/	/	/	/
Trithioaspirochlorine	C12H9ClN2O5S3	391,93621	+H	392,94349	/	/	/	/	/	/	/	/
Ustiloxin A	C28H43N5O12S	673,26289	+H	674,27017	/	/	/	/	/	/	/	/
Ustiloxin B	C26H39N5O12S	645,23159	+H	646,23887	/	/	/	/	/	/	/	/
Versicolorin A	C18H10O7	338,04266	+H	339,04993	/	/	/	/	/	/	/	/

### 3.3. Dosage de la validamycine dans les surnageants.

Aucune quantité détectable de la validamycine dans les échantillons n'a pu être mise en évidence quel que soit le micro-organisme ou le mode de culture (Tableau 11).

Tableau 11 Dosage de la validamycine dans les surnageants de *Streptomyces* et d'*Aspergillus* produits selon 2 modes de production.

Modalités	Concentration mesurée (ng/mL)
<i>S. albus</i> (Biofilm)	<CC $\alpha$
<i>S. albus</i> (Submergé)	<CC $\alpha$
<i>A. flavus</i> (Biofilm)	<CC $\alpha$
<i>A. flavus</i> (Submergé)	<CC $\alpha$
<i>A. oryzae</i> (Biofilm)	<CC $\alpha$
<i>A. oryzae</i> (Submergé)	<CC $\alpha$

CC $\alpha$  decision limit 25.38  $\mu\text{g/L}$

CC $\beta$  detection capability 50.74  $\mu\text{g/L}$

## VI. Discussion

### À propos d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus oryzae*

#### Au niveau de la biomasse

Les biomasses produites après 5 jours sont similaires dans les deux modes de cultures testés : la culture submergée et la culture en biofilm. Mais le rendement est 1,9 fois plus important pour *A. flavus* qu'*A. oryzae* alors que l'inoculum ( $10^6$  spores/ 100 mL) était le même dans les deux cas. Pour *A. flavus*, la biomasse produite est en moyenne pour les deux modes de culture de 0,55 g / g de source de carbone, ce qui représente un rendement de bioconversion maximum. Par contre pour la culture d'*A. oryzae*, nous avons obtenu aussi en moyenne pour les deux modes de culture 0,29 g de biomasse/g de source de carbone. Zune *et al.* (2015) a produit 0,55 g/ g de source de carbone avec *A. oryzae* en culture en biofilm mais son milieu contenait de l'amidon comme source de carbone et non du glucose comme utilisé dans notre expérimentation.

En culture submergée, la biomasse s'est développée en pellets pour les deux champignons (voir commentaires plus loin sur l'incidence des métabolites excrétés).

#### Au niveau de la toxicité

Les surnageants des cultures submergées sont moins toxiques pour les larves de moustiques que ceux produits en culture en biofilm, pour les deux *Aspergillus*. Les surnageants produits en biofilm par *A. flavus* sont nettement plus efficaces que ceux d'*A.oryzae*.

Dans la littérature, plusieurs travaux montrent les effets insecticides de différentes espèces d'*Aspergillus*. Mais souvent les auteurs ont utilisé la biomasse microbienne dans les tests de toxicité. De Moraes *et al.* (2001) ont mis en évidence l'efficacité de plusieurs espèces d'*Aspergillus* dont *A. flavus* contre *Aedes fluviatilis*. Cependant, ces mêmes souches ont été testées sur *Cx. quinquefasciatus* mais sans succès, avec des concentrations en spores de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  spores/mL. Par contre, Bawin *et al.*, (2016) ont réalisé un test de toxicité avec une concentration en spores de  $10^6$  spores/mL d'*A. flavus* contre *Cx. quinquefasciatus*. Au bout de 5 jours d'incubation, la mortalité était de 83%. La LC50 étant de  $1,8 \times 10^8$  spores/mL pour un temps d'incubation de 72 heures.

C'est suite à la découverte d'une souche d'*A. oryzae* XJ-1 sur *Locusta migratoria* que cette espèce d'*Aspergillus* a fait l'objet d'une étude de toxicité contre ce même insecte au stade 3. Les CL50 pour le 10<sup>ème</sup>, 13<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jours issus de cette étude sont  $3,3 \times 10^8$ ,  $1,7 \times 10^7$  et  $7,2 \times 10^6$  spores/mL respectivement (Zhang *et al.*, 2015).

D'autres tests réalisés par Vijayan & Balaraman (1991) ont mis en évidence la toxicité des métabolites secondaires produits par des champignons contre *Cx. Quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Dans cette étude, ils ont calculé des LC50 variant entre 0,7 à 8,3 mL/L. Ce qui correspond à la gamme de CL50 que nous avons obtenue.

### **Au niveau des protéines**

De manière générale, les teneurs en protéines des surnageants des cultures submergées d'*A. flavus* et d'*A. oryzae* sont supérieures à ceux des cultures en biofilm. Khalesi *et al.* (2014) explique qu'il est possible que certaines molécules soient piégées dans la biomasse en culture en biofilm. De plus, l'expression des protéines varient en fonction du mode de culture. Une observation similaire a été mise en évidence dans les travaux de Oda *et al.* (2006) (voir étude bibliographique).

Au niveau du type de protéines, la glucoamylase est surexprimée par *A. oryzae* dans les deux modes de cultures. Rappelons que cette espèce est connue pour sa production industrielle d'amylase (Hata *et al.*, 1998). Il est donc logique de la retrouver dans nos surnageants. La glucoamylase est une protéine qui intervient dans l'hydrolyse de l'amidon pour produire du glucose. Une autre protéine d'*A. oryzae* a été retrouvée dans les surnageants produits avec notre souche d'*A. oryzae*.

La phosphohydrolase coupe les liaisons phosphates et peut intervenir au niveau de l'hydrolyse de l'ATP, impliquée dans le stockage d'énergie (Uniprot, 2017). Cette enzyme est surexprimée dans les cultures submergées des deux espèces d'*Aspergillus*. Des phosphohydrolases ont été recensées dans des cultures de *Beauveria bassiana* et sont considérés comme des molécules insecticides (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010). Les phosphatases sont également impliquées dans le rôle insecticide de *Bacillus thuringiensis* (Stalinski *et al.*, 2016).

La formyl-CoA transférane est une enzyme qui catalyse le transfert de la fraction CoA du formyl-CoA à l'oxalate et inversement. Elle est donc impliquée dans la dégradation de l'oxalate et se retrouve généralement dans les organismes acidophiles (Uniprot, 2017). Cette protéine est surexprimée par *A. flavus* en culture submergée.

La cell division protein est une protéine qui intervient dans la division des cellules (Uniprot, 2017). Elle est surexprimée dans les cultures en biofilm d'*A. flavus* et dans les cultures submergées d'*A. oryzae*. Ceci peut expliquer une activité de division cellulaire plus importante pour les cultures en biofilm.

L'exonucléase est une enzyme qui clive les acides nucléiques présent dans l'ARN (Mullins *et al.*, 2012). Il y a une surexpression de cette protéine dans les cultures submergées des deux *Aspergillus*.

Les dernières analyses protéomiques réalisées par T. Bawin, ont montré la présence de protéases qui pourraient être des déterminants de pathogénicité potentielle. Cette famille de protéines n'a pas été répertoriée dans nos surnageants.

Une analyse du protéome de la même souche d'*A. oryzae* que celle étudiée dans notre travail a été réalisée par électrophorèse à deux dimensions par Zune *et al.* (2015). Quatre familles d'enzymes ont pu être identifiées : des protéases, des hydrolases de polysaccharides, des hydrolases de groupements glycosyls et des oxyréductases. Son milieu de culture était moins riche en source d'hydrates de carbone et de protéines. De plus, il a utilisé de l'amidon et non du glucose. Il a retrouvé ses protéines dans la même gamme de point isoélectrique et de masse moléculaire que dans nos analyses.

La production de protéines dépend du nombre d'extrémités hyphales chez les champignons (site d'excrétion). Néanmoins, dans les biofilms on doit également tenir compte de la limite de diffusion au sein de la masse solide (Zune *et al.*, 2015). C'est pour cela que le principe actif (ou les principes actifs) pourrait être des métabolites secondaires qui ont une masse moléculaire plus faible et diffusent plus facilement. Ces métabolites seraient produits via des mécanismes PKS (polyketide synthase) et NRPS (non-ribosomales peptides synthases) qui sont modulés en biofilm par rapport au mode de culture liquide classique. Les peptides non ribosomiques sont dérivés à la fois des acides aminés protéinogènes et des acides aminés non-protéinogènes par l'action d'enzymes multi-modulaires appelées peptides synthétases non ribosomales 16 (NRPS). Les polycétides sont les métabolites secondaires fongiques abondants. Ils sont synthétisés par des polycétides synthases (PKS), qui sont des protéines à multi-domaines. Ils ont une structure voisine des acides gras. Leur synthèse se fait par itération. Néanmoins, l'influence du biofilm sur ces mécanismes est encore mal connue (Keller *et al.*, 2005).

### **Au niveau des mycotoxines**

Comme souvent mentionné dans la littérature, beaucoup de souches d'*A. flavus* produisent des aflatoxines dans différentes graines (maïs, arachide, noix et graines de coton). Ces toxines sont des agents cancérigènes puissants qui ciblent le foie (Anses, 2012). On remarque suite à notre analyse qu'il n'y a pas d'aflatoxine recensée dans les surnageants des deux espèces d'*Aspergillus*.

Dans la partie bibliographie, plusieurs composés insecticides produits par *Aspergillus* ont été mis en évidence : les acides tétramiques, les terpénoïdes d'indole, les pyridones et

les dicétopipérazines. Les molécules qui ont été identifiées dans nos analyses font toutes partie de ces familles de composés.

L'acide cyclopiazonique est un acide indole-tetramique que l'on retrouve surtout dans les céréales. C'est un inhibiteur de la pompe  $\text{Ca}^{++}$  ATP-ase du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (Nishie *et al.*, 1985). Des tests de toxicité par ingestion orale sur poulet, lapin, chien, cochon et rat ont montré des problèmes gastro-intestinaux, neurologiques, des dégénérescences et des nécroses d'organes (foie, cœur, rein) (Batt & Tortorello, 2014). Les DL50 par voie orale sont les suivantes : 64 mg/kg de p.c. chez la souris femelle, 36 mg/kg de p.c chez le rat mâle contre 63 mg/kg de p.c chez le rat femelle et 12 mg/kg de p.c chez le poulet et la poule (Fremy, 2009). Blaney et Green (1989) ont réalisé des tests sur des larves de stades 1 de *Lucilia cuprina*, avec de l'acide cyclopiazonique, la CL50 est de 80 ppm. La speradine A est un dérivé de l'acide cyclopiazonique appelé aussi 1-N-methyl-2-oxoCPA (Tokuoka *et al.*, 2015).

L'acide aspergillique, la ferrineoaspergilline, le flavacol sont des dérivés de pyrazines naturels (Nishimura *et al.*, 1997). MACDONALD *et al.*, (1964) ont mis en évidence la voie de biosynthèse de l'acide neoaspergillique qui est la suivante :

Leucine → flavacol → neoaspergillilic acid → neohydroxyaspergillilic acid.

L'acide hydroxyaspergillique possède une structure proche de l'acide aspergillique. Il est retrouvé à la fois chez *A. flavus* et *A. oryzae* (MACDONALD, 1962). La ferrineoaspergilline est un complexe formé à partir de l'acide aspergillique et du  $\text{Fe}^{+++}$ . Ces molécules dérivées de l'acide aspergillique sont des antibiotiques qui ont des activités inhibitrices sur les bactéries Gram-négative, Gram-positive et sur les cellules cancéreuses humaines (Zhu *et al.*, 2011).

T. Bawin a réalisé des analyses HPLC pour déterminer les métabolites secondaires présents sur des spores d'*A. flavus*, sur le son de blé ayant servi à une culture de spores, et sur des larves de *Cx. Quinquefasciatus* traitées par ces spores (Tableau 12).

Tableau 12 Métabolites secondaires retrouvés dans des spores d'*A. flavus*, du son de blé (substrat d'*A. flavus*), larves traitées par *A. flavus* (Bawin, communication personnelle).

Noms des métabolites secondaires	Spores	Son de blé	Larves
Cyclopiazonic Acid (CPA)	++	+++	-
2-oxoCPA	+++	++	-
Speradine A	+++	+++	-
3-OH-speradine A	+++	+++	-
Aspergillic Acid	+	+	-
Hydroxyaspergillic Acid	-	+++	-
Leporin B	-	+++	-
Leporin C	+	+++	-

Trois mycotoxines (acide cyclopiazonique, acide aspergillique et speradine A) ont été identifiées à la fois dans l'analyse de T. Bawin et celle de notre travail. Les leporines B et C sont des pyridones (C. Zhang *et al.*, 2003) qui n'ont pas été retrouvées dans nos surnageants.

Au niveau des deux espèces étudiées dans notre travail et de leur mode de culture, les analyses montrent que les mycotoxines sont plus présentes chez *A. flavus* et en biofilm.

#### **Au niveau de la corrélation entre les paramètres analysés.**

Tenant compte de toutes ces observations. Le niveau de toxicité des surnageants de culture pourrait être corrélé à :

- l'espèce d'*Aspergillus*,
- le mode de culture : la culture submergée produit des surnageants moins toxiques car le mycélium se développe sous forme de pellets et excrètent moins de métabolites secondaires de type mycotoxines. Les protéines se retrouvent de manière plus importante dans les cultures submergées que dans les cultures en biofilm (voir commentaire ci-dessus au niveau des protéines).

## À propos de *Streptomyces albus*

### Au niveau de la biomasse

De manière générale, la biomasse évolue pour atteindre un maximum après 3 ou 4 jours. La culture submergée semble cependant plus rapide que la culture en biofilm. Une décroissance est ensuite observée. Cette décroissance pourrait s'expliquer par une lyse des cellules (Medeiros, 2017). Cette expérimentation devrait être répétée avec un plus grand nombre de fioles et avec plus de mesures de la biomasse durant les premières 24 heures pour obtenir des courbes de croissance précises.

En culture submergée, la biomasse s'est développée en pellets comme les moisissures.

### Au niveau de la toxicité

Les cultures de *S. albus* ont produit des surnageants toxiques pour *Cx. quinquefasciatus*. Pour calculer une CL50 plus précise, la gamme de concentration des surnageants devraient être affinées entre 10% - 20% et le nombre de répétitions devrait être augmenté.

Pathalam *et al.*, (2017) ont réalisé des tests de toxicité avec des extraits d'actinobactéries diverses sur des larves de *Cx. quinquefasciatus* de stade 3. C'est *Streptomyces enissocaesilis* (KT8270105) qui s'est avéré être le plus efficace avec une mortalité de 98% après 24 heures.

El-Khawagh *et al.* (2011) ont évalué la toxicologie de différents filtrats d'actinomycètes dont notamment l'espèce *S. albus* sur *Culex pipiens*. Sur 10 larves, la mortalité était de 100%.

Vijayan & Balaraman (1991) ont obtenu des CL50 de métabolites de deux espèces de *Streptomyces* sp, variant de 1 à 3 mL/L vis-à-vis *Cx. Quinquefasciatus*. Ces concentrations létales correspondent à très bonne efficacité de ses souches.

Le développement de *S. albus* sous forme de biofilm est moins favorable pour le développement d'un insecticide microbien. En effet, suite aux tests réalisés, on remarque que la toxicité est nettement inférieure à la culture submergée. Plusieurs hypothèses peuvent être posées :

- la forme « biofilm » ne favorise pas le développement de métabolites secondaires toxiques contre le moustique,
- la forme « biofilm » ne favorise pas une production de métabolites secondaires suffisante pour avoir un effet sur le moustique,



- a forme submergée a connu une lyse des cellules plus importantes ce qui aurait comme conséquence une concentration en métabolites secondaires plus importante. Ceci justifierait la perte en biomasse plus importante pour les cultures submergées.

### **Au niveau de la validamycine**

Aucune trace de validamycine n'a été mise en évidence dans les surnageants produits par *S. albus*.

El-Khawagh *et al.* (2011) ont réussi à mettre en évidence les activités enzymatiques provoquées par *Streptomyces albus* : activité lécithinase, lipolyse, hydrolyse de la pectine, réduction du nitrate, production d'H<sub>2</sub>S, hydrolyse de l'hippurate, dégradation de l'élastine et dégradation de la xanthine. Il faut souligner que le milieu utilisé est composé d'amidon et de nitrate et que la culture s'est réalisée sur 7 jours.

Rappelons que de nombreux autres composés: mycines, avermectines, spinosines,... (partie bibliographie point 5) à propriétés insecticides sont produits par le genre *Streptomyces*. Ils devraient être dosés dans les surnageants de culture.

## À propos du développement d'un insecticide microbien

Les surnageants de culture d'*A. flavus* se sont montrés efficaces contre *Cx. quinquefasciatus* mais les résultats obtenus avec les 2 autres micro-organismes reconnus GRAS (Generally Recognized As Safe) sont aussi très encourageants. Le développement d'insecticides à partir de surnageants de culture présente différents avantages :

- Leur effet est plus rapide que celle du micro-organisme (temps d'incubation). En effet, les analyses effectuées par Seye *et al.* (2014) montrent qu'une concentration en spores d'*A. clavatus* de  $12,5 \times 10^7$  spores/mL permettait d'avoir une mortalité de 60,5% après 24 heures alors qu'elle est de 93,4% pour une concentration en métabolites de 100%.
- Leur formulation sera plus aisée. Elle ne nécessitera pas la conservation d'organismes vivants. Elle pourra être basée sur une concentration du surnageant suivie d'un séchage pour obtenir une poudre à diluer de conservation aisée.
- Les molécules toxiques pourraient être purifiées et formulées.

## VII. Conclusions et perspectives

L'objectif général de notre travail était le développement d'insecticide microbien destiné à lutter contre le moustique *Cx. quinquefasciatus*, vecteur de maladies pour l'homme et les animaux. Les recherches étaient basées sur les résultats d'études antérieures. Elles visaient à évaluer :

- le potentiel insecticide des surnageants de culture de 2 espèces d'*Aspergillus* et d'une espèce de bactérie filamenteuse *S. albus* en fonction de leur mode de culture en milieu liquide : en culture submergée ou culture en biofilm,
- analyser les métabolites produits par ces micro-organismes et les corrélés aux activités biologiques obtenues.

Au niveau des *Aspergillus*, les résultats obtenus confirment les hypothèses initiales et apportent des éléments nouveaux :

- les surnageants d'*A. flavus* sont plus toxiques que ceux d'*A. oryzae*,
- les cultures en biofilm produisent des surnageants plus toxiques,
- L'analyse protéomique a révélé la présence de 11 protéines dans les surnageants dont 4 enzymes dont la phosphohydrolase qui pourrait être impliquée dans l'effet insecticide,
- les mycotoxines produites (aspergillique acid, beta cyclopiazone acid, cyclopiazone acid, flavacol, speradine A, sont en concentrations plus importantes dans les surnageants les plus efficaces.

Nos travaux ont montré l'intérêt de l'utilisation de *S. albus* pour le développement d'insecticide microbien puisque les surnageants de culture submergée de cette souche sont efficaces même si la validamycine n'a pu être détectée dans les préparations. Ce qui signifie que d'autres composés à propriétés insecticides sont excrétés.

Des expérimentations supplémentaires doivent être envisagées :

- d'un point de vue fondamental :

- pour optimiser le mode de culture, la biomasse, la durée, la composition du milieu pour obtenir les surnageants les plus efficaces,
- pour identifier la ou les molécule(s) des surnageants d'*Aspergillus* responsables de l'activité insecticide et de les purifier,
- pour identifier les métabolites produits par *S. albus* responsables de l'activité insecticide,
- pour s'assurer de l'innocuité des préparations vis-à-vis de la biodiversité et de la santé humaine,

- étudier l'échelle de production pour comparer l'efficacité des surnageants obtenus,

- d'un point de vue appliqué :

- pour élargir la production de métabolites efficaces en testant différents supports d'adhérences pour les biofilms d'*Aspergillus* dans des réacteurs à une échelle pilote ou industrielle,
- pour mettre au point une formulation efficace, facile à appliquer et à conserver.

## VIII. Références bibliographiques

- Agence nationale pour la démoustication et la gestion des espaces naturels démoustiqués & Commission européenne. (2013). *Guide à l'usage des opérateurs publics français de démoustication et de lutte antivectorielle et des décideurs*.
- Alain Fraval. (1999). Insectes auxiliaires: la lutte biologique. Retrieved July 26, 2017, from <http://www7.inra.fr/opie-insectes/luttebio.htm>
- Aly, C., Mulla, M. S., Schnetter, W., & Xu, B. Z. (1987). Floating bait formulations increase effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis against Anopheles larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **3**(4), 583–588. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3504944>
- Anses. (2012). *Aspergillus flavus et autres moisissures productrices d'aflatoxines*. *Annu Rev Phytopathol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>
- Arroyo-Manzanares, N., Diana Di Mavungu, J., Uka, V., Malysheva, S. V., Cary, J. W., Ehrlich, K. C., ... De Saeger, S. (2015). Use of UHPLC high-resolution Orbitrap mass spectrometry to investigate the genes involved in the production of secondary metabolites in *Aspergillus flavus*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **32**(10), 1656–1673. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1071499>
- Assante, G., Camarda, L., Locci, R., Merlini, L., Nasini, G., & Papadopoulos, E. (1981). Isolation and structure of red pigments from *Aspergillus flavus* and related species, grown on a differential medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **29**(4), 785–787. <https://doi.org/10.1021/jf00106a023>
- Batt, C. A., & Tortorello, M. Lou. (2014). *Encyclopedia of food microbiology*. Retrieved from <https://books.google.be/books?id=1b1CAgAAQBAJ&pg=PA89&lpg=PA89&dq=aspergillus+acid+toxicity&source=bl&ots=mzFY9tRE9a&sig=CFoRI7LEQBckh2eulp2DebMNmTs&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwilpuqW2MTVAhVBblAKHfufCYoQ6AEIWTAF#v=onepage&q&f=false>
- Bawin, T. (2016). INSECT PATHOGENIC ASPERGILLUS SPECIES IN MOSQUITO ( DIPTERA : CULICIDAE ) CONTROL COMPARED TO, 200.
- Bawin, T., Seye, F., Boukraa, S., Zimmer, J., Raharimalala, N., Zune, Q., ... Francis, F. (2016). Production of two entomopathogenic *Aspergillus* species and insecticidal activity against the mosquito *Culex quinquefasciatus* compared to *Metarhizium anisopliae* insecticidal activity against the mosquito *Culex*. *Biocontrol Science and Technology*, **26**(5), 617–629. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1134767>
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control*. (Springer, Ed.) (Seconde ed). Berlin Heidelberg.
- Bhattacharya, S., & Basu, P. (2016). The Southern House Mosquito , *Culex quinquefasciatus* : profile of a smart vector, **4**(2), 73–81.
- Blaney, BJ; Green, P. (1989). *Insecticidal fungal metabolites: Cyclopiazonic acid and kojic acid contribute to the toxicity of "Aspergillus flavus" to sheep blowfly "Lucilia cuprina."* General and Applied Entomology: The Journal of the Entomological Society of New South Wales,. Retrieved from <http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=236829195107453;res=IELHSS>

- Braun, S., & Vecht-Lifshitz, S. E. (1991, February). Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(91\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0167-7799(91)90020-1)
- Calvo, A. M., & Cary, J. W. (2015). Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00062>
- Cary, J. W., Uka, V., Han, Z., Buyst, D., Harris-Coward, P. Y., Ehrlich, K. C., ... Di Mavungu, J. D. (2015). An *Aspergillus flavus* secondary metabolic gene cluster containing a hybrid PKS–NRPS is necessary for synthesis of the 2-pyridones, leporins. *Fungal Genetics and Biology*, **81**, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.05.010>
- Chaufaux, J. (1989). Cultures. *Insectes*, **97**, 1–6. Retrieved from <http://www7.inra.fr/opie-insectes/pdf/i97chaufaux.pdf>
- Chen, X., Lu, Y., Fan, Y., & Shen, Y. (2017). An Introduction to Validamycins and Their Derivatives. *Validamycin and Its Derivatives*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100999-4.00001-0>
- Choi, W. S., Wu, X., Choeng, Y. H., Mahmud, T., Jeong, B. C., Lee, S. H., ... Hong, S. K. (2008). Genetic organization of the putative salbostatin biosynthetic gene cluster including the 2-epi-5-epi-valiolone synthase gene in *Streptomyces albus* ATCC 21838. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**(4), 637–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1591-2>
- CHP (Center for Health Protection). (2004). Scientific Committee on Vector-borne Diseases: Alternative Mosquito Control Methods.
- Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Sogaard-Andersen, L., & van Wezel, G. P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol*, **12**(2), 115–124. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3178>
- De Moraes, A. M. L., Costa, G. L. D., De Barcellos, M. Z. C., De Oliveira, R. L., & De Oliveira, P. C. (2001). The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. *Journal of Basic Microbiology*, **41**(1), 45–49. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200103\)41:1<45::AID-JOBM45>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200103)41:1<45::AID-JOBM45>3.0.CO;2-5)
- Dunn, G., Newbold, G. T., & Spring, F. S. (1949). 545. Synthesis of flavacol, a metabolic product of *Aspergillus flavus*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, **0**(0), 2586. <https://doi.org/10.1039/jr9490002586>
- Dutcher, D. (1947). Later workers have been less fastidious, howyever, and have applied the term “as- pergillin” to active materials from *Aspergillus fluvus* and other. *Journal of Biological Chemistry*, **171**(5), 321–339.
- Dutcher, D. (1957). ASPERGILLIC ACID: AN ANTIBIOTIC PRODUCED BY ASPERGILLUS SUBSTANCE FLAVUS. *Journal of Biological Chemistry*, **238**(1), 785–796. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/232/2/785.citation>
- El-Khawagh, M. A., Hamadah, K. S., & El-Sheikh, T. M. (2011). The insecticidal activity of actinomycete metabolites , against the mosquito Culex. *Academic Journal of Biological Sciences*, **4**(1), 103–113.
- Forseth, R. R., Amaike, S., Schwenk, D., Affeldt, K. J., Hoffmeister, D., Schroeder, F. C., & Keller, N. P. (2013). Homologous NRPS-like Gene Clusters Mediate Redundant Small-Molecule Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Angewandte Chemie International Edition*, **52**(5), 1590–1594. <https://doi.org/10.1002/anie.201207456>

- Fremy, J.-M. (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final. *Afssa*, 339.
- Gallagher, R. T., McCabe, T., Hirotsu, K., Clardy, J., Nicholson, J., & Wilson, B. J. (1980). Aflavinine, a novel indole-mevalonate metabolite from tremorgen-producing *Aspergillus flavus* species. *Tetrahedron Letters*, **21**(3), 243–246. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)71179-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)71179-8)
- Goddard, J. (2008). *Infectious Diseases and Arthropods*. (Vassil St. Georgiev, Ed.) (Humana pre). Mississippi State University, Starkville.
- Grove, J. F. (1972). New metabolic products of *Aspergillus flavus*. Part II. Asperflavin, anhydroasperflavin, and 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **0**(0), 2406. <https://doi.org/10.1039/p19720002406>
- Guirao-Abad, J. P., Sánchez-Fresneda, R., Valentín, E., Martínez-Esparza, M., & Argüelles, J. C. (2013). Analysis of validamycin as a potential antifungal compound against *Candida albicans*. *International Microbiology*, **16**(4), 217–225. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.197>
- Harbach, R. (2008). Famili Culicidae Meigen, Mosquito Taxonomic Inventory. Retrieved from <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>
- Harding, M. W., Marques, L. L. R., Howard, R. J., & Olson, M. E. (2009). Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology*, **17**(11), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., & Imayasu, S. (1998). Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene*, **207**(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00612-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00612-4)
- He, J., Chen, S. W., Ruan, L. F., Cao, L. L., Yao, J., & Yu, Z. N. (2003). Determination of the Fungicide Validamycin A by Capillary Zone Electrophoresis with Indirect UV Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(26), 7523–7527. <https://doi.org/10.1021/jf026244f>
- Hsiao, Y. M., & Lo, C. C. (1999). Determination of the antibiotic fungicide validamycin A in formulated products by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(9), 3723–3726. <https://doi.org/10.1021/jf980970u>
- Kang, D., Son, G. H., Park, H. M., Kim, J., Choi, J. N., Kim, H. Y., ... Lee, C. H. (2013). Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity. *Fungal Biology*, **117**(3), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.01.009>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*, **3**(12), 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3**(12), 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Khalesi, M., Zune, Q., Telek, S., Riveros-Galan, D., Verachtert, H., Toye, D., ... Delvigne, F. (2014). Fungal biofilm reactor improves the productivity of hydrophobin HFBII. *Biochemical Engineering Journal*, **88**, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.001>
- La biodiversité en Wallonie. (2015). Le moustique japonais. Retrieved from <http://biodiversite.wallonie.be/fr/le-moustique-japonais.includehtml?IDC=6000>

- Lacey, L. A. (2017). *Microbial control of insect and mite pests : from theory to practice*. Academic Press.
- Li, W., Feng, J., Liu, Y., Jiang, J., Zheng, X., & Zhou, W. W. (2016). Novel spectrophotometric approach for determination of validamycin A in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **122**(6), 736–739. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.05.007>
- Lin, L., & Xu, X. (2013). Indole-3-acetic acid production by endophytic streptomyces sp. En-1 isolated from medicinal plants. *Current Microbiology*, **67**(2), 209–217. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0348-z>
- Liu, N., Dong, F., Xu, J., Liu, X., & Zheng, Y. (2016). Determination of Aminoglycoside Fungicide Validamycin A in Rice Plant by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach Using Ultra High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, **9**(6), 1736–1744. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0354-9>
- Luk, K. C., Kobbe, B., & Townsend, J. M. (1977). Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* Link. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**(1), 211–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/402112>
- M. Papagianni. (2004). *Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes - ScienceDirect*. (Elsevier, Ed.), *Biotechnology advances* (Vol. 22). Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497500300168X>
- M.H. Jijakli, P. Iepoivre. (1995). Utilisation Des Biopesticides Pour. *Le Fruit Belge*, (455), 83–88. Retrieved from <http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/37397/1/N°40 - jijakli 1995.pdf>
- Ma, Y.-M., Ma, C.-C., Li, T., & Wang, J. (2016). A new furan derivative from an endophytic *Aspergillus flavus* of *Cephalotaxus fortunei*. *Natural Product Research*, **30**(1), 79–84. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1038262>
- MACDONALD, J. C. (1962). Biosynthesis of hydroxyaspergillic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, **237**(June 1962), 1977–1981.
- MACDONALD, R. G. Micetich. A. J. C. (1964). Biosynthesis of Neoaspergillic and Neohydroxyaspergillic acids, **240**(4), 1–5.
- Medeiros, A. C. de A. P. (2017). *Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées*.
- Medina, M. L., Haynes, P. A., Breci, L., & Francisco, W. A. (2005). Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, **5**(12), 3153–3161. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401136>
- Mullins, E. A., Starks, C. M., Francois, J. A., Sael, L., Kihara, D., & Kappock, T. J. (2012). Formyl-coenzyme A (CoA):oxalate CoA-transferase from the acidophile *Acetobacter acetii* has a distinctive electrostatic surface and inherent acid stability. *Protein Science*, **21**(5), 686–696. <https://doi.org/10.1002/pro.2054>
- Nicholson, M. J., Koulman, A., Monahan, B. J., Pritchard, B. L., Payne, G. A., & Scott, B. (2009). Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(23), 7469–81. <https://doi.org/10.1128/AEM.02146-08>
- Nishie, K., Cole, R. J., & Dorner, J. W. (1985). Toxicity and neuropharmacology of cyclopiazonic acid.



*Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **23**(9), 831–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4043883>

- Nishimura, A., Yoshizako, F., & Chubachi, M. (1997). Purification and Characterization of an Enzyme That Catalyzes Ring Cleavage of Aspergillitic Acid, from *Trichoderma koningii* ATCC 76666. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **61**(April 2015), 1527–1530. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1527>
- NOZAWA, K., SEKITA, S., HARADA, M., UDAGAWA, S., & KAWAI, K. (1989). Isolation and structures of two new indoloditerpenes related to aflavinine from a microsclerotium-producing strain of *Aspergillus flavus*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, **37**(3), 626–630. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.626>
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., & Iwashita, K. (2006). Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(5), e:3448. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3448>
- Office pour les insectes. (2009). Office pour les insectes et leur environnement: Une question sur les insectes ? Retrieved from [http://www.insectes.org/insectes/questions-reponses.html?id\\_quest=824](http://www.insectes.org/insectes/questions-reponses.html?id_quest=824)
- OMS. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Health Organization*, 1–41. <https://doi.org/Ref:WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11>
- OMS. (2009). Best Management Practices for Integrated Mosquito Management, 12. Retrieved from <http://www.mosquito.org/assets/Resources/PRTTools/Resources/bmpsformosquitomanagement.pdf>
- OMS. (2017). Lutte contre la dengue: stratégies de lutte antivectorielle. Retrieved from [http://www.who.int/denguecontrol/control\\_strategies/fr/](http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/fr/)
- Organisation des nations unies. (2016). Meilleures stratégies de gestion relatives au programme de lutte contre les moustiques dans les lieux d'affectation des fonctionnaires de l'ONU, (i).
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Alvarez, C., & Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **105**(3), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.07.003>
- Pathalam, G., Rajendran, H. A. D., Appadurai, D. R., Gandhi, M. R., Michael, G. P., Savarimuthu, I., & Naif, A. A.-D. (2017). Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **6**(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.04.002>
- Paul Klausmeyer, Thomas G. McCloud, Kenneth D. Tucker, John H. Cardellina II and, & Shoemaker, R. H. (2005). Spirochlorine Class Compounds from *Aspergillus flavus* Inhibit Azole-Resistant *Candida albicans*. <https://doi.org/10.1021/NP050141K>
- Pazhanimurugan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., & Balagurunathan, R. (2016). Terpenoid bioactive compound from *Streptomyces rochei* (M32): taxonomy, fermentation and biological activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**(10), 161. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2121-5>

- Quarles, W. (2003). Mosquito Attractants and Traps. *Common Sense Pest Control*.
- Raghavendra, K., Sharma, P., & Dash, A. P. (2008). Biological control of mosquito populations through frogs: Opportunities & constraints. *Indian Journal of Medical Research*, **128**(1), 22–25.
- Regnaut-Roger. (2005). *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. (Tec & Doc Lavoisier, Ed.). Paris. Retrieved from <https://www.lavoisier.fr/livre/agriculture/enjeux-phytosanitaires-pour-l-agriculture-et-l-environnement/regnaut-roger/descriptif-9782743007850>
- Resnik, D. B. (2015). Disease-Resistant Mosquitoes, **14**(1), 37–46. <https://doi.org/10.1111/dewb.12011>.ETHICAL
- Rokas, A. (2013). *Aspergillus*. *Current Biology*, **23**(5), R187–R188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.021>
- Rosfarizan, M., Mohamed, M. S., Suhaili, N., Salleh, M. M., & Ariff, A. B. (2010). Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **5**(2), 24–37.
- Rossati, A. (2017). Global Warming and Its Health Impact. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, **8**(1 January), 963–7–20.
- Saruwatari, T., Yagishita, F., Mino, T., Noguchi, H., Hotta, K., & Watanabe, K. (2014). Cytochrome P450 as Dimerization Catalyst in Diketopiperazine Alkaloid Biosynthesis. *ChemBioChem*, **15**(5), 656–659. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300751>
- 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), 1–24. <https://doi.org/10.1673/031.004.1901>
- Seye, F., Bawin, T., Boukraa, S., Zimmer, J.-Y., Ndiaye, M., Delvigne, F., & Francis, F. (2014). Pathogenicity of *Aspergillus clavatus* produced in a fungal biofilm bioreactor toward *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Pesticide Science*, **39**(3), 127–132. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D14-006>
- Shalan, E. A. S., & Canyon, D. V. (2009). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical Biomedicine*, **26**(3), 223–261.
- Shi, Y., Zhang, X., & Lou, K. (2013). Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. *Journal of Insect Science (Online)*, **13**(151), 151. <https://doi.org/10.1673/031.013.15101>
- SHIOMI, K., HATAE, K., YAMAGUCHI, Y., MASUMA, R., TOMODA, H., KOBAYASHI, S., & OMURA, S. (2002). New Antibiotics Miyakamides Produced by a Fungus. *The Journal of Antibiotics*, **55**(11), 952–961. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.55.952>
- Sibanda, M. M., Focke, P. W. W., Heyman, H. M., & Birkholtz, P. L. (2013). Physical, chemical and biological strategies to combat malaria. *Physical, Chemical and Biological Strategies to Combat Malaria*, **8**, 41.
- Stalinski, R., Laporte, F., Després, L., & Tetreau, G. (2016). Alkaline phosphatases are involved in the response of *Aedes aegypti* larvae to intoxication with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins. *Environmental Microbiology*, **18**(3), 1022–1036. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13186>

- Sun, K., Li, Y., Guo, L., Wang, Y., Liu, P., & Zhu, W. (2014). Indole Diterpenoids and Isocoumarin from the Fungus, *Aspergillus flavus*, Isolated from the Prawn, *Penaeus vannamei*. *Marine Drugs*, **12**(7), 3970–3981. <https://doi.org/10.3390/md12073970>
- Te Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, A., ... Punt, P. J. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*, **2**(2), 245–248. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00092-2)
- TePaske, M. R., Gloer, J. B., Wicklow, D. T., & Dowd, P. F. (1990). Aflavazole: a new antiinsectan carbazole metabolite from the sclerotia of *Aspergillus flavus*. *The Journal of Organic Chemistry*, **55**(18), 5299–5301. <https://doi.org/10.1021/jo00305a030>
- Terrien, V. (2008). Pour le LES CULICIDÉS : TRANSMISSION VECTORIELLE DES INFECTIONS ET PARASITOSE.
- Tobias Kieser, Mervyn J. Bibb, Mark J. Buttner, Keith F. Chater, D. A. H. (2000). *Practical streptomyces genetics*. Norwich : John Innes Foundation.
- Tokuoka, M., Kikuchi, T., Shinohara, Y., Koyama, A., Iio, S., Kubota, T., ... Sato, K. (2015). Cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster gene *cpaM* is required for speradine A biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **79**(12), 2081–2085. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1065167>
- Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, **78**(2), 110–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24688172><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3962273>
- Uka, V., Moore, G., Arroyo-Manzanares, N., Nebija, D., De Saeger, S., & Diana Di Mavungu, J. (2017). Unravelling the Diversity of the Cyclopiazonic Acid Family of Mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC Triple-TOF HRMS. *Toxins*, **9**(1), 35. <https://doi.org/10.3390/toxins9010035>
- Umemura, M., Nagano, N., Koike, H., Kawano, J., Ishii, T., Miyamura, Y., ... Machida, M. (2014). Characterization of the biosynthetic gene cluster for the ribosomally synthesized cyclic peptide ustiloxin B in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, **68**, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.011>
- Van Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, C. M. J., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987). Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *MGG Molecular & General Genetics*, **206**(1), 71–75. <https://doi.org/10.1007/BF00326538>
- Vijayan, V., & Balaraman, K. (1991). Metabolites of fungi & actinomycetes active against mosquito larvae. *The Indian Journal of Medical Research*, **93**, 115–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1677347>
- Villarreal, M. R. (2012). Anatomie d'un moustique. Retrieved from <http://data.abuledu.org/searchhtml.php?terms=Moustiques>
- Zhang, P., You, Y., Song, Y., Wang, Y., & Zhang, L. (2015). First record of *Aspergillus oryzae* (Eurotiales: Trichocomaceae) as an entomopathogenic fungus of the locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera:

Acrididae). *Biocontrol Science and Technology*, **25**(11), 1285–1298.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1049977>

Zhu, F., Wu, J., Chen, G., Lu, W., & Pan, J. (2011). Biosynthesis, characterization and biological evaluation of Fe(III) and Cu(II) complexes of neoaspergillic acid, a hydroxamate siderophore produced by co-cultures of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Natural Product Communications*, **6**(8), 1137–40. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922920>

Zune, Q., Delepierre, A., Gofflot, S., Bauwens, J., Twizere, J. C., Punt, P. J., ... Delvigne, F. (2015). A fungal biofilm reactor based on metal structured packing improves the quality of a *Gla::GFP* fusion protein produced by *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**(15), 6241–6254. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6608-z>

Zyga, L. (2009). Scientists Build Anti-Mosquito Laser, 2–3. Retrieved from  
<https://phys.org/news/2009-03-scientists-anti-mosquito-laser.html>

## IX. Annexe

Tableau 13 Métabolites secondaires secrétés par *A. flavus* recensés dans la littérature.

Nr°	Classe chimique		Nom	Formule	Masse Exacte (Da)	[M+H <sup>+</sup> ] (Da)	Référence	
25	NON- RIBOS OMAL PEPTI DES	POLYKETIDES	Small polyketides	Kojic Acid	C6H6O4	142.02661	143.03389	Basappa <i>et al.</i> 1970
26				7-O-Acetylkojic acid	C8H8O5	184.03717	185.04445	Sun <i>et al.</i> 2014
27				Orsellinic acid	C8H8O4	168.04226	169.04954	
28				5-Hydroxymethylfuran-3-carboxylic acid	C6H6O4	142.0266	143.0339	Ma <i>et al.</i> 2016
29				5-Acetoxymethylfuran-3-carboxylic acid	C8H8O5	184.0372	185.0444	Ma <i>et al.</i> 2016
30				3-(p-Hydroxyphenyl)propandiol	C9H12O3	168.0786	169.0859	Forseth <i>et al.</i> 2013
31				5,7-Dihydroxy-4-methylphthalide	C9H8O4	180.04226	181.04954	Grove JF, 1972a
32				Asperfuran	C13H14O3	218.09429	219.10157	Forseth <i>et al.</i> 2013
33				Asperentin	C16H20O5	292.13107	293.13835	Grove JF, 1972b
34		Asperentin 6-methyl ether	C17H22O5	306.14672	307.154	Grove JF, 1972b		
35		Asperentin 8-methyl ether	C17H22O5	306.14672	307.154	Grove JF, 1972b		
36		4'-Hydroxyasperentin	C16H20O6	308.12599	309.13327	Grove JF, 1973		
37		5'-Hydroxyasperentin	C16H20O6	308.12599	309.13327	Grove JF, 1972b		
38		8-O-Methyl-5'-hydroxyasperentin	C17H22O6	322.1416	323.1489	Grove JF, 1973		
39		6,8-Dimethylcitreisocoumarin	C16H18O6	306.11034	307.11762	Sun <i>et al.</i> 2014		
40		Pyrazi nes		Aspergillilic acid	C12H20N2O2	224.15248	225.15975	Assante <i>et al.</i> 1981
41				Neoaspergillilic acid	C12H20N2O2	224.15248	225.15975	Assante <i>et al.</i> 1981
42				Hydroxyaspergillilic acid	C12H20N2O3	240.14739	241.15467	Dutcher, 1958; Dutcher, 1947

43			Neohydroxyaspergillic acid	C12H20N2O3	240.14739	241.15467	Dutcher, 1958; Dutcher, 1947
<b>Nr°</b>	<b>Chemical class</b>		<b>Name</b>	<b>Formula</b>	<b>Exact mass (Da)</b>	<b>[M+H<sup>+</sup>] (Da)</b>	<b>Reference</b>
44	NON-RIBOSOMAL PEPTIDES	Pyrazines	Mutaspergillic acid	C11H18N2O3	226.13174	227.13902	Dutcher, 1958; Dutcher, 1947
45			Flavacol	C12H20N2O	208.15756	209.16484	Dutcher, 1958; Dunn <i>et al.</i> 1949
46			Hydroxyflavacol	C12H20N2O2	224.15248	225.15975	Dutcher, 1958; Dutcher, 1947
47			Ferriaspergillin	C36H57FeN6O6	725.3689	726.37617	Assante <i>et al.</i> 1981
48			Oximoaspergillimide	C11H20N2O3	228.14739	229.15467	Assante <i>et al.</i> 1981
49			Actinopolymorphol C	C18H16N2O2	292.12118	293.12845	Forseth <i>et al.</i> 2013
50	NON-RIBOSOMAL PEPTIDES	Piperazines	cis-2,5-di-(p-hydroxybenzyl) piperazine	C18H22N2O2	298.16813	299.1754	Forseth <i>et al.</i> 2013
51			trans-2,5-di-(p-hydroxybenzyl) piperazine	C18H22N2O2	298.16813	299.1754	Forseth <i>et al.</i> 2013
52			2-hydroxy-2,5-di-(p-hydroxybenzyl) morpholine	C18H21NO4	315.14706	316.15433	Forseth <i>et al.</i> 2013
53			3-(p-hydroxybenzyl) hexahydropyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione	C14H16N2O3	260.1161	261.1234	Forseth <i>et al.</i> 2013
54			Cyclo (D-N-methyl-Leu-L-Trp)	C18H23N3O2	313.1790	314.1863	Klausmeyer <i>et al.</i> 2005
55		Peptides	Miyakamides A1	C31H32N4O3	508.24744	509.25472	Shiomi <i>et al.</i> 2002
56			Miyakamides B1	C31H32N4O4	524.24236	525.24963	Shiomi <i>et al.</i> 2002
57			Miyakamides A2	C31H32N4O3	508.24744	509.25472	Shiomi <i>et al.</i> 2002
58			Miyakamides B2	C31H32N4O4	524.24236	525.24963	Shiomi <i>et al.</i> 2002
59		Diketo-piperazines	Ditryptophenaline	C42H40N6O4	692.3111	693.31838	Saruwatari <i>et al.</i> 2014
60			Aspirochlorine	C12H9ClN2O5S2	359.96414	360.97142	Klausmeyer <i>et al.</i> 2005
61			Trithioaspirochlorine	C12H9ClN2O5S3	391.93621	392.94349	Klausmeyer <i>et al.</i> 2005
62			Tetrathioaspirochlorine	C12H9ClN2O5S4	423.90829	424.91556	Klausmeyer <i>et al.</i> 2005
63			β-Nitropropanoic Acid	C3H5NO4	119.02186	120.02913	Bush <i>et al.</i> 1951
64	PK - N RP	Indole - tetramates	alfa-CPA	C20H20N2O3	336.14739	337.15467	Luk <i>et al.</i> 1977
65			beta-CPA	C20H22N2O3	338.16304	339.17032	Uka <i>et al.</i> 2017

N°	Classe chimique		Nom	Formule	Masse exacte (Da)	[M+H <sup>+</sup> ] (Da)	Reference
66			alfa-CPA imine	C20H21N3O2	335.16338	336.17065	Uka <i>et al.</i> 2017
67	PK-NRP	Indole-tetramates	2-oxoCPA	C20H20N2O4	352.14231	353.14958	Uka <i>et al.</i> 2017
68			Speradine A	C21H22N2O4	366.15796	367.16523	Uka <i>et al.</i> 2017
69		2-Pyridones	Leporin A	C23H27NO3	365.19909	366.20637	Cary <i>et al.</i> 2015b
70			Leporin B	C22H25NO3	351.18344	352.19072	Cary <i>et al.</i> 2015b
71			Leporin C	C22H25NO2	335.18853	336.19581	Cary <i>et al.</i> 2015b
72			Fe Complex (Iron trioxoleporin B)	C66H72FeN3O9	1106.4618	1107.4690	Cary <i>et al.</i> 2015b
73		PK-NRP	2-Pyridones	8-Demethyl-leporin C	C21H23NO2	321.17288	322.18016
74	9,10-Dehydro-leporin C			C22H23NO2	333.1729	334.1820	Cary <i>et al.</i> 2015b
75	9,10-Dehydro-leporin B			C22H23NO3	349.1678	350.1751	Cary <i>et al.</i> 2015b
76	17-Hydroxy-14,15-dihydro-leporin C			C22H27NO3	353.1991	354.2064	Arroyo-Manzanares <i>et al.</i> 2015
77	INDOLE-DITERPENES	Aflavines and derivatives	Aflavinine	C28H39NO	405.30317	406.31044	Gallagher <i>et al.</i> 1980; Nozawa <i>et al.</i> 1989
78			Isoaflavinine	C28H39NO	405.30317	406.31044	Nozawa <i>et al.</i> 1989
79			14-Hydroxyaflavinine + epimer	C28H39NO2	421.29808	422.30536	Nozawa <i>et al.</i> 1989
80			14-Hydroxyisoaflavinine + epimer	C28H39NO2	421.29808	422.30536	Nozawa <i>et al.</i> 1989
81			14,25-Dihydroxyaflavinine + epi.	C28H39NO3	437.29299	438.30027	Nozawa <i>et al.</i> 1989
82			21-oxo-isoaflavinine	C28H37NO2	419.28243	420.28971	Nozawa <i>et al.</i> 1989
83			10,23,24,25-tetrahydro-24-hydroxyaflavinine	C28H41NO2	423.31373	424.32101	Nozawa <i>et al.</i> 1989
84			Aflavazole	C28H35NO2	417.26678	418.27406	Tepaske <i>et al.</i> 1990

85			Aflavinine-like metabolite	C28H37NO4	451.2723	452.2795	Forseth <i>et al.</i> 2013
<b>N°</b>	<b>Classe chimique</b>		<b>Nom</b>	<b>Formule</b>	<b>Masse exacte (Da)</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup>μ (Da)</b>	<b>Reference</b>
86	INDOLE-DITERPENES	Aflatrem and derivatives	Aflatrem	C32H39NO4	501.28791	502.29519	Nicholson <i>et al.</i> 2009
87			Beta-aflatrem	C32H39NO4	501.28791	502.29519	Nicholson <i>et al.</i> 2009
88			Hydroxyaflatrem	C32H39NO5	517.28282	518.2901	Nicholson <i>et al.</i> 2009
89		Aflatrem and derivatives	Paspaline	C28H39NO2	421.29808	422.30536	Nicholson <i>et al.</i> 2009
90			Paspalinine	C27H31NO4	433.22531	434.23259	Nicholson <i>et al.</i> 2009
91			Paspalicine	C27H31NO3	417.23039	418.23767	Nicholson <i>et al.</i> 2009
92			Paspalininol	C27H33NO4	435.24096	436.24824	Nicholson <i>et al.</i> 2009
93			Paxilline	C27H33NO4	435.24096	436.24824	Nicholson <i>et al.</i> 2009
94			PCM6	C27H35NO3	421.26169	422.26897	Nicholson <i>et al.</i> 2009
95			13-Desoxypaxilline	C27H33NO3	419.24604	420.25332	Nicholson <i>et al.</i> 2009
96	RSP		Ustiloxin B	C26H39N5O12S	645.23159	646.23887	Umemura <i>et al.</i> 2014
97			Ustiloxin A	C28H43N5O12S	673.26289	674.27017	Umemura <i>et al.</i> 2014