



## L'emploi de l'extrait du champignon endophyte *Aspergillus niger* isolé à partir des feuilles du ricin commun *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae, Malpighiales) comme agent de lutte biologique contre le criquet migrateur *Locusta migratoria* L. (Oedipodinae, Acrididae).

Laib Djamel Eddine<sup>1, 2\*</sup>, Benzehra Abdelmadjid<sup>2</sup>, Rahmani Youcef<sup>3</sup>, Boulaouad Belkacem Aimene<sup>2</sup>, Akkal Salah<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Département d'agronomie, Université de 20 aout 1955, Skikda, 21000.

<sup>2</sup>Institut national agronomique, Département de zoologie agricole et forestière. El-Harrach Alger, 16000, Algérie

<sup>3</sup>Laboratoire de génie des procédés, Université de Ouargla, Centre de recherche et d'analyses physico-chimiques Crapc, Ouargla, 30000, Algérie

<sup>4</sup>Unité Valorisation des ressources naturelles, molécules bioactives et analyses biologiques, Département de Chimie, Université de Mentouri Constantine 1, Constantine, 25000, Algérie

Courriel de l'auteur : [djamel.skikda@gmail.com](mailto:djamel.skikda@gmail.com)

Submitted on 3<sup>rd</sup> December 2021. Published online at [www.m.elewa.org/journals/](http://www.m.elewa.org/journals/) on 28<sup>th</sup> February 2022  
<https://doi.org/10.35759/JABs.170.5>

### RÉSUMÉ

**Objectifs :** Évaluer l'activité insecticide de l'extrait du champignon endophyte *Aspergillus niger*.

**Méthodologie et Résultats :** Pour évaluer l'activité insecticide, dix concentrations (de 0,2 à 2 g/ L) de l'extrait fongique ont été appliqués par contact et par ingestion contre *Locusta migratoria* L. Pour connaître la nature des métabolites secondaires responsables de l'activité insecticide des analyses chimiques, infrarouge à réflexion totale atténuée par transformée de Fourier de l'extrait fongique et un GC-MS-MS des hyphes du champignon et de l'extrait fongique ont été effectués. Un test d'inhibition d'Acétyl cholinestérase par l'extrait fongique a été effectué afin de connaître le mode d'action ou l'effet d'extrait sur le système nerveux des insectes traités. La concentration la plus efficace contre les insectes est de 2 g/L, avec un taux de mortalité maximum de 86,95% et 100% pour les traitements par contact et ingestion, respectivement. L'analyse chimique de l'extrait fongique a révélé la présence de polyphénols, d'alcaloïdes, de terpénoïdes et de saponines comme métabolites responsables de ces activités. L'analyse FTIR-ATR de l'extrait fongique a révélé la présence de groupes alcool, nitro, imine, alcyne et hydroxyle. L'analyse GC-MS des hyphes et de l'extrait fongique a révélé la présence des volatiles insecticides Hexahydro-1H-cyclopenta [c] isoxazole-4, 5,6-triol, 2, 3, 4,4a, 5, 6, 7,8-octahydro-1H -naphtalène-1,8a-diol et acide propanoïque 2-éthyl-3-hydroxyhexyle. A 4 µg/mL l'extrait fongique est doté d'une activité inhibitrice d'Acétylcholinestérase maximale de 73,91 %.

**Conclusions et application des résultats :** l'extrait du champignon endophyte d'*Aspergillus niger* constitue une bonne source de métabolites secondaires volatiles et non-volatiles à activité insecticide et peut être utilisé comme insecticide de contact ou ingestion contre *L. migratoria*.

**Mots clés :** Activité insecticide, champignons endophytes, *Locusta migratoria*, *Aspergillus niger*, GC-MS-MS, FTIR-ATR.

## ABSTRACT

**Objectives:** Evaluate the insecticidal activity of the extract obtained from the endophytic fungus, *Aspergillus niger*.

**Methodology and Results:** Ten concentrations of 0.2 to 2 g/L of the fungal extract were applied by contact against *Locusta migratoria* L. To find out the nature of the secondary metabolites responsible for the insecticidal activity, we carried out chemical analysis, an infrared analysis with total reflection attenuated by transform Fourier of the fungal extract, and GC-MS-MS analysis for both colony and fungal extract. To reveal the effect of the extract on the nervous system of the treated insects, we carried out an acetyl cholinesterase inhibition test. The most effective concentration against the insects was 2 g/L, with a maximum mortality rate of 86, 95% and 100% for *L. migratoria* upon contact and ingestion treatments, respectively. Chemical analysis of the fungal extract revealed the presence of polyphenols, alkaloids, terpenoids, and saponins as the metabolites responsible for these activities. The FTIR-ATR of the fungal extract revealed the presence of alcohol, nitro, imine, alkyne, and hydroxyl groups. Specifically, GC-MS analysis of both colony and fungal extract revealed the presence of the insecticidal volatiles Hexahydro-1H-cyclopenta [c] isoxazole-4,5,6-triol ,2,3,4,4a, 5,6,7,8-octahydro-1H-naphthalene-1,8a-diol and Propanoic acid 2-ethyl-3-hydroxyhexyl. Moreover, we found that at a concentration of 4 µg/mL, the fungal extract had a maximum inhibitory capacity of Ache of 73.11%.

**Conclusions and application of findings:** the endophytic fungus *A. niger* is a good source of volatile and non-volatile secondary metabolites with insecticidal activity against *L. migratoria*.

**Keywords:** Insecticidal activity, endophytic fungi, *Locusta migratoria*, *Aspergillus niger*, GC-MS-MS, FTIR-ATR.

## INTRODUCTION

Plusieurs insectes sont responsables de pertes importantes de récoltes dans le monde (Rahman *et al.*, 2018). Parmi eux, le criquet migrateur, *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera : Acrididae), qui est un bio agresseur à régime polyphage (Le Gall *et al.*, 2019), à plasticité écologique et une grande extension géographique, sa phase grégaire est sous l'influence de la densité des populations conduisant à la formation d'essaims spectaculaires responsables des dégâts considérables aux cultures (Sangbaramou *et al.*, 2018). Afin de minimiser ces dégâts, de vastes campagnes de lutte antiacridienne sont lancées chaque fois que le problème apparaît durant ces opérations des quantités considérables d'insecticides sont utilisées (Shuping et Eloff, 2017 ; Zhang et lecoq, 2021). Ces produits chimiques en question sont

nécessaires et efficaces, mais leur utilisation massive et sans contrôle a laissé apparaître un environnement pollué et une résistance des insectes, également des effets néfastes sur la santé humaine ont été constatés. Au-devant de tout cela, les instances concernées ont appliqué une réglementation environnementale stricte pour contrôler l'utilisation de ces produits (Shuping et Eloff, 2017 ; Berestetskiy et Hu, 2021). Toutefois, la recherche d'alternatives nouvelles assurant une agriculture performante saine et loin des produits chimiques avec le respect des exigences dictées par le marché et le code des consommateurs s'avère plus que nécessaire (Zhang et Lecoq, 2021). Parmi ces alternatives, les champignons endophytes qui sont des microorganismes présents dans toutes les plantes colonisant les tissus végétaux de leur plantes hôtes sans symptômes d'infection

apparentes sont considérés comme un groupe biologique prometteur pour la protection des plantes contre plusieurs insectes ravageurs et cela par le biais de la production de métabolites secondaires bioactifs à effet insecticide appartenant à divers groupes structurels (Yan et al., 2018; Toghueo, 2019; Kaur, 2020). Dans ce contexte, la présente

étude est concentrée sur l'activité insecticide de l'extrait du champignon endophyte *Aspergillus niger* isolé à partir des feuilles du ricin commun *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae, Malpighiales) contre le criquet migrateur *Locusta migratoria* L. (Oedipodinae, Acrididae).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Collection du matériel biologique :** Des feuilles du ricin commun *R. communis* sont collectées avec un scalpel à partir de 5 plantes saines issues d'une végétation naturelle dans la région de Beni bechir, Skikda, Algérie (Latitude 36°46'20" N et Longitude 6°57'30" E) le mois de février 2020 (puis transportées jusqu'au laboratoire). Également des adultes solitaires de *L.migratoria* ont été collectés de la même région.

**Isolement du champignon endophyte *A.niger* associé au ricin commun *R.communis* :** L'objectif de cette étape est d'isoler le champignon endophyte *A.niger* associé au ricin commun *Ricinus communis*. Cette étape a été réalisée 48 heures après le prélèvement du matériel végétal en utilisant le protocole décrit par Li et al. (2015) avec de légères modifications. Les échantillons ont été lavés à l'eau courante pour éliminer les particules du sol et coupés en segments de 5 x 5 mm. Les segments résultants ont été placés dans de l'éthanol à 75% pendant 1 minute, lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile pendant 3 minutes pour éliminer l'excès d'éthanol et séchés dans des conditions aseptiques. Ensuite, les échantillons ont été transférés de manière uniforme et aseptique dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA modifié l'ajout de la streptomycine (200 mg / L) pour inhiber toute croissance bactérienne, ces boîtes ont été scellées en utilisant du para film diagonal puis incubées dans une étuve à une température ambiante (25 ° C) pendant 21 jours pour assurer la croissance de champignons endophytes. Les

champignons émergents des tissus végétaux ont été directement isolés et transplantés dans un nouveau milieu PDA sans antibiotiques, puis incubés à 25 °C pendant 6 jours. Le champignon endophyte *Aspergillus niger* a été identifié par des observations microscopiques, basées sur les caractères phénotypiques tels que la couleur, l'aspect, les caractéristiques des spores et les structures de reproduction.

**Fermentation submergée et production de l'extrait fongique :** Cette étape a comme objectif la production de l'extrait fongique d'*A.niger* associé aux feuilles du ricin commun *R.communis* et effectuée en utilisant le protocole mentionnée par Dolatabad et al. (2017) avec de légères modifications. Des disques d'agar associés avec le mycélium d'*A.niger* ont été mis dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml du milieu PDB et fermés hermétiquement pour éviter toute contamination. Les cultures ont été incubées pendant 21 jours à 25 °C avec agitation intermittente pendant une heure afin d'homogénéiser le milieu et la biomasse fongique. Après 21 jours et une fois atteignant une biomasse importante, les mycéliums ont été séparés du milieu par filtration à travers du papier filtre Whatman n ° 1. Le filtrat est mélangé pendant 15 minutes avec un volume égal d'acétate d'éthyle et laissé reposer pendant 10 minutes pour être séparé en deux couches organique et aqueuse non miscibles. Ensuite l'acétate d'éthyle a été éliminé en utilisant un évaporateur rotatif. L'extrait est dissout dans 1 ml de l'eau distillée et conservé à 4 ° C.

**Élevage de masse des insectes :** L'élevage des insectes est réalisé afin d'obtenir un nombre suffisant de criquets pour faire notre expérience (traitement des insectes) selon la méthode décrite par Ouedraogo et al.(2002) avec des légères modifications dans une cage de reproduction de 50 cm<sup>3</sup> en bois, recouverte d'une tulle pour assurer l'aération et pour éviter la condensation de l'humidité (50-60% maximum) qui provoque les épizooties chez *Locusta migratoria*, comportant une porte coulissante pour permettre les différentes manipulations. Le fond de la cage est pourvu de poudres remplis de 2/3 de tourbe et de 1/3 de sable de rivière stérilisés et humidifiés à 10 % permettant la récupération des oothèques. L'éclairage et la chaleur 30±1 °C dans la cage sont assurés d'une façon continue pendant 12 heures / jour par une ampoule à incandescence

de 60 watts constante permettant aux insectes à se thermoréguler et trouver leur température optimale pour muer et pondre. La nourriture des insectes ce fait par des feuilles fraîches de blé.

**Traitement des insectes par contact et ingestion :** Des traitements par pulvérisation directe et par ingestion forcée ont été appliqués sur des ailés de *L.migratoria* mis dans des boîtes de plastique à raison de 5 insectes par boîte. Pour les deux types de traitement, on utilise 10 doses de l'extrait fongique (de 0,2 à 2 g / L) avec 5 répétitions pour chaque concentration et cinq répétitions traitées avec de l'eau distillée et considérées comme témoins. Le taux de mortalité corrigée(en pourcentage) a été calculé pour chaque traitement pendant 7 jours en employant la formule d'Abbott(1925) :

$$\text{Mortalité corrigée (\%)} = \frac{\text{Mortalité enregistrée (\%)} - \text{Mortalité témoin (\%)}}{100 - \text{Mortalité témoin (\%)}}$$

**Analyse chimique d'extrait fongique :** Cette étape est réalisée pour savoir la nature chimique d'extrait fongique ainsi que les classes de métabolites secondaires responsables de l'activité insecticide. La détection de principales classes de métabolites secondaires a été réalisée en utilisant les techniques représentées par (Harborne ,1998). L'extrait fongique a été dissous dans l'HCL dilué, filtrés puis traités avec l'HGL<sub>4</sub>K<sub>2</sub>, la formation d'un précipité de couleur jaune a indiqué la présence d'alcaloïdes. Pour la détection des flavonoïdes l'extrait fongique a été dissous traités avec quelques gouttes de NaOH, la formation d'une couleur jaune intense, devenue incolore lors de l'ajout de l'HCL dilué, indique la présence de flavonoïdes. Pour la détection des phénols, l'extrait fongique a été dissous dans 5 ml d'eau distillée ensuite quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 5% ont été ajoutées, une couleur verte foncée obtenue indique la présence de composés phénoliques. Pour les saponines, l'extrait

fongique est vigoureusement agité avec de l'eau distillée puis laissé au repos pendant 10 minutes, la formation d'une émulsion assez stable indique la présence de saponines. Pour la détection des terpénoïdes, l'extrait fongique a été traité avec le chloroforme et d'acide sulfurique, la formation d'une couleur marron-rouge indique la présence de terpénoïdes. Pour la détection de tanins, l'extrait fongique a été traité avec un mélange d'éthanol et de FeCl<sub>3</sub>, une couleur noire bleuâtre qui a disparu lors de l'ajout d'un peu de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué suivie de la formation d'un précipité brun jaunâtre a indiqué la présence de tanins.

**Analyse spectroscopie d'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en réflexion totale atténuée (ATR) des extraits :** 1mg d'extrait fongique a été analysé par spectrométrie FTIR en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) en utilisant un spectromètre FTIR de la série Cary-630 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie) avec un ATR (MIRacle™ single

reflexion ATR) configuré avec une plaque diamant (Di) IRE (PIKE Technologies, Fitchburg, Wisconsin). Les acquisitions ont été réalisées en effectuant 8 balayages entre 4 000 et 650 $\text{cm}^{-1}$ , avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Un spectre des conditions ambiantes (background) a été automatiquement soustrait par le logiciel Resolution Pro version 5.0 (Agilent Technologies) pour chaque spectre d'échantillon. (Sala *et al.*, 2020).

**Analyse des composants volatiles de l'extrait fongique :** L'analyse GC-MS-MS des composants volatiles contenus dans l'extrait d'*A.nigera* été réalisée en utilisant l'appareil GCMS-QP2020 NX Shimadzu avec une colonne capillaire de silice fondue. L'emploi de l'instrument (CG-MS-MS) se fait selon les étapes décrites par Senthilkumar *et al.* (2014). L'instrument a été réglé à une température initiale de 100 °C et maintenu à cette température pendant 1 minute ensuite la température a été augmentée progressivement jusqu'à 250 °C (35°C pendant 2 minutes, 5°C/min jusqu'à 155°C, 20°C/min jusqu'à 250°C et 250°C pendant 10 minutes). La température de l'orifice d'injection a été maintenue à 250 °C et le débit d'hélium à 1 ml / min, la tension d'ionisation était à 70 eV. (1  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon / 1ml de méthanol) ont été injectés et la plage de balayage du spectre de masse a été fixée à 45-450 (m / z). L'interprétation sur GC-MS-MS à spectre de masse a été réalisée à l'aide de la base de données du National Institute Standard et Technologie (NIST) .Le nom, le poids moléculaire et la formule moléculaire des composants volatiles ont été ensuite déterminés.

**Analyse des composants volatiles produits par les hyphes fongiques du champignon endophyte *A.niger* :** L'analyse des composants volatiles produits par les hyphes fongiques du champignon endophyte *A.niger* se fait selon les étapes décrites par Fiers *et al.* (2013). 50 $\mu\text{L}$  d'une solution de spores fongiques ( $2 \times 10^7$  spores/mL) est injectée dans

des vials de micro-extraction sur phase solide (SPME) en pente, de 20 mL, contenant 7 mL de PDA et hermétiquement fermés. de manière à ce que la suspension recouvre toute la surface du milieu de culture. Les vials sont ensuite placés dans une étuve à 23°C .Pour l'extraction des composants volatiles, les fibres (SPME) sont conditionnées à 270°C pendant 1 heure, puis placées sur un support à piston. Chaque Vial de micro-extraction est mis avant le prélèvement dans un bain marie à 25°C pendant 10 minutes pour concentrer les composants volatiles dans l'espace de la tête du Vial. Chaque fibre est placée ensuite à l'intérieur en transperçant le bouchon du Vial, puis libérée et exposée aux composants volatiles produites par *A.niger* accumulés pendant 20 minutes à une température de 23°C. L'instrument (GC-MS-MS) a été réglé à une température initiale de 100 °C et maintenu à cette température pendant 1 minute ensuite la température a été augmentée progressivement jusqu'à 250 °C (35°C pendant 2 minutes, 5°C/min jusqu'à 155°C, 20°C/min jusqu'à 250°C et 250°C pendant 10 minutes). La température de l'orifice d'injection a été maintenue à 250 °C et le débit d'hélium à 1,5 mL / min, la tension d'ionisation était à 70 eV. La fibre SPME est placée dans l'injecteur du GC et la plage de balayage du spectre de masse a été fixée à 45-450 (m / z). L'interprétation sur GC-MS-MS à spectre de masse a été réalisée à l'aide de la base de données du National Institute Standard et Technologie (NIST) .Le nom, le poids moléculaire et la formule moléculaire des composants volatiles ont été ensuite déterminés.

**Test d'inhibition d'Acétyl cholinestérase par l'extrait fongique :** Cette étape est effectuée afin de connaître le mode d'action ou l'effet d'extrait sur le système nerveux des insectes traités. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Ache) a été testée selon le protocole décrit par Ellman *et al.* (1961). 150  $\mu\text{L}$  de 100 mM du tampon sodium phosphate (Ph =8) est ajouté au 10 $\mu\text{L}$

différentes concentrations de l'extrait fongique et 20  $\mu$ L Ache, ce mélange est incubé ensuite à 25 °C pendant 15 minutes avant l'ajout de 10  $\mu$ L de DNTB (0.5mM) et 10  $\mu$ L d'acetyl choline iodide (0.71 mM). Des lectures à 412

nm à 0 et 15 minutes ont été effectuées en utilisant un lecteur de plaques et le pourcentage d'inhibition de l'enzyme Ache est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition de l'enzyme Ache (\%)} = \frac{(E - S)}{E} \times 100$$

Où E = l'activité de l'enzyme sans extrait, S = l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

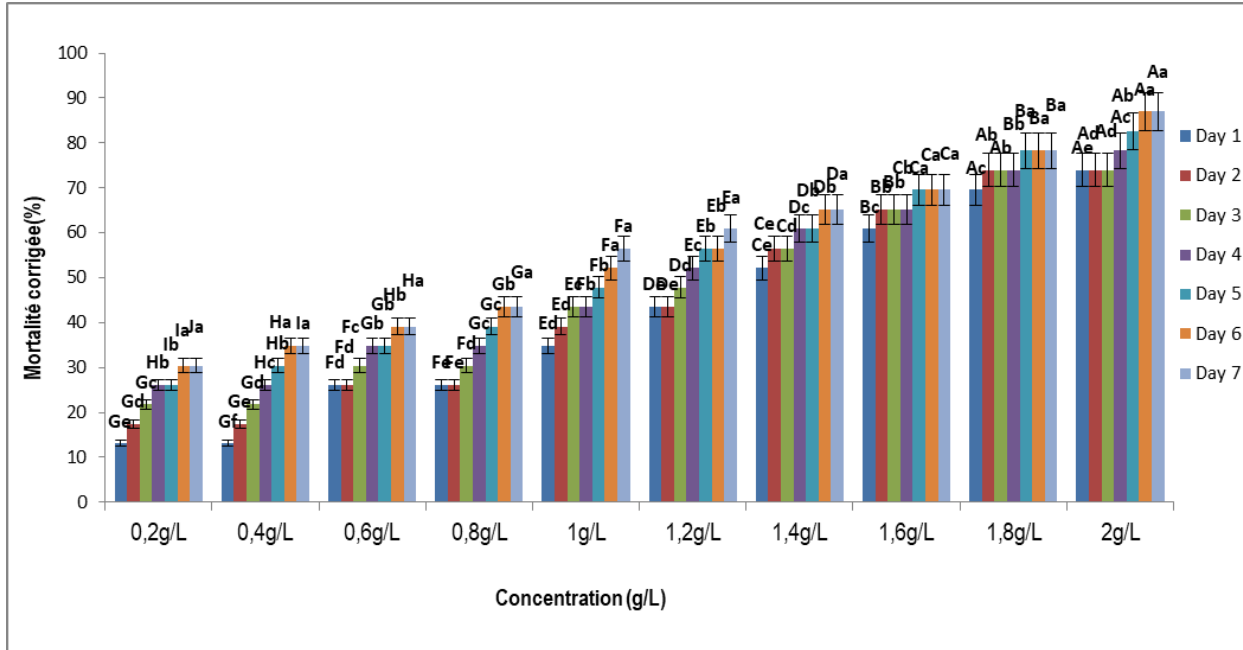
**Analyse des données statistiques :** L'analyse de variance (ANOVA) et le test de Tukey (HSD) (avec un intervalle de confiance de 95%) ont été réalisés afin de comparer et classer en groupes homogènes les valeurs enregistrées du taux de mortalité corrigée et d'inhibition d'Acétyl cholinestérase. La concentration létale 50 (CL50) est calculée à partir de la droite de régression des probits =  $f$  (log dose) correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes des doses de traitement. Les

données des essais de traitement (temps-mortalité) ont été soumises à l'analyse Kaplan-Meier pour obtenir des courbes de survie et des estimations du temps de survie médiane (TL 50). De même, des cartes de chaleur de la mortalité corrigée (activité insecticide) en fonction des différentes concentrations ont été réalisées. Toutes les analyses de données statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel XLSTAT 2019 (Addinsoft, 2019. XLSTAT Statistical Data Analysis Solution, Paris, France).

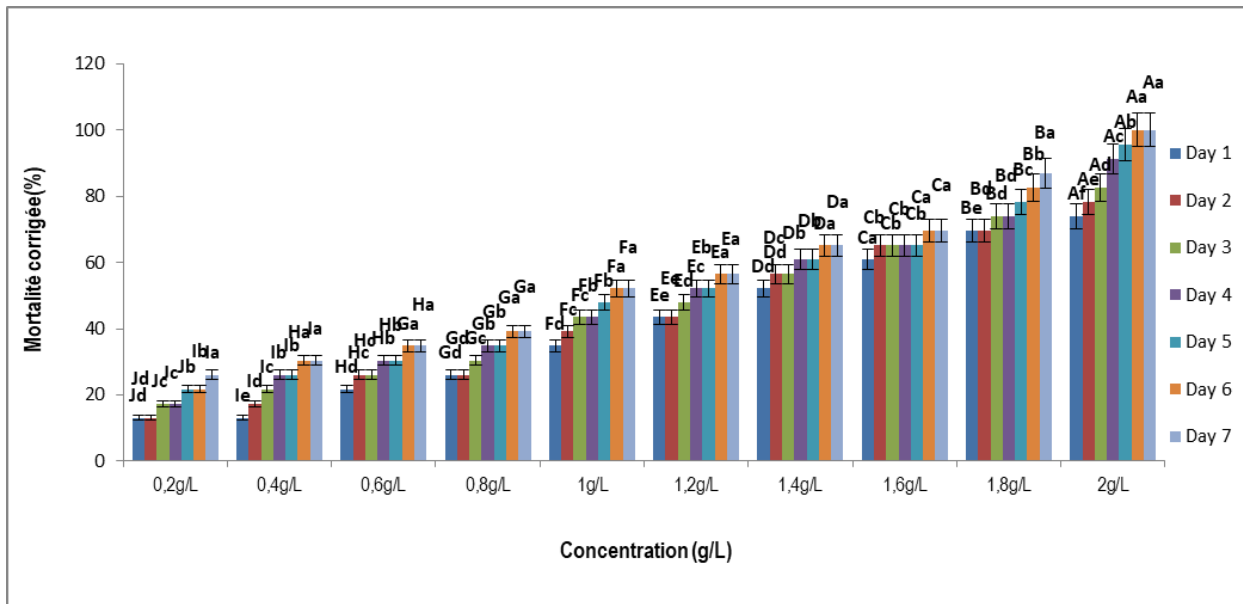
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

**Traitement des insectes de *L. migratoria* par contact et ingestion :** Les résultats du traitement de *L. migratoria* par l'extrait du champignon endophyte *A.niger* par contact et par ingestion montrent qu'il est doté d'une activité insecticide variable selon la concentration utilisée et le temps de traitement. La concentration 2 g/L se montre la plus efficace contre ces insectes avec un taux de mortalité maximale enregistré après 7 jours de 86,95 % pour le traitement par contact et 100% pour le traitement par ingestion .Pour l'analyse

de variance (ANOVA) et le test de Tukey (HSD) (avec un intervalle de confiance de 95%) les lettres majuscules indiquent une différence significative entre l'activité insecticide de différentes concentrations de l'extrait durant différents jours (au niveau de signification de 0,05). Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre l'activité insecticide à différentes concentrations de l'extrait pour le même jour (au niveau de signification de 0,05) (Figures 1,2).



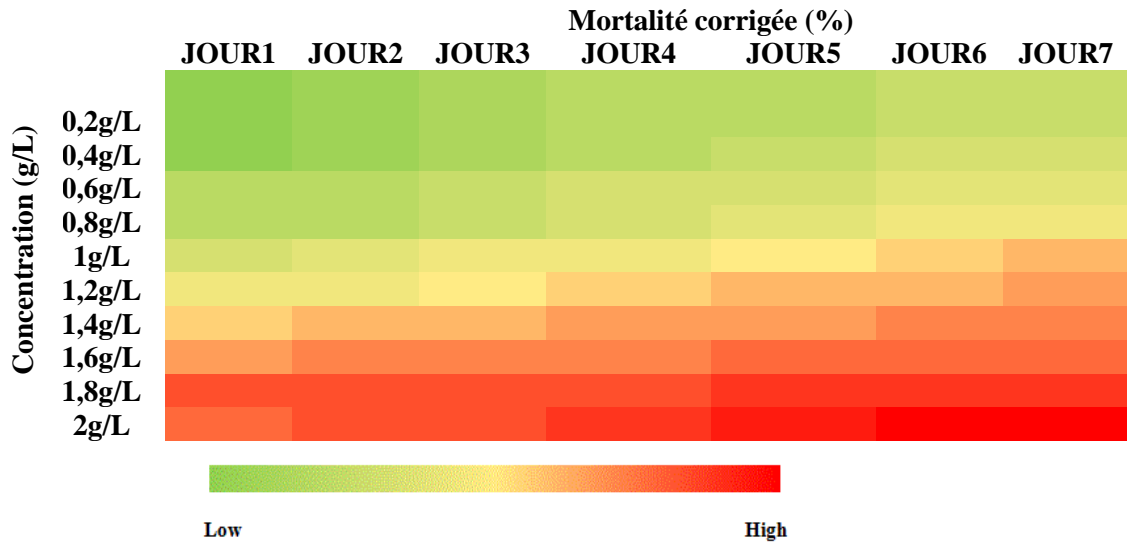
**Figure 1 :** Mortalité enregistrée après traitement par contact avec l'extrait d'*Aspergillus niger*.



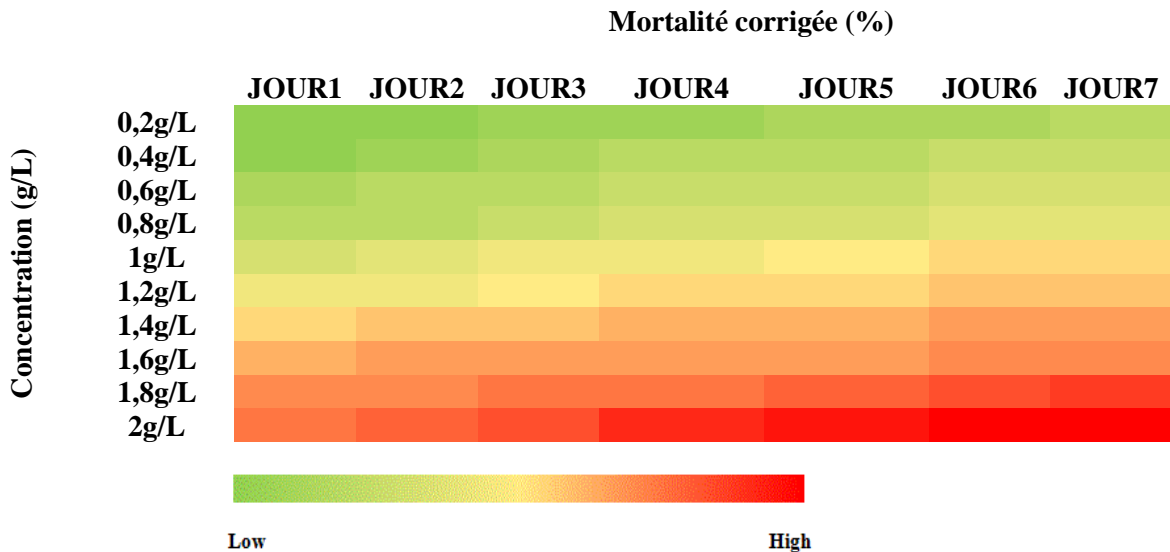
**Figure 2.** Mortalité enregistrée après traitement par ingestion de l'extrait d'*Aspergillus niger*.

Le changement de couleur de la carte thermique du vert vers le rouge signifie une augmentation progressive de la mortalité des

insectes. La concentration la plus efficace contre les insectes est 2 g/L pendant le 7ème jour (Figures 3,4).



**Figure 3.** Carte thermique de la mortalité sous différentes concentrations de l'extrait fongique pour différentes durées d'exposition (traitement de contact de *L. migratoria*).

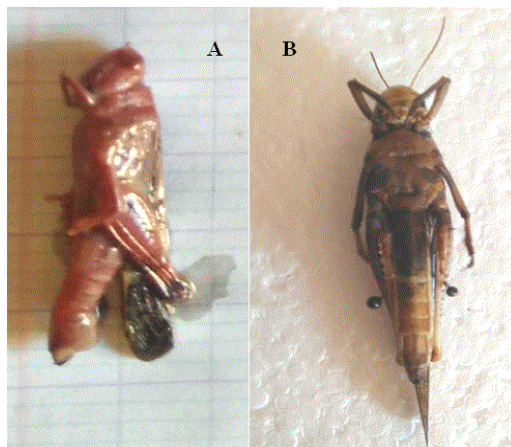


**Figure 4.** Carte thermique de la mortalité sous différentes concentrations de l'extrait fongique pour différentes durées d'exposition (traitement d'ingestion de *L. migratoria*).

Le traitement provoque également un changement de la pigmentation des corps des criquets vers la couleur rouge foncée après traitement par contact et une apparition d'une couleur noire de la face ventrale (position du

tube digestif) après traitement par ingestion. Une réduction de l'activité motrice, des défécations intenses et des diarrhées sont observées chez les individus traités par ingestion d'extrait fongique (Figure 5).





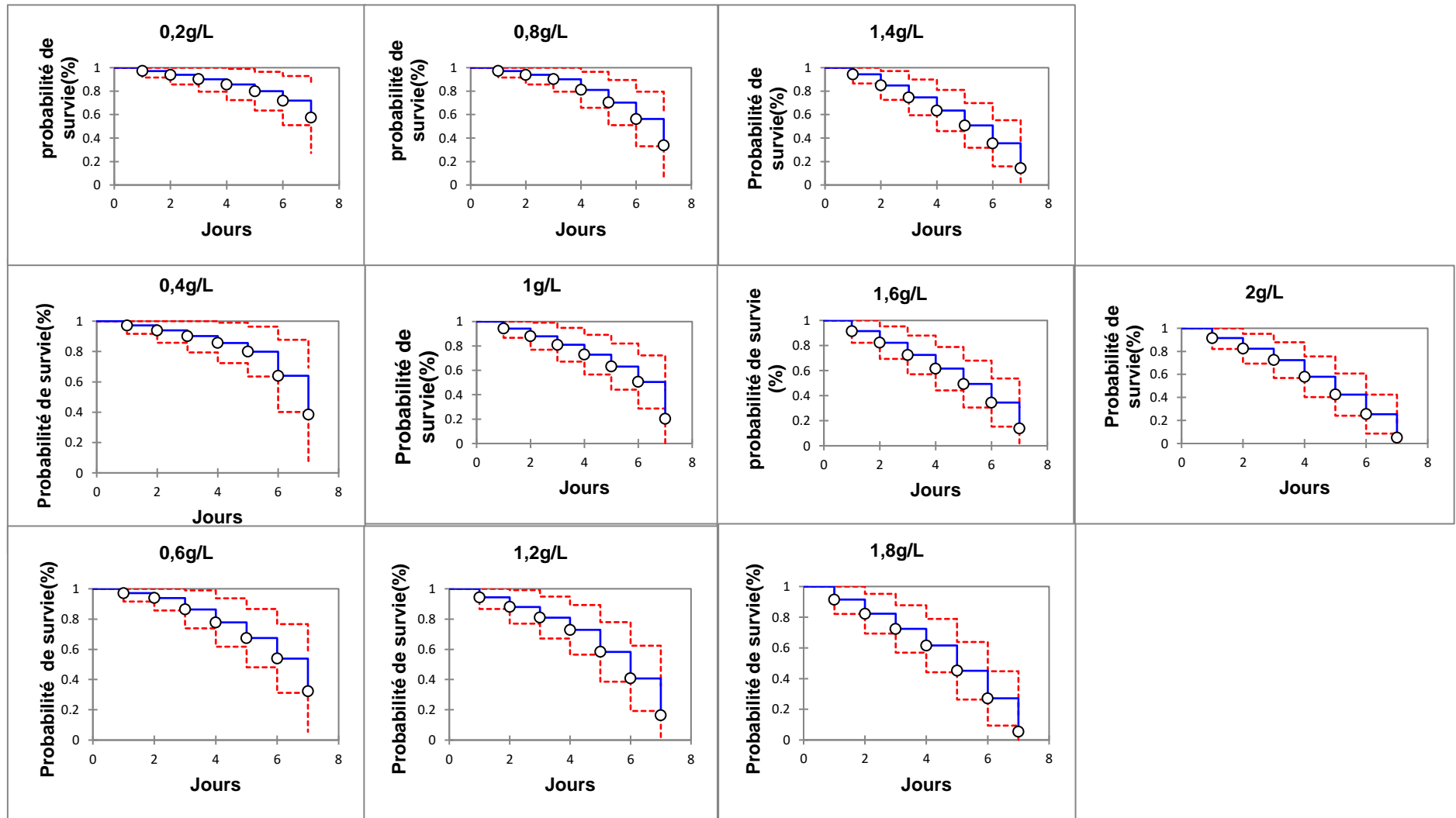
**Figure 5.** Résultats de traitement de *L. Migratoria* par l'extrait fongique :  
A. Traitement par contact, B. Traitement par ingestion.

Les données des essais de traitement (temps-mortalité) ont été soumises à l'analyse Kaplan-Meier pour obtenir des courbes de survie et des estimations du temps de survie médiane (TL 50). L'analyse des TL50 obtenus a montré des valeurs de mortalité de 50% de la population à des temps précis selon la concentration de

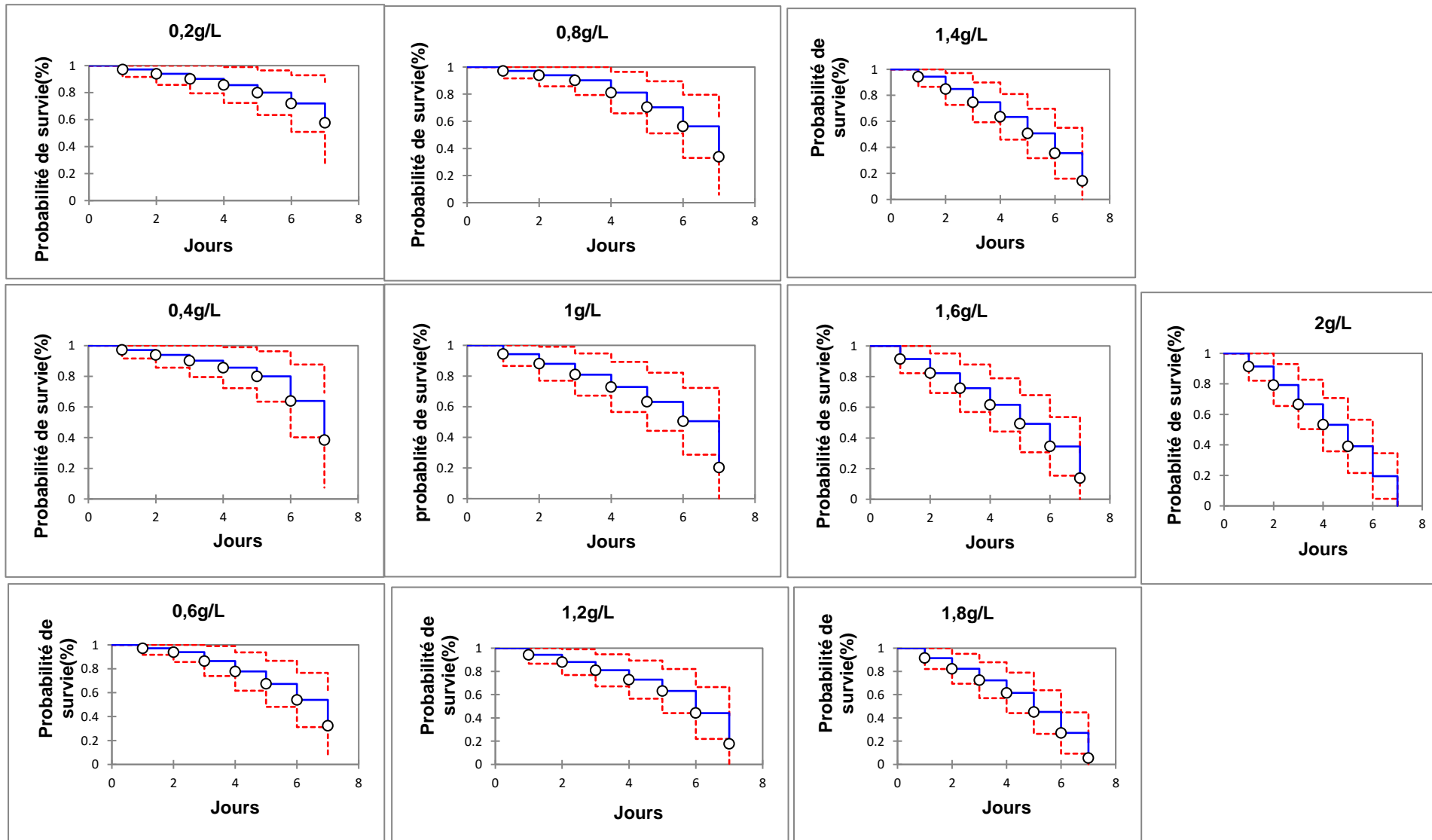
l'extrait fongique allant de 4,490 à 6,187 jours pour le traitement par contact et de 4,72 à 6,187 jours pour le traitement par ingestion. Le TL50 le plus probable obtenu avec la dose 2g/L est de 4,49 jours pour le traitement par contact est de 4,72 pour le traitement par ingestion (Figures 6,7) et (Tableau .1).

**Tableau 1 :** Temps létale 50 pour les différents traitements de *L.migratoria*.

| Concentration (g/L) | TL <sub>50</sub> pour le traitement par contact de <i>L.migratoria</i> .(g/L) (jours) | TL <sub>50</sub> pour le traitement par contact de <i>L.migratoria</i> .(g/L) (jours) |
|---------------------|---|---|
| 0,2                 | 6,187±0,329   | 6,187±0,329   |
| 0,4                 | 6,187±0,323   | 6,0107±0,323  |
| 0,6                 | 5,765±0,344   | 5,765±0,344   |
| 0,8                 | 5,889±0,333   | 5,889±0,333   |
| 1                   | 5,489±0,372   | 5,498±0,372   |
| 1,2                 | 5,435±0,365   | 5,352±0,361   |
| 1,4                 | 5,036±0,368   | 5,036±0,368   |
| 1,6                 | 4,914±0,377   | 4,914±0,377   |
| 1,8                 | 4,799±0,363   | 4,799±0,363   |
| 2                   | 4,490±0,351   | 4,720±0,358   |



**Figure 6.** Courbes de survie Kaplan-Meier des adultes de *L. migratoria* exposés à différentes concentrations de l'extrait fongique (traitement par contact).



**Figure 7.** Courbes de survie Kaplan-Meier des adultes de *L. migratoria* exposés à différentes concentrations de l'extrait fongique (traitement par ingestion).

L'analyse des données (Tableau .2) montre que l'extrait fongique d'*A.niger* est toxique contre les insectes, avec une évolution décroissante des DL50 en fonction des temps, soit des valeurs comprises entre 0,969 à 1,27 pour le traitement par contact et entre 0,459 et 1,297 pour le traitement par ingestion. Donc pour

tuer 50% de la population de *L. migratoria* la meilleure dose à appliquer est 2g/L pour le traitement par contact et par ingestion. Ces résultats révèlent également que l'extrait fongique est plus efficace par ingestion que par contact.

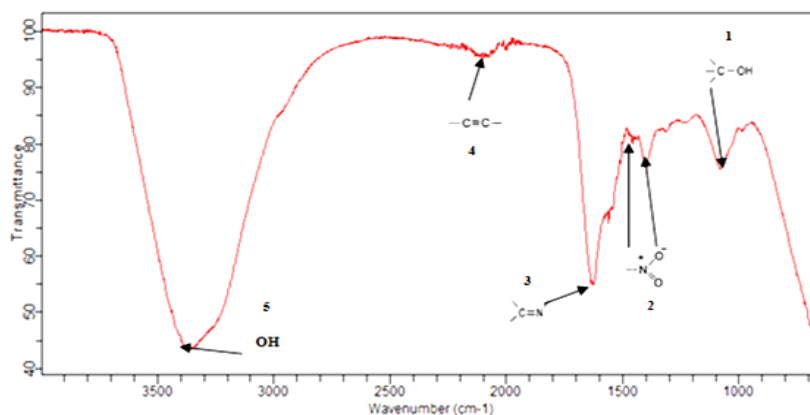
**Tableau 2.** Concentration létale 50 en fonction du temps d'exposition de *L.migratoria* à l'extrait fongique.

| Jours | LC <sub>50</sub> pour le traitement par contact de <i>L.migratoria</i> .(g/L) | LC <sub>50</sub> pour le traitement par ingestion de <i>L.migratoria</i> .(g/L) |
|-------|---|---|
| 1     | 1,270±0,03  | 1,297±0,01  |
| 2     | 1,158±0,08  | 1,156±0,06  |
| 3     | 1,703±0,04  | 1,049±0,03  |
| 4     | 0,954±0,02  | 0,912±0,03  |
| 5     | 0,822±0,07  | 0,841±0,08  |
| 6     | 0,726±0,03  | 0,721±0,04  |
| 7     | 0,969±0,03  | 0,459±0,06  |

**Analyse chimique préliminaire des extraits fongiques :** Les résultats du test chimique préliminaire montre que l'extrait d'*A.niger* contient des polyphénols (couleur verte), la présence d'alcaloïdes (couleur jaune),

terpenoides (couleur marron-rouge), saponines (émulsion assez stable).

**Analyse spectroscopie d'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en réflexion totale atténuée (ATR) des extraits fongiques.**



**Figure 7.** FTIR-ATR de l'extrait d'*Aspergillus niger*. 1. groupe alcool, 2. groupe nitro, 3. groupe imine, 4. groupe alcyne, 5. groupe hydroxyle.

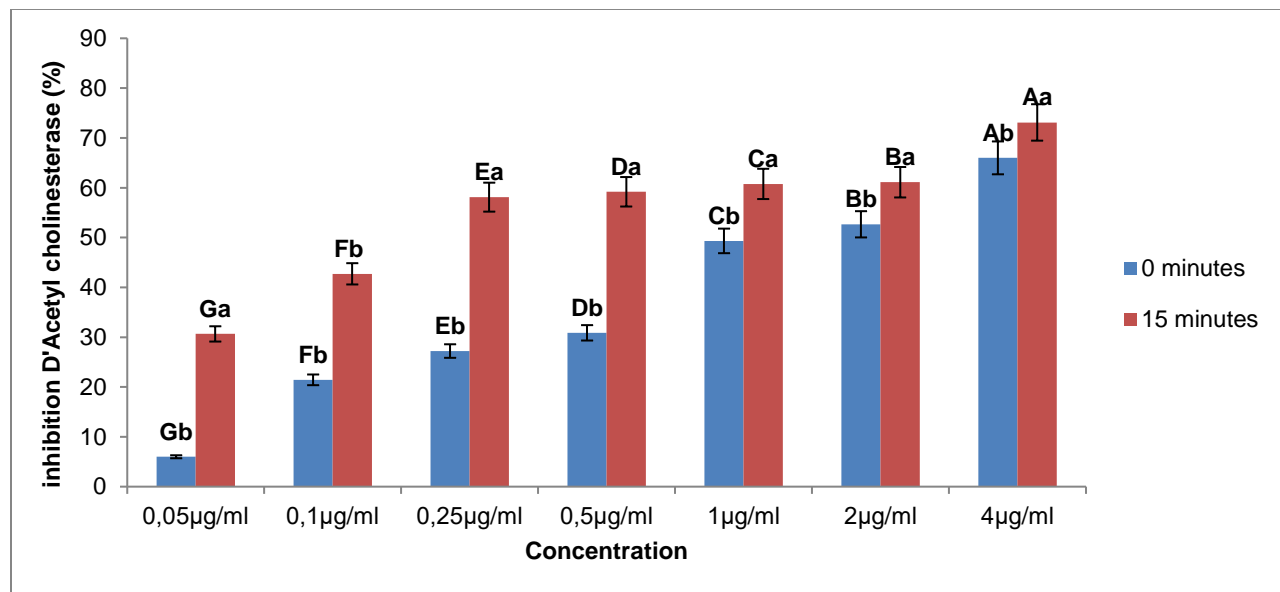
L'analyse FTIR-ATR (Figure.7) de l'extrait d'*Aspergillus niger* a révélé la présence des groupes alcool (1000-1260 cm<sup>-1</sup>), nitro(1250-1400 cm<sup>-1</sup>), imine(1480-1690 cm<sup>-1</sup>), alcyne

(2100-2300 cm<sup>-1</sup>), hydroxyle (3300-3500 cm<sup>-1</sup>).

**Inhibition d'Acétyl cholinestérase par l'extrait fongique :** Les résultats montrent que

l'extrait du champignon endophyte d'*A.niger* est doté d'une activité inhibitrice d'Acétylcholinestérase avec un taux d'inhibition maximale de 73,91 % enregistré après 15 minutes. Pour l'analyse de variance (ANOVA) et le test de Tukey (HSD) (avec un intervalle de confiance de 95%) les lettres majuscules indiquent une différence significative entre l'inhibition d'Acétyl

cholinestérase par différentes concentrations de l'extrait durant différents jours (au niveau de signification de 0,05). Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre l'inhibition d'Acétyl cholinestérase à différentes concentrations de l'extrait pour le même jour (au niveau de signification de 0,05) (Figure .8).

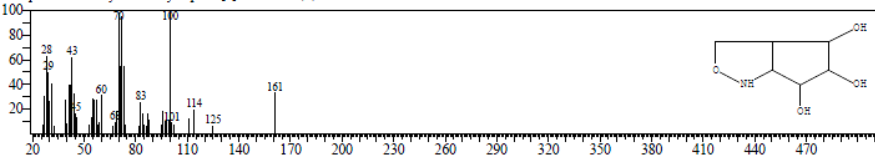
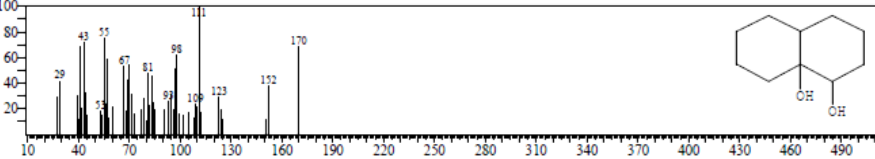
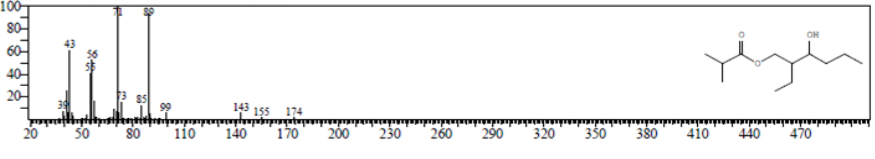


**Figure 8.** Inhibition d'acétylcholinestérase par l'extrait d'*Aspergillus niger*.

**Analyse des composants volatiles produites par les hyphes et présents dans l'extrait fongique :** L'analyse GC-MS-MS des composants volatiles produits par les hyphes fongiques et présents dans de l'extrait fongique

a révélé la présence de : Hexahydro-1H-cyclopenta [c] isoxazole-4,5,6-triol ,2,3,4,4a, 5,6,7,8-octahydro-1H -naphtalène-1,8a-diol et acide propanoïque 2-éthyl-3-hydroxyhexyle. (Tableau.3)

**Tableau 3.** Composants volatiles insecticides produites par les hyphes et présentes dans l'extrait fongique d'*A. niger* au même temps.

| Composé volatile   | Formule  | Poids Moléculaire (g/Mol) | Chromatogramme Obtenu  | Références                |
|--|--|---------------------------|--|---------------------------|
| Hexahydro-1H-cyclopenta [c] isoxazole-4, 5,6-triol       | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> | 161                       | <p>Hit# 3 Entry:84720 Library:W11N17MADN1.lib<br/>                     SI:75 Formula:C6H11NO4 CAS:73111-50-9 MolWeight:161 RetIndex:1560<br/>                     CompName:Hexahydro-1H-cyclopenta[c]isoxazole-4,5,6-triol</p>       | (Chikkula et Raja ,2017). |
| 2, 3, 4,4a, 5, 6, 7,8-octahydro-1H -naphtalène-1,8a-diol | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 170                       | <p>Hit# 3 Entry:107747 Library:W11N17MADN1.lib<br/>                     SI:76 Formula:C10H18O2 CAS:20681-51-0 MolWeight:170 RetIndex:1440<br/>                     CompName:2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-1H-naphthalene-1,8a-diol</p>  | (Herbst, 2015).           |
| Acide propanoïque 2-éthyl-3-hydroxyhexyle                | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> | 216                       | <p>Hit# 4 Entry:87216 Library:NIST17.lib<br/>                     SI:77 Formula:C12H24O3 CAS:74367-31-0 MolWeight:216 RetIndex:1415<br/>                     CompName:Propanoic acid, 2-methyl-, 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester</p>   | (Krzyzowski et al., 2020) |

## DISCUSSION

Les champignons endophytes colonisent les tissus internes de leurs plantes hôtes sans aucun symptôme d'infection apparent conférant à l'hôte une résistance aux insectes nuisibles en produisant des métabolites secondaires bioactifs volatiles et non-volatiles (Kaur, 2020 ; El-Sayed *et al.*, 2020). Parmi les métabolites secondaires non-volatiles, de nombreux alcaloïdes semblent servir principalement pour la plante à se défendre contre une variété d'insectes herbivores par leur effet dissuasif et anti-alimentaire ou toxicité (Taye et Borkataki, 2020). Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires avec une activité répulsive et dissuasive contre un grand nombre d'insectes ravageurs, empêchant ou diminuant le contact plante-insecte et ainsi la transmission de maladies virales (Clouse, 2011 ; Kortbeek *et al.*, 2019). Les alcaloïdes et les terpénoïdes sont aussi considérés comme des toxines neurales agissant sur le système nerveux des insectes (Su *et al.*, 2017). Les composés phénoliques sont métabolites secondaires défensifs qui exercent un effet toxique sur les insectes par ingestion (Kortbeek *et al.*, 2019). Les saponines sont connues pour leur effet insecticide, dissuasif, perturbateur de la mue, régulateur de la croissance des insectes par leur interaction avec le cholestérol, provoquant une perturbation de la synthèse des ecdystéroïdes, ils sont également des inhibiteurs de protéase et cytotoxiques pour certains insectes (Hussain *et al.*, 2019). La détection de groupe hydroxyle, alcool, imine, par FTIR -ATR confirme la présence de phénols et / ou les tanins, de saponines, d'alcaloïdes respectivement dans les extraits fongiques (Sharaf *et al.*, 2013 ; Veiga *et al.*, 2018 ; Lv *et al.*, 2021). Les groupes sulfone, nitro, les éthers d'énol et les dérivés alcynes sont considérés comme des groupes fonctionnels exceptionnels en chimie, utilisés couramment comme intermédiaires clés dans la synthèse de nombreux molécules chimiquement et

biologiquement actives à capacité insecticide (Liu *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2016 ; Nishiwaki, 2020). Parmi les métabolites secondaires insecticides Les isoxazoles qui sont des azoles à capacité insecticide, l'acide propénoïque qui provoque chez *Callosobruchus maculatus*, un effet répulsif, une diminution des pontes et après 24 heures du traitement 100 % des mortalités, le naphthalène qui est un insecticide fumigeant toxique pour les formes adultes et larvaires de nombreux lépidoptères ravageurs, il est également administré par voie orale pour tuer les vers parasites du bétail (Herbst, 2015 ; Chikkula et Raja, 2017 ; Krzyzowski *et al.*, 2020). L'acétylcholinestérase est un enzyme carboxylestérase responsable de l'hydrolyse rapide après la transmission de l'information de l'acétylcholine neurotransmetteur, si cette hydrolyse n'a pas eu lieu, l'augmentation du taux d'acétylcholine induit une activité répétitive des neurones aboutissant à une réduction de l'activité motrice et la mort de l'insecte (Cheung *et al.*, 2012 ; Su *et al.*, 2017).

En plus de réduction de l'activité motrice, des défécations intenses et des diarrhées sont observées chez les individus traités par ingestion d'extrait fongique, ces signes observés sont des signes d'intoxication des criquets dus au extrait fongique (Kemassi *et al.*, 2018). L'application de cet extrait provoque également un changement de la pigmentation des corps des criquets vers une couleur rouge après traitement par contact et l'apparition d'une couleur noire au niveau de l'abdomen (position du tube digestif) après traitement par ingestion. Le pigment responsable de la couleur rouge au niveau de la cuticule des criquets est la  $\beta$ -carotène et donc la couleur rouge foncée observé après traitement est dû à un excès de production de ce pigment (Yang *et al.*, 2019). Le pigment du tube digestif est une mélanine responsable de la couleur noire. La couleur noire foncée observée après traitement est donc dû à une

mélanisation très poussée provoquée par une toxicité intestinale, manque de tonus nerveux grâce aux effets néfastes des extraits sur le système nerveux centrale, une distension et des nécroses cellulaires et une réaction physiologique par les insectes pour essayer de cicatriser les blessures au niveau de l'intestin qui ne peut plus remplir son rôle d'absorption et assimilation des nutriments d'où une carence protéique et lipidique et la mort des insectes (Chauvin, 1956 ; Shamim et al., 2014). En comparaison avec des études de l'activité insecticide des métabolites secondaires produites par les champignons endophytes, le composé 6,8-di-O-méthylbipolarine produit

par *Acremonium vitellinum* est doté d'une bonne activité larvicide contre les larves de troisième stade de *H. armigera* avec une valeur CL50 de 0,72 mg/mL (Yuan et al., 2020). Le champignon endophyte *C. lunata* MRDS 302 a montré une excellente activité insecticide contre les larves de premier stade de *S. cretica* avec un taux de mortalité maximal de 100 % (EL-Lebody et al., 2021). Ces résultats montrent que l'extrait du champignon endophyte d'*Aspergillus niger* constitue une source de métabolites secondaires volatiles et non-volatiles à activité insecticide et peut être utilisé comme insecticide de contact ou ingestion contre *L. migratoria*.

## CONCLUSION ET APPLICATION DES RÉSULTATS

Le traitement de *L. migratoria* par l'extrait du champignon endophyte *A.niger* par contact et par ingestion provoque une réduction de l'activité motrice, une forte activité inhibitrice d'acétylcholinestérase, des défécations intenses, des pertes en eau inhabituelles sous forme des diarrhées, un changement de la pigmentation des corps des criquets vers une couleur rouge et l'apparition d'une couleur noire au niveau de l'abdomen et enfin des mortalités chez les individus traités. Le test chimique préliminaire montre que l'extrait fongique contient de polyphénols, d'alcaloïdes, de terpénoïdes et de saponines.

L'analyse FTIR-ATR a révélé la présence des groupes alcool, nitro, imine, alcyne, hydroxyle. L'analyse des composants volatiles a révélé la présence de volatiles insecticides Hexahydro-1H-cyclopenta [c] isoxazole-4, 5,6-triol, 2, 3, 4,4a, 5, 6, 7,8-octahydro-1H -naphtalène-1,8a-diol et acide propanoïque 2-éthyl-3-hydroxyhexyle. Ces résultats montrent que l'extrait du champignon endophyte d'*Aspergillus Niger* constitue une source de métabolites secondaires volatiles et non-volatiles à activité insecticide et peut être utilisé comme insecticide de contact ou ingestion contre *L. migratoria*.

## RÉFÉRENCES

- Abbott W S, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18 :265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- Berestetskiy A & Hu Q, 2021. The Chemical Ecology Approach to Reveal Fungal Metabolites for Arthropod Pest Management *Microorganisms* 9:1379. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071379>.
- Chauvin R, 1956. Physiologie des insectes. Le comportement, les grandes fonctions, écophysiologie. Edition INRA, Paris. 917 PP.
- Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J, Franklin M C, Height J J, 2012. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* 55 :10282-10286.
- Chikkula K V and Raja S, 2017. Isoxazole a potent pharmacophore. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 9 (7) :13-24.



- Clouse S D, 2011.Brassinosteroid signal transduction: From receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell*23 (4) :1219-1230.
- Dolatabad H K, Nikkhah M J, Shier W T, 2017.Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from *Pistacia vera* *Mycology Progress*16(8) :777-790.
- EL Lebody K A, Mali S S, EL-Metwally F E, Moustafa H Z, Abd-Elaziz M A A ,2021. Isolation and pathogenicity of endophytic fungi associated with some maize hybrids against certain Lepidoptera pests. *Egyptian Journal of Agricultural Research*99 (1):49-60. Doi 10.21608/ejar.2021.58352.1073
- Ellman G L, Courtney K D, Andres V&Featherston R M,1961.A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*7 :88-95.
- El-Sayed AS A, Moustafa A H, El-Sheikh A A, Rady A M, Fathy N A M, Hussein H A, Enan G,Yassin M A,2020.Efficient biocontrol of *Spodoptera littoralis* by *Aspergillus nidulans*, an endophyte of *Lantana camara*. *International journal of pest management*:1-8.<https://doi.org/10.1080/09670874.2020.1771472>.
- Fiers M, Lognay G, Fauconnier M.L,Jijakli H,2013.Volatile Compound-Mediated Interactions between Barley and Pathogenic Fungi in the Soil, *PLoS ONE* 8(6):e66805
- Harborne J B, 1998. Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3<sup>rd</sup>edition.Springer Netherlands, Netherlands, 302 PP
- Herbst M C, 2015. Fact Sheet on Naphthalene.*IARC Monograph* 82:1-6.
- Hussain M, Debnath B ,Qasim M,Bamisile B.S , Hameed M S , Wang L , Qiu D,2019. Role of Saponins in Plant Defense against Specialist Herbivores.*Molecules* 24 :2067 doi: 10.3390/molecules24112067.
- Kaur T, 2020. Fungal Endophyte-Host Plant Interactions: Role in Sustainable Agriculture Fungal. *Sustainable Crop Production*: 1-10. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.92367>.
- Kemassi A, Boual Z, Hadjseyd A, Bouziane N, Herouini A, Mensouri K, Bouras N, Ould el hadj-Kelil A,Ould el hadj M D,2018.Effets biotoxiques des extraits de *cleome arabica* l. (capparidaceae) sur le criquet pelrin *schistocerca gregaria* (forskål, 1775) (orthoptera, acrididae). *Algerian journal of arid environment*8 (2):79-98
- Kortbeek R W J, Van der Gragt M, Bleeker PM, 2019.Endogenous plant metabolites against insects. *European Journal of Plant Pathology*154 :67-90.
- Krzyzowski M, Francikowski J, Baran B, Babczynska A,2020. The short-chain fatty acids as potential protective agents against *Callosobruchus maculatus* infestation. *Journal of Stored Products Research*86:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101570>.
- Le Gall M, Overson R, Cease A, 2019.A Global Review on Locusts (Orthoptera: Acrididae) and Their Interactions With Livestock Grazing Practices, *Frontiers in Ecology and Evolution* 7:263.doi: 10.3389/fevo.2019.00263.
- Li X, Guo Z, Deng Z, Yang J, Zou K, 2015.A New  $\alpha$ -Pyrone Derivative from Endophytic Fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Records of Natural Products* 9 : 503-508.
- Liu A, Yu W, Liu M, Bai J, Liu W, Liu X, Pei H, Hu L, Huang MI, Wang X

- ,2015.Synthesis and Insecticidal Activity of Novel Nitropyridyl-Based Dichloropropene Ethers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:7469-7475.doi: 10.1021/acs.jafc.5b02279.
- Lv M, Ma Q, Zhang S, Xu H, 2021. Agrochemical properties evaluation of some imines alkaloids of matrine/oxymatrine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 48 :128246. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.12.8246>.
- Nishiwaki N, 2020.A Walk through Recent Nitro Chemistry Advances. *Molecules* 25: 3680.doi:10.3390/molecules25163680.
- Ouedraogo R M, Kamp A, Goettel M S, Brodeur J, Bidochka M J, 2002. Attenuation of fungal infection in thermoregulating *Locusta migratoria* is accompanied by changes in hemolymph proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 81 :19-24. doi: 10.1016/s0022-2011(02)00117-9.
- Rahman S F S A, Singh E, Pieterse C M J ,Schenk P M,2018.Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens, *Plant Science*267:102-111.
- Sala A, Spalding K, Ashton K, Board R, Butler H, Dawson T,Harris D A, Hughes C S, Jenkins C A, Jenkinson M D ,Palmer D S,Smith B R,Thornton C A ,Baker M.J,2020. Rapid Analysis of Disease State in Liquid Human Serum combining Infrared Spectroscopy and "Digital Drying". *Journal of Biophotonics* 13(9):e202000118. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000118>.
- Sangbaramou R,Camara I,Xin-zheng H,Shen J,Tan S & Shi W,2018.Behavioral thermoregulation in *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae) in response to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Plos One*13 (11): 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206816>.
- Senthilkumar N, Murugesan S, Suresh Babu D,Rajeshkannan C,2014.GC-MS analysis of the extract of endophytic fungus, *Phomopsis* sp. isolated from tropical tree species of India, *Tectona grandis* L.*International Journal of Innovation* 3(3):10176-10179.
- Shamim G,Ranjan S K,Pandey D M ,Ramani R,2014.Biochemistry and biosynthesis of insect pigments.*European Journal of Entomology*11(2):149-164.
- Sharaf S, Higazy A, Hebeish A, 2013. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. *International Journal of Biological Macromolecules*59 :408-416.
- Shuping D S S and Eloff J N, 2017.The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* (14) 4:120-127.
- Su J, Liu H, Guo K, Chen L, Yang M, Chen Q, 2017. Research Advances and Detection Methodologies for Microbe-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: A Systemic Review. *Molecules*22:1-24.
- Taye R R and Borkataki S, 2020. Role of secondary metabolites in plant defense against insect herbivores. *International Journal of Chemical Studies*8 (1) :139-142.
- Toghueo K R M, 2019. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites *Mycology*, 11(1), 1-21.doi : 10.1080/21501203.2019.1645053.
- Veiga F F, De Castro H L V ,Sato F ,Bombassaro A ,Vicente V A,Mendes V,Baesso M L, Negri M,Svidzinski T I,2018.*Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent.

- Future Microbiology* 13:1745-1756.  
<https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0245>.
- Yan C, Liu W, Li J, Deng Y, Chen S, Liu H, 2018. Bioactive terpenoids from *Santalum album* derived endophytic fungus *Fusarium* sp. YD-2. *RSC Advances* 8:14823-14828.  
<https://doi.org/10.1039/C8RA02430H>
- Yang M, Wang Y, Liu Q, Liu Z, Jiang F, Wang H, Guo X, Zhang J, Kang L, 2019. A  $\beta$ -carotene-binding protein carrying a red pigment regulates body-color transition between green and black in locusts. *eLife* 8:e41362. doi: 10.7554/eLife.41362.
- Yu X, Liu Y X, Li Y, Wang Q, 2016. Design, Synthesis, Acaricidal/Insecticidal Activity, and Structure-Activity Relationship (SAR) Studies of Novel Oxazolines Containing Sulfone/Sulfoxide Groups Based on the Sulfonyleurea Receptor Protein Binding Site. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(15):3034-3040. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00645.
- Yuan X L, Wang X F, Xu K, Wei L, Dan C, Zhang P, 2020. Characterization of a New Insecticidal Anthraquinone Derivative from an Endophyte of *Acremonium vitellinum* against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68 (41):11480-11487.  
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05680>
- Zhang L and Lecoq M, 2021. *Nosema locustae* (Protozoa, Microsporidia), a Biological Agent for Locust and Grasshopper Control. *Agronomy* 11:711. <https://doi.org/10.3390/agronomy1104071>.