



HAL
open science

Etude de la diversité des bactéries du sol et caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus* *thuringiensis* actives sur les diptères

Mandy C. Antoun

► To cite this version:

Mandy C. Antoun. Etude de la diversité des bactéries du sol et caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* actives sur les diptères. Bactériologie. Université Montpellier; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté des Sciences, 2015. Français. NNT : 2015MONT288 . tel-03219678

HAL Id: tel-03219678

<https://theses.hal.science/tel-03219678v1>

Submitted on 6 May 2021

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

**Délivré par L'université de Montpellier II -Sciences et
techniques du Languedoc-
Et par l'Université Saint-Joseph de Beyrouth -Faculté
des Sciences**

**Préparée au sein de l'école doctorale Sciences
Chimiques et Biologiques pour la Santé**

Spécialité : Biochimie-Microbiologie

Présentée par ANTOUN C. Mandy

**Etude de la diversité des bactéries du sol et
caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus
thuringiensis* actives sur les diptères**

**Sous la direction de : Joël CHOPINEAU (France)
Mireille KALLASSY AWAD (Liban)**

Travail réalisé en cotutelle :

Institut Charles Gerhardt, UMR5253 CNRS-ENSCM-UM, Montpellier, France
Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université Saint -Joseph
de Beyrouth

Soutenue le 17 décembre 2015 devant le jury composé de :

M. Roger LTEIF	Professeur, Université Saint-Joseph de Beyrouth	Président
M. Mike OSTA	Professeur associé, Université Américaine de Beyrouth	Rapporteur
M. Slim TOUNSI	Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax	Rapporteur
Mme Sophie GAUDRIAULT	Chargée de Recherche, INRA	Examineur
Mme Laure EL CHAMY	Maitre de conférences, Université Saint-Joseph de Beyrouth	Examineur
Mme Mireille KALLASSY AWAD	Professeur, Université Saint-Joseph de Beyrouth	Directeur
M. Joël CHOPINEAU	Professeur, Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS/ENSCM/UM	Directeur

DÉDICACES

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous
donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

*Avec un honneur, je dédie cette thèse
à celui pour qui ma réussite lui tient à cœur :*

*À mon très cher Papa **Charbel** pour son
soutien moral de là-haut, pour ses prières
continues, pour ses sentiments d'amour et
d'affection qui représentent pour moi le pilier
de tous mes efforts.*

Remerciements

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre la Faculté des Sciences de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth et l'Université Montpellier 2 de France avec le soutien financier du Conseil National de la Recherche Scientifique Libanais (CNRSL), de l'Université de Montpellier 2 (UM2) et du Conseil de la Recherche de l'Université Saint-Joseph (FS59). Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisées sur deux sites: en France, au sein de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM - UMR 5253) et au Liban, dans le Laboratoire de biotechnologie de l'unité de recherche : Technologies et Valorisation Alimentaire.

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

Mes remerciements sont tout d'abord dédiés à Dieu qui a veillé continuellement sur mon parcours et qui m'a été ma lumière malgré toutes les difficultés.

Ma grande reconnaissance revient au Professeur Toufic Rizk et au Doyen de la faculté des Sciences le Professeur Richard Maroun pour leur soutien surtout moral, leur écoute et pour les facilités et les moyens que vous fournissez en faveur des laboratoires de recherche.

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse français Professeur Joël Chopineau. Je vous remercie pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions. Je garderai dans mon cœur vos consignes pour être un bon chercheur scientifique. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement.

Professeur Mireille Kallassy Awad, un grand Merci ! Merci pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. Ca fait déjà 8 ans que je suis à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours

beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils. Vous avez été mon prof et mon amie, nous nous tenions les mains aussi bien dans les moments difficiles que dans les périodes de joie. Votre connaissance m'a beaucoup marquée et j'espère que nous nous croiserons dans le futur proche.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma co-directrice de thèse le maître de conférence Laure El Chamy à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et ses qualités humaines. Mme Laure je m'incline devant vos compétences scientifiques que je ne cesse d'admirer. Merci d'avoir été toujours là pour moi !

Merci Mr Joseph Yaghi pour votre présence à mes côtés au laboratoire et pour vos conseils en microbiologie

Mes travaux de thèse ont porté également sur des recherches effectuées à l'Institut de Biotechnologies Environnementales de Graz en Autriche. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Gabrielle Berg et au Dr. Henry Muller pour le temps qu'ils ont consacré pour suivre continuellement mes travaux et pour leurs discussions scientifiques pertinentes.

Un remerciement particulier à Dr Mike Osta et Dr Zakaria Kambris pour m'avoir donné l'opportunité de faire les tests *in vivo* chez eux à l'AUB. Je vous remercie pour cette collaboration qui a été fructueuse.

Je suis très reconnaissante à toute l'équipe avec laquelle j'ai travaillé à Graz, et je tiens à remercier particulièrement M^{mes} Martina Koberl et Christin Zachow pour leur disponibilité et leur aide. Je remercie également l'équipe française qui m'a accueilli chaleureusement et avec qui j'ai passé des moments agréables et inoubliables. Jean-Marie, Philippe, Pradial, Anne, Sylvie, Marie, Christophe, Kader, Sophie, Taher, Neila, Nayma, Remi, Hinda, Estelle et Corinne sachez que j'apprécie tout ce que vous avez fait pour moi et je suis très chanceuse d'avoir rencontré des amis assez aimables comme vous.

Du côté Libanais, j'ai été entouré par des collègues très plaisants dont leur présence au cours de ma thèse m'a beaucoup marquée. Jihane je te remercie pour tes conseils sur la paillasse. Je remercie de même Jhonny et Layla de l'AUB qui ne cessaient de me conseiller pour les tests *in vivo*. Rana et Nay, je

vous remercie pour cette amitié, et votre joie de vivre. Nancy, Rosy, Georges, Mohammad et Karen je vous remercie pour votre aide et je ne vous espère rien que le meilleur. Abdallah tu as conquis ta place rapidement au laboratoire et tout le monde t'a apprécié. Tu es pour moi mon petit frère et je te souhaite un futur prometteur. Finalement, Zaynoun et Dana je n'oublierai jamais les pauses passées ensemble où nous parlions de tout sauf de la recherche.

Rhéa ! Je remercie Dieu de t'avoir mis sur ma route. Tu t'impliquée d'une façon intense moralement durant ces 3 années comme s'il s'agissait de ta thèse. Je suis honorée d'avoir partagé ces moments inoubliables avec toi. Tu m'as soutenue durant les périodes les plus dures pour que je puisse atteindre mon objectif, tu le sais bien... et tu as profité des moments d'allégresse que nous avons vécus ensemble. Tu as été mon appui, je perds mes mots devant ta bonté et je ne peux cesser de t'adresser mes remerciements pour tous tes conseils. Je n'oublierai jamais la troisième personne de cette amitié, Rita. Je suis certaine que nous allons nous rappeler des moments les plus marrants passés ensembles où vous passiez au laboratoire pour me les raconter afin de mettre de l'ambiance positive à mon travail. Merci beaucoup d'avoir été là !

Je termine mes remerciements en adressant mon entière reconnaissance à ma famille, qui m'a toujours aid e et soutenue physiquement et moralement en France et au Liban. Nous avons fait face ensemble à des moments difficiles et j'espère que vous êtes fiers de moi.

Papa ! J'ai aimé t'offrir comme je t'avais promis en 2011 cette thèse en mémoire de ton  me. Tous mes travaux de ces 3 ans ont été honorablement dédiés pour toi et toute ma vie le sera aussi. Sans toi, je ne serai pas là où je suis. Tu m'as appris la persévérance et la foi malgré toutes les difficultés. J'espère que tu es fier de moi jusqu'à maintenant et je te remercie pour ton omniprésence.

Etude de la diversité des bactéries du sol et caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* actives sur les diptères

Résumé

Les études de la diversité et de la richesse bactérienne des sols constituent un enjeu primordial pour développer des bio pesticides efficaces en lutte biologique contre les diptères phytoravageurs et vecteurs de maladie (malaria, dengue...). Dans ce manuscrit, la caractérisation de la diversité bactérienne des sols de chênes et de pins Libanais a été étudiée par comparaison aux mêmes sols d'Autriche, une zone géographique différente et de climat différent. La composition en classes et genres du phylum des *Firmicutes* et son abondance dans les différents sols étudiés ont été particulièrement caractérisées par des indices de diversité (alpha, bêta, OTUs...) et des méthodes moléculaires (SSCP et qRT-PCR). A partir des sols de pins et de chênes Libanais et précisément à partir de ce phylum, des souches de *Bacillus thuringiensis* ont été criblées pour leur activité insecticides contre les diptères, *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* et *Anopheles gambiae*. Deux souches de *Bt* ont été sélectionnées. La souche A23 possède une toxicité *in vivo* plus élevée que la souche de référence *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*). Cette souche n'a cependant pas révélé de différences génétiques et moléculaires par rapport à *Bti*. La souche H3, quant à elle, a été étudiée étant non cytolytique et présentant une activité insecticide *in vivo* contre les diptères mais à fortes concentrations par rapport à *Bti*. Cette souche a révélé un contenu génique et protéique différent de *Bti*. H3 a probablement un nouveau variant du gène *cry4B* et du gène *cry40* connu pour avoir une activité diptéricide. Des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats et de comprendre les mécanismes de toxicité de ces deux souches.

Mots-clés : Diversité bactérienne, lutte biologique, diptères, chênes, pins, libanais, Autriche, *Firmicutes*, *Bacillus thuringiensis israelensis*, toxicité *in vivo*, non cytolytique, *cry*.

Liste des abréviations

X	Fois
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
APS	Persulfate d'Ammonium
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
g	Gramme
H	Heure
Min	Minutes
sec	Secondes
kDa	Kilo daltons
LB	Luria-Bertani
LC ₅₀	Concentration létale qui tue 50 % des populations
M	Molaire
mL	Millilitre
µL	Microlitre
mM	Millimolaire
MW	Marqueur de poids moléculaire
pb	Pair de base (bp: base paire)
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Polymerase Chain Reaction quantitative
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
rpm	Round per minute (tour par minute)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris acétate EDTA
TEMED	Tétraméthyl-éthylènediamine
δ-endotoxine	Delta-endotoxine
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>

Cx.	Culex
An.	Anopheles
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
APN	Amino peptidase
ALP	Phosphatase Alcaline
Ba	<i>Bacillus anthracis</i>
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i>
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
BBM	Membrane de la bordure en brosse de l'intestin moyen
BBMV	Vésicules membranaires de la bordure en brosse
BSA	Albumine du sérum bovin
CAD	Cadhérine CR: répétition de la cadhérine
Ct	Carboxy terminal
Nt	Amino terminal
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. kuehniella</i>	<i>Ephestia kuehniella</i>
EDTA	Acide ethylenediaminetetraacétique
GPI	Glucosylphosphatidylinositol
<i>P. xylostella</i>	<i>Plutella xylostella</i>
Cyt	Cytolytique

Liste des figures

- Figure 1:** Représentation schématique des diversités alpha, bêta et gamma d'une communauté bactérienne (Saeki, Y., et al., 2014).27
- Figure 2:** Emplacement des couples d'amorces 27f/1492r et BLS342f/ BACr833^P sur la séquence du gène 16S ARNr (adapté de <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>).....32
- Figure 3:** Structures secondaires prédites des séquences Box répétées. Ces structures sont obtenues après alignement de 30 séquences du génome de *S. pneumoniae* ATCC 700669. Les limites entre les différentes séquences sont marquées sur l'image. Les appariements de base sont colorés en fonction de leur conservation dans l'alignement : des couleurs différentes sont utilisées pour indiquer les nombres différents d'interactions compatibles au niveau de cette structure (Adapté de Croucher, N. J., et al., 2011).35
- Figure 4. A :** Schéma représentatif du cycle vital de *Bacillus thuringiensis*. 1: germination (réhydratation de la spore), 2 : germination (production de la cellule végétative), 3 : croissance et multiplication des cellules végétatives, 4 : sporulation (formation de la spore (S), et l'inclusion cristalline (C), 5 : lyse et éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et de l'inclusion cristalline, 6 : période de dormance lors des conditions défavorables. (DR. J. O. Lacoursière et Dr. J. Boisvert, université du Québec à Trois-rivieres) **B :** Représentation schématique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis*. Abréviations: M, mésosome; CW, cellule mure ; PM, membrane plasmique ; AF, filament axiale; FS, septum de la préspore; SI, préspore naissante; OI, inclusion ovoïde ; PC, cristal

parasporal ; F, présore ; IM, membrane interne ; OM, membrane externe ; PW, paroi cellulaire primordiale ; E, exosporium ; LC, manteau lamellaire de la spore ; OC, manteau externe de la spore ; C, cortex ; IMC, cytoplasme de la cellule mère ; S, spore mature (Bechtel, D. B., et al., 1976).53

Figure 5 : Manifestation de *Bacillus thuringiensis* une fois ingérée par les larves d'insecte et processus d'intervention des protéases et d'autres métabolites sécrétés par Bt (Raymond, B., al., 2010).....61

Figure 6 : Les positions des blocs conservés au niveau des protéines Cry. Le schéma représente quelques protéines Cry et les arrangements de séquences pour chaque holotype de toxine (ex: Cry1Aa1). Les séquences des blocs sont représentées en gris foncé, gris clair ou blanc faisant référence aux degrés d'homologie hauts, moyens et faibles respectivement (Adapté de Schnepf, E., et al., 1998).66

Figure 7 : Représentation en ruban du repliement des protéines Cry4Aa et Cry4Ba de Bti. (A) Vue d'ensemble de la toxine Cry4Aa, qui est composée de trois domaines : domaine I de formation de pores est en rouge, le domaine II est celui de la fixation au récepteur putatif et représenté en jaune, et le domaine III C-terminale en bleu. Les éléments de structure secondaire de chacun des trois domaines sont marqués dans les panneaux B à D. Chaque feuillet β individuel est d'une couleur différente. (E) La structure tridimensionnelle des domaines I, II et III de Cry4Ba : le domaine I (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine II (feuillet bêta) en vert et le domaine III (feuillet bêta) en rouge (Boonserm P, et al., 2006 et Angsuthanasombat, C., et al., 2004).....72

- Figure 8 :** Alignement des domaines I, II et III des protéines Cry (Cry4Aa, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4B, Cry5B et Cry8Ea) et comparaison de leur structure. Les dispositions des structures secondaires : hélices α , hélices 3_{10} η (Barlow, D. J., et al., 1988) et brins β de Cry4Aa sont représentées au début de chaque alignement. La figure a été préparée par ESPript (Adapté de Xu, C., et al., 2014).....74
- Figure 9 :** Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1A : les hélices α sont marquées en lettres et les feuillets β en chiffres (Butko, P. 2003).76
- Figure 10 :** Exemples d'activation des protoxines chez les lépidoptères (A : Cry1Aa) et les diptères (B : Cry4Aa). Les protoxines sont activées sous l'action combinée des protéases bactériennes et intestinales des larves d'insectes cibles. (A) : La toxine activée est hachurée et les régions tronquées de la protoxine sont symbolisées en pointillés. Adapté de Rukmini, V., et al., 2000. (B) : Les flèches indiquent les sites de clivage par le jus intestinal des larves de diptères. Les domaines putatifs et les cinq blocs sont également représentés (Adapté de Yamagiwa, M., et al., 1999).....87
- Figure 11 :** Mode d'action des toxines Cry selon les trois modèles. (A) : Le modèle de Bravo, (B) : Le modèle de Zhang et (C) : Le modèle de Jurat-Fuentes (Adapté de Pardo-Lopez, L., et al., 2009, Gordon, R.L., et al., 1973, Pigott, C.R., et al., 2007).95
- Figure 12 :** Les deux modes d'action proposés de la protéine Cyt1A. (1) La toxine soluble dans le milieu extracellulaire. (2) La toxine s'approche de la membrane lipidique, change de conformation et se lie aux lipides de la membrane. (3) La toxine soit elle s'insère dans la

membrane lipidique où elle forme des pores oligomériques, soit elle forme des agrégats et s'allonge le long de la surface de la membrane qui se fragmente en plusieurs complexes lipides-toxines. Les molécules intracellulaires (cercles noirs) fuient soit à travers les pores soit à travers la membrane lipidique fragmentée et déstabilisée (Butko, P. 2003).98

Figure 13 : Rôle des toxines Cyt et Cry dans l'intoxication des larves de diptères. (1) Solubilisation et activation des toxines Cry et Cyt ; (2) La toxine Cyt s'insère dans la membrane et la toxine Cry se fixe aux récepteurs membranaire ; (3) Induction de l'oligomérisation des toxines Cry ; (4) L'oligomère s'insère dans la membrane conduisant à la formation des pores (Adapté de Bravo A., et al., 2008). 101

Figure 14 : Photographie de *Culex pipiens* femelle..... 112

Figure 15 : Photographie d'une femelle d'*Aedes albopictus* piquant sa proie.. 112

Figure 16 : Photographie d'*Anopheles gambiae* 113

Figure 17 : Mécanismes de la résistance aux toxines selon chaque étape de leur mode d'action dans l'intestin moyen des larves de diptères. En noir, le nom de chaque étape du mode d'action des toxiques avec les numéros correspondants sur le schéma. En rouge, les mécanismes de résistance possibles pour chaque étape..... 119

Liste des tableaux

- Tableau 1** : Classification courante de 67 sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* basée sur leur antigène flagellaire (H)^a (WHO, 1999).51
- Tableau 2** : La nomenclature originale et actuelle de certains gènes *cry*, leurs groupes protéiques, les sous-espèces de *Bt* à partir desquelles elles ont été isolées et leurs principaux insectes cibles. (N / a: Non disponible ou Not available).65
- Tableau 3** : Les variants des gènes *cry* et *cyt* de *Bti*, leur région codante, leur position sur le plasmide pBtoxis, les protéines qu'ils codent, la taille de leurs toxines activées ainsi que le spectre de toxicité *in vivo* de leurs toxines et leur spectre de toxicité (*Ae*: *Aedes*, *Cx*: *Culex*, *An*: *Anopheles*).84
- Tableau 4** : Les différents variants des autres protéines impliquées dans la toxicité contre les diptères107

Table des matières

Résumé.....	1
Liste des abréviations.....	2
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	8
Table des matières.....	9
Introduction Générale.....	13
Synthèse Bibliographique.....	18
I. La diversité microbienne des sols.....	19
I.1. La microflore du sol.....	20
I.1.1. Les phyla bactériens du sol.....	21
I.1.2. Facteurs influençant la structure des communautés bactériennes des sols.....	23
I.1.2.1. Les facteurs abiotiques.....	24
I.1.2.2. Les facteurs biotiques.....	25
I.2. Les paramètres de mesure de la biodiversité des sols.....	25
I.2.1. Les OTUs (Operational Taxonomic Units).....	27
I.2.2. Indice et courbe de raréfaction.....	28
I.2.3. Indices de diversité.....	28
I.3. Les méthodes moléculaires d'analyse des communautés bactériennes.....	30
I.3.1. Les régions des gènes utilisées pour le géotypage.....	30
I.3.1.1. L'ADN ribosomique 16S.....	30
I.3.1.2. Régions ITS des 16S-23S ARNr.....	33
I.3.1.3. Les gènes de ménage (Housekeeping genes).....	34
I.3.1.4. Les éléments BOX.....	34
I.3.2. Descriptif des méthodes moléculaires d'analyse microbienne.....	36
I.3.2.1. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et PCR ribotyping.....	36
I.3.2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	37
I.3.2.3. Rep-PCR: Box-PCR.....	37

I.3.2.4.	DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)	39
I.3.2.5.	SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	40
I.3.2.6.	RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) /ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).....	41
I.3.2.7.	MLST (Multi- Locus Sequence Typing).....	41
I.3.2.8.	Méthodes basées sur l'hybridation	42
I.3.2.9.	Méthode de séquençage : Illuminaseq	42
II.	L'intérêt de l'étude de l'écologie des sols	44
II.1.	Les « <i>Firmicutes</i> » des sols.....	45
II.2.	<i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i>	48
II.2.1.	Historique	48
II.2.2.	Identification et classification des sous-espèces de <i>Bt</i>	49
II.2.3.	Cycle de croissance de <i>Bt</i>	51
III.	<i>Bt</i> : Bactérie modèle pour la lutte biologique	54
III.1.	Différents facteurs insecticides produits par <i>Bt</i>	54
III.1.1.	Bêta-Exotoxines (ou Thuringiensin).....	54
III.1.2.	Protéines Insecticides Végétatives (VIP)	55
III.1.3.	Zwittermicin A	55
III.1.4.	Chitinases.....	56
III.1.5.	Protéine Insecticide Secrétée (Sip).....	56
III.1.6.	Sphaéricolysines et Alvéolysines	57
III.1.7.	Protéines accessoires P19 et P20	57
III.1.8.	Le cristal parasporal (les delta-endotoxines ou δ -endotoxines)	58
III.1.9.	Les protéases secrétés par <i>Bt</i>	58
III.2.	Génomes et plasmides de <i>Bt</i>	61
III.3.	Les protéines Cry et Cyt : classification, diversité et structure	62
III.3.1.	Classification et diversité.....	62
III.3.2.	Structures des δ -endotoxines Cry	68

II.3.2.1. Domaine I	68
II.3.2.2. Domaine II	70
II.3.2.3. Domaine III	71
III.3.3. Structure des protéines Cyt.....	74
III.4. Régulation de l'expression des gènes <i>cry</i> codant pour les delta-endotoxines	76
III.4.1. Régulation transcriptionnelle	77
III.4.2. Régulation post-transcriptionnelle.....	79
III.4.3. Régulation post-traductionnelle.....	79
III.4.4. Répression catabolique par le glucose	80
III.4.5. Régulation métabolique par la polyphosphate kinase (PPK)	80
III.4.6. Régulation par le facteur sigma 54.....	81
III.4.7. Régulation par deux facteurs négatifs.....	82
IV. Les principaux gènes <i>cry</i> codant pour des δ -endotoxines actives sur les diptères	82
IV.1. <i>Bacillus thuringiensis serotype israelensis (Bti)</i> et son contenu génique	82
IV.2. Mode d'action des toxines Cry and Cyt chez les diptères	85
IV.2.1. Etape 1 : L'ingestion	85
IV.2.2. Etape 2 et 3 : Solubilisation et Activation.....	85
IV.2.3. Etape 4 : Fixation au(x) récepteur(s) membranaire(s)	87
IV.2.4. Mode d'action des protéines cytolytiques Cyt.....	96
IV.2.5. Particularités des toxines mineures produites par <i>Bti</i>	98
IV.2.6. Complexité des mélanges et synergisme entre les toxines.....	99
V. Autres fonctions des δ -endotoxins de <i>Bti</i>	101
VI. Nouvelles δ -endotoxines identifiées à activité sur les diptères	103
V.1. Cry56Aa1	103
V.2. Cry44A	104
V.3. Cry20Aa.....	104
V.4. Cry19A	105
V.5. Cry16A	105

V.6.	Cry29A et Cry30A.....	105
V.7.	Cry54Aa1 et Cry30Fa1	106
V.8.	Cry30Ga1	106
VII.	Le contrôle biologique des diptères	108
VIII.	La résistance aux toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	114
VIII.1.	La résistance des insectes au <i>Bti</i>	115
VIII.2.	Mécanisme de la résistance	116
VIII.3.	Résistances croisées entre toxines	119
	Objectifs de la thèse	121
	Chapitre 1	123
	Etude de la diversité bactérienne des sols de chênes et de pins Libanais et Autrichiens	123
I.	Présentation de l'étude	124
II.	Contribution scientifique sous forme d'article.....	125
	Chapitre 2	158
	Identification et caractérisation d'une souche Libanaise de <i>Bacillus thuringiensis</i> hautement toxique contre les diptères.....	158
I.	Présentation de l'étude	159
II.	Contribution scientifique sous forme d'article.....	160
	Chapitre 3	189
	Identification et caractérisation d'une nouvelle souche de <i>Bacillus thuringiensis</i> H3 non cytolytique isolée du sol Libanais et active sur les diptères.....	189
I.	Présentation de l'étude	190
II.	Contribution scientifique sous forme d'article.....	191
	Discussions générales et perspectives	223
	Conclusion générale	229
	Annexes	231
	Références.....	238

Introduction Générale

Au cours des 50 dernières années, la protection des cultures agricoles a beaucoup compté sur l'utilisation des pesticides chimiques, mais leur disponibilité est maintenant en déclin en raison de nouvelles législations et surtout de l'évolution de la résistance dans les populations de ravageurs. En effet, l'utilisation courante de ces produits chimiques a mené à de graves problèmes. Certains de ces produits se sont révélés extrêmement toxiques pour les organismes non visés et dans de nombreux cas ils sont délétères pour la santé de l'Homme et des animaux. A titre d'exemple, ils induisent des maladies humaines graves, comme le cancer et les troubles du système immunitaire et nerveux. En outre, d'un point de vue nuisance environnementale, ces produits chimiques polluent le sol et les nappes phréatiques. Par conséquent, l'élaboration d'autres tactiques alternatives de lutte biologique est nécessaire.

Le concept de lutte biologique se définit comme un phénomène existant à l'état naturel et résultant des relations écologiques entre espèces vivantes. Le développement d'agents efficaces de lutte biologique est l'un des défis majeurs du 21^e siècle afin d'assurer un environnement durable. Des échantillons de sols contenant des microorganismes ayant des applications écologiques bénéfiques, ont montré un grand potentiel d'implication dans le développement de nouvelles stratégies de lutte biologique favorables pour l'environnement et pour l'Homme. Pour répondre à ce concept, la diversité bactérienne des sols devrait être pleinement explorée et étudiée. Dans le cas de mon sujet de thèse, les agents constituant le principe actif des produits de lutte biologique sont des bactéries Gram positifs sporulantes, celles appartenant au phylum des *Firmicutes* des sols et plus particulièrement la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Le phylum des *Firmicutes* comprend actuellement plus de 300 genres bactériens dont plusieurs ont des applications bénéfiques dans plusieurs domaines des activités humaines (agroalimentaire, industrie, médecine...). Il est d'ailleurs crucial de noter que les membres des deux genres *Clostridium* et *Bacillus* ont longtemps été considérés comme des membres importants des communautés bactériennes du sol (Garrity, G. M., et al., 2004) et constituent de ce fait les deux genres de bactéries sporulantes les plus abondants au sein du phylum des *Firmicutes*. Leur impact

énorme dans les domaines aussi variés que l'agriculture (ex : *Bacillus thuringiensis* est l'insecticide le plus utilisé au monde en agriculture biologique), la médecine, la production alimentaire et l'écologie en fait un sujet vital d'enquête (Dambach, P., et al., 2014 et Koch, M. S., et al., 2015). Parmi les bactéries du genre *Bacillus thuringiensis*, la découverte en 1978 de la sous-espèce *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), a permis de restreindre les problèmes dus aux attaques accrues des cultures par les insectes ravageurs et vecteurs de maladie. Parmi ces diptères, nous distinguons tout d'abord les moustiques qui constituent une menace constante pour le monde entier, principalement avec les dernières interceptions de moustiques exotiques (*Aedes koreicus*, *Aedes japonicus japonicus*) qui sont de vecteurs de maladies graves comme la dengue, la fièvre jaune, la maladie du Nil occidental et le Chikungunya qui affectent plus d'un million de personnes par an. En outre, au niveau économique, l'attaque par les insectes ravageurs est responsable d'une perte approximative de 10 % dans la chaîne alimentaire mondiale. A titre d'exemple, *Mayetiola destructor*, connue sous le nom de « Hessian fly », cause des dommages au niveau du blé, de l'orge et du seigle en Europe et en Amérique du Nord (Khajuria, C., et al., 2013). Dans ce sens, et conformément aux règles du développement durable, la lutte biologique utilisant la référence mondiale *Bacillus thuringiensis israelensis* a fait son essor.

L'agent de contrôle biologique, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), bactérie Gram positif sporulante, est active sur le stade larvaire de différents ordres d'insectes et cela en déstabilisant leur tissu intestinal, évoluant vers une septicémie (Ben-Dov, E. 2014). Sa toxicité se manifeste grâce à des δ -endotoxines, dites les toxines Cry et Cyt, produites lors de la phase de sporulation. Ces toxines ont un spectre d'activité très sélectif qui permet de les classer en différentes familles. Ainsi, les toxines Cry1 sont actives sur les lépidoptères, Cry2 et Cry4 sur les diptères, Cry3 sur les coléoptères, Cry5 sur les nématodes ... alors que les toxines Cyt sont principalement actives sur les diptères. Nous nous intéressons à l'étude de l'activité sur les diptères de différentes souches de *Bt* isolées du sol libanais en prenant comme référence *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*),

première souche étudiée pour son activité très élevée et adaptée contre les diptères (Ben-Dov, E. 2014). *Bti* produit des inclusions cristallines spécifiques qui ont été utilisées comme principe actif dans la lutte contre les larves d'espèces nuisibles tel que les moustiques et les mouches noires (Federici B.A., et al., 2010). *Bti* est caractérisée par une grande diversité en protéines Cry et Cyt (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba et Cyt1Ca) (Wirth M.C., et al., 2005) ce qui lui confère différents modes d'action et des interactions synergiques entre ses toxines. De ce fait aucune résistance à *Bti* n'a été observée malgré l'utilisation massive de ses toxines depuis longtemps (Tetreau, G., et al., 2013). Ces toxines sont inoffensives pour l'Homme, les vertébrés et les plantes et sont biodégradables. Ces toxines sont utilisées comme biopesticides sous deux formes différentes : Elles sont soit pulvérisées sur les champs, soit introduites dans les plantes transgéniques fournissant une approche plus ciblée et efficace pour contrôler les insectes nuisibles à l'agriculture. En effet, les δ -endotoxines sont peu stables dans la nature et leur durée de vie après pulvérisation sur les champs est très courte ce qui réduit leur efficacité ; de ce fait les gènes codant pour ces toxines ont été introduits chez les plantes d'où les plantes génétiquement modifiées (PGM). Le développement de ces biotechnologies vertes est en véritable expansion mondialement et les PGM deviennent des éléments incontournables du nouveau cycle de croissance. Plus particulièrement, l'application des bio pesticides à base de *Bacillus thuringiensis* a conduit à une réduction importante de l'utilisation des pesticides chimiques et par la suite améliore les conditions de développement et de protection des agricultures.

Ce manuscrit de thèse défilera cinq parties entièrement dédiées, d'une part, à l'étude et la compréhension de la diversité des communautés de *Firmicutes* dans un environnement complexe tel que le sol ; et d'autre part, à l'isolement de souches de *Bt* du sol libanais et à l'identification de celles actives sur les diptères vecteurs de maladies et ravageurs essentiels de l'agriculture au Liban. Les souches isolées ont été caractérisées au niveau génétique et moléculaire. La première section comportera une synthèse bibliographique

portant sur l'importance de l'étude de la diversité bactérienne du sol particulièrement la communauté de *Firmicutes* des sols. Cette section traitera également le concept de la lutte biologique contre les diptères se focalisant ainsi sur les caractéristiques génétiques, moléculaires des delta-endotoxines de la souche de référence *Bti* et sur leurs spectres de toxicité. De plus, les différents modes d'action des delta-endotoxines de *Bti* au niveau de l'intestin moyen des insectes seront décrits et les étapes clef de la manifestation de la toxicité seront détaillées. Ensuite, l'utilisation de *Bti* et l'existence d'autres protéines non identifiées chez *Bti* pour lutter contre les diptères ravageurs seront élaborées. Par la suite, les objectifs de la thèse et les résultats correspondants défileront en trois chapitres distincts. Le chapitre I étudiera la diversité microbienne des sols de chênes et de pins appartenant à deux géographies différentes Libanaise et Autrichienne. Suivra le chapitre II qui développera la mise en évidence d'une souche A23 de *Bt* qui est plus toxique que *Bti* sur trois types de larves de diptères (*Aedes albopictus*, *Anopheles gambiae* et *Culex pipiens*). Cette souche a montré *in vitro* un profil d'activation protéolytique différent de la souche *Bti*. Le 3^e chapitre va exposer l'isolement d'une souche H3 de *Bt*, non cytolytique mais présentant une toxicité remarquable contre les larves de diptères par comparaison à *Bti*. Une discussion générale suivra ces chapitres et permettra d'élaborer tous les résultats déjà évoqués. Enfin, les perspectives de ce travail seront exposées dans la conclusion de cet ouvrage.

Synthèse Bibliographique

I. La diversité microbienne des sols

La diversité bactérienne des sols regroupe l'ensemble des microorganismes qui présentent au moins un stade actif de leur cycle biologique dans le sol. Elle inclut les habitants de la matrice du sol ainsi que ceux de la litière et des bois morts en décomposition. En effet, le sol est la partie superficielle de la lithosphère terrestre. Elle est formée suite à la dégradation de la matière organique d'origine animale et végétale (fraction organique) et de la transformation de la roche mère sous-jacente (fraction minérale). C'est Darwin qui, suite à son ouvrage « Rôle des vers de terre dans la formation de la terre végétale » publié en 1881, ouvrit la voie à l'écologie du sol (Darwin Ch. 1881). Cette discipline tente de mettre en valeur les interactions qui existent entre les composantes biotiques et abiotiques de ce compartiment. Le sol possède de ce fait des caractéristiques et des propriétés qui changent en fonction des roches, des reliefs, des climats, des végétations... Il est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne (Wagg, C., et al., 2014). Etudier cette diversité est extrêmement complexe. Seule une meilleure connaissance des composants biotiques et abiotiques du sol, des interactions entre les bactéries et leurs environnements permettra d'accéder à une fraction plus importante de la diversité bactérienne que renferme le sol et d'optimiser les moyens de la lutte biologique.

Le sol est un passage obligé pour de nombreuses espèces animales et végétales; c'est l'endroit où ont lieu de nombreux cycles biologiques. Il représente un environnement hétérogène et complexe où les microorganismes sont les organismes les plus abondants et les plus diversifiés d'un point de vue taxonomique et fonctionnel (Daniel, R., et al., 2005) . Ces communautés de microorganismes sont fortement influencées par les stress environnementaux et apparaissent de ce fait comme de bons indicateurs de l'évolution de la qualité des sols. L'étude de la diversité bactérienne des sols constitue l'un des défis majeurs de l'écologie microbienne et les techniques qui y sont appliquées ne

cessent d'évoluer (Fierer, N., et al., 2011). Avant le développement des techniques moléculaires, l'identification et la classification taxonomique de bactéries reposaient sur leur isolement, leur mise en culture et leur caractérisation basées sur des critères morphologiques, physiologiques, métaboliques, biochimiques et écologiques. Ces critères de classification sont toutefois limités surtout que les caractéristiques phénotypiques et physiologiques des bactéries sont très diversifiées mais aussi de par la simplicité de la classification engendrée. Pour pallier à ce problème, des approches moléculaires ont été développées révolutionnant ainsi le domaine de l'écologie microbienne en améliorant la classification bactérienne et surtout en augmentant de manière significative le nombre d'espèces considérées au-delà des bactéries cultivables.

I.1. La microflore du sol

Les organismes du sol peuvent être classés en trois catégories selon la fonction principale qu'ils exercent (Berthelin, J., et al., 2010). Nous distinguons les décomposeurs de la matière chimique, les régulateurs biologiques et les aménageurs de l'écosystème. Dans le sol, les décomposeurs regroupent les bactéries, champignons, algues et virus qui sont comparables à des ouvriers. Ce sont les plus petits organismes présents dans les sols. Ils décomposent la matière organique, comme les feuilles et les déchets végétaux et transforment les résidus en éléments nutritifs comme l'azote, le phosphore et le soufre. Les régulateurs biologiques sont les protistes, nématodes et microarthropodes qui régulent le nombre de décomposeurs et leur activité, principalement en les mangeant ce qui affecte la productivité du sol. Enfin, les aménageurs du sol qui regroupent les lombrics, les termites, les racines... élaborent la structure du sol en creusant des passages, des tunnels et en transportant les particules au sein de la communauté souterraine.

I.1.1. Les phyla bactériens du sol

Parmi les décomposeurs des sols, je vais présenter ci-dessous les plus abondants phyla bactériens des sols:

- Le phylum *Acidobacteria* comprend des bactéries Gram négatifs chimio-organotrophes et certaines souches qui sont acidophiles. Peu de souches de ce phylum sont cultivables, par conséquent leurs propriétés phénotypiques sont encore peu connues (Dunbar, J., et al., 1999).
- Le phylum *Actinobacteria* est très dominant dans le sol mais aussi présent en milieu aquatique terrestre. Les bactéries qui lui appartiennent sont Gram positifs, à haut pourcentage en GC, aérobies ou anaérobies. Ces bactéries sont des gros producteurs d'antibiotiques, dégradeurs de xénobiotiques et certains sont pathogènes pour l'Homme et certains animaux. La plus grande diversité du phylum revient aux genres les plus étudiés appartenant à la sous-classe des Actinobacteridae et à l'ordre des Actinomycetales. Les genres *Streptomyces* (très répandus dans le sol, très gros producteurs d'antibiotiques), *Mycobacterium* (espèces pathogènes comme *M. tuberculosis* ou *M. leprae*), *Cellulomonas* (dégradeur de la cellulose), *Nocardia* (des espèces pathogènes des animaux), *Frankia* (symbionte racinaire des plantes), *Bifidobacterium* (des espèces du tube digestif humain) (Lauber, C. L., et al., 2009 and Goldfarb, K. C., et al., 2011).
- Le phylum *Armatimonadetes* renferme des espèces cultivées dans des environnements très différents (rhizosphère, source géothermale). Les bactéries de ce phylum sont Gram négatifs, aérobies et très peu caractérisées (Lee, K. C.-Y., et al., 2013).
- Le phylum des *Bacteroidetes* comprend des bactéries Gram négatifs, aérobies ou anaérobies, hétérotrophes. Elles présentent une grande diversité phénotypique et sont trouvées dans le sol mais aussi dans l'eau, les sédiments et la flore intestinale. Les genres les plus connus sont : *Bacteroides* (flore intestinale, certaines espèces sont pathogènes

- opportunistes), *Sphingobacterium* et *Flavobacterium* (dégradation de xénobiotiques et de polluants organiques) (Eilers, K. G., et al., 2010).
- Le phylum des *Chloroflexi* comprend des bactéries Gram négatifs, photosynthétiques anoxygéniques, certains membres étant aérobies. L'ordre des *Chloroflexales* (classe *Anaerolinea*) contient essentiellement des bactéries photosynthétiques (bactéριοchlorophylle a ou c, et des caroténoïdes) (Campbell, A. G., et al., 2014).
 - Le phylum des *Cyanobacteria* renferme des bactéries Gram négatifs, photosynthétiques oxygéniques (produisant du dioxygène), certaines sont fixatrices d'azote. Egalement, certaines espèces (genre *Anabaena* ou *Nostoc*) sont en symbiose avec les champignons (pour former le lichen) (WHO, 1999).
 - Le phylum des *Firmicutes* renferme les bactéries Gram positifs formant des endospores dont la majorité présente un faible taux de GC dans leur ADN (< 50 %), aérobie ou anaérobie avec quelques espèces phototrophes. Les classes *Bacilli* (2 ordres, 15 familles) et *Clostridia* (4 ordres et 18 familles) sont les plus importantes de ce phylum. Il comprend plusieurs genres et espèces d'intérêt : Le genre *Bacillus* (*B. thuringiensis*, bactérie utilisée fréquemment dans la lutte biologique du fait de son inclusion cristalline renfermant des protéines à activités biopesticides diverses ; *B. subtilis*, bactérie modèle du sol, *B. anthracis*, agent de la maladie du charbon), le genre *Clostridium* (espèces pathogènes pour l'Homme: *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, etc.), l'espèce *Listeria monocytogenes* (responsable d'infection alimentaire), *Staphylococcus* (coques aérobies ubiquistes, certaines espèces pathogènes), *Lactobacillus* et *Lactococcus* (bactéries lactiques), *Streptococcus* (certaines espèces pathogènes) (Galperin, M. Y. 2013). Le phylum des *Firmicutes*, qui renferme les bactéries formant des endospores, sera particulièrement étudié au cours de ces travaux de thèse.

- Le phylum *Nitrospirae* inclut des bactéries Gram négatifs, chimio-lithotrophes aérobie nitrifiante ferro-oxydant ou anaérobie chimioorganotrophe sulfato-réducteur (Martínez-Alonso, M., et al., 2010).
- Le phylum des *Planctomycetes* comporte des bactéries Gram négatifs, dépourvues de peptidoglycane, bourgeonnantes ou filamenteuses. Les bactéries de ce phylum étaient classées parmi les champignons (Fuerst, J. A., et al., 2011).
- Les bactéries du phylum des *Proteobacteria* sont Gram négatifs et appelées autrefois bactéries pourpres car les premières décrites de ce groupe étaient photosynthétiques, avec une pigmentation pourpre. C'est en réalité le phylum qui contient la plus grande diversité (phénotypique et génotypique), dont une majorité non photosynthétique (chimiotrophe) (Goldfarb, K. C., et al., 2011).
- Le phylum des *Verrucomicrobia* regroupe des bactéries Gram négatifs, oligotrophes, relativement abondant dans le sol mais très peu de souches sont cultivables. Leur écologie, toutefois, n'est pas encore bien définie (Sangwan, P., et al., 2005).

L'activité de la fraction vivante du sol caractérise sa fertilité et son pouvoir à s'adapter et/ou à résister aux influences externes. A titre d'exemple, certains microorganismes agissent négativement sur la vitalité de la plante (les agents pathogènes), alors que d'autres favorisent positivement leur développement (les mycorhizes ou les antagonistes). Ces interactions entre les différents acteurs, microorganismes «négatifs», microorganismes «positifs», plantes et Homme, permettent d'évaluer la qualité du sol.

I.1.2. Facteurs influençant la structure des communautés bactériennes des sols

L'un des défis en lutte biologique est de mieux étudier l'écologie microbienne des sols cibles et de comprendre les processus qui génèrent et maintiennent cette diversité bactérienne. En effet, le microcosme du sol nécessite des études approfondies de sa diversité, sa distribution spatiale à

petites et à grandes échelles, ainsi que son implication dans le fonctionnement biologique du sol (Ranjard L., et al., 2010). Ces études sont toutefois confrontées à la difficulté d'accéder aux populations bactériennes au sein d'une matrice hétérogène et structurée (Curtis T.P., et al., 2005). Au cours des deux dernières décennies, les avancées considérables dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de mettre en place de nouvelles techniques pour aborder et élaborer la diversité des communautés microbiennes des sols *in situ* (Ranjard, L., et al., 2000). Ces techniques moléculaires sont une des raisons du progrès des recherches pour le bio-control. En effet, elles ont amélioré notre compréhension de l'écosystème microbien et résultent en une élaboration de stratégies pour l'identification de bactéries d'intérêt écologique.

Beaucoup de paramètres biotiques et abiotiques interviennent pour modéliser la structure des communautés bactériennes des sols tant en terme de diversité que d'effectifs (Borneman, J., et al., 1997). Il n'est pas encore possible aujourd'hui de prendre en compte tous les paramètres influant la composition de la microflore tellurique et surtout leurs interactions (Tarlera, S., et al., 2008). Les facteurs présentant une influence marquée sur la structure des communautés bactériennes seront détaillés ci-dessous :

I.1.2.1. Les facteurs abiotiques

Plusieurs études suggèrent que la structure des communautés microbiennes est modélisée par les caractéristiques des sols qui conditionnent la distribution spatiale. Ces communautés sont dominées par 5 phyla majeurs : *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Janssen, P. H., et al., 2006). Le développement de communautés bactériennes distinctes se fait avec le temps suite aux changements affectant le sol. Le pH est l'un des forts prédicteurs de la composition des communautés bactériennes et de leur diversité. Il influence fortement la composition des *Acidobacteria* et des *Actinobacteria*. Cependant selon le type de sol d'autres facteurs peuvent altérer la structure des communautés tel que la disponibilité des nutriments, la solubilité

des métaux (Muller AK, et al., 2002), le contenu en carbone et en azote, l'humidité, la salinité....

I.1.2.2. Les facteurs biotiques

Les facteurs biotiques des sols sont divers. A titre d'exemple, il a été montré que les plantes ont un impact identique ou même supérieur à celui des facteurs abiotiques dans le contrôle des fonctions des écosystèmes terrestres, dans la modulation de la structure des communautés bactériennes des sols (Verville, J. H., et al., 1998) et influent aussi les propriétés abiotiques du sol. La présence de plantes résulte en une augmentation significative de l'humidité du sol, de la biomasse et de la respiration microbienne. Il a été observé que beaucoup de plantes possèdent des groupes de microorganismes qui leur sont spécifiques, cela représente une association positive où les plantes fournissent le carbone pour la croissance microbienne et en retour les microorganismes leur donnent des éléments majeurs comme une protection contre les attaques des pathogènes et parasites (Singh, B. K., et al, 2004). En outre, les facteurs dépendant de la physiologie de l'organisme choisi (taux de croissance, d'alimentation, de reproduction, durée de la vie, capacités métaboliques, rythmes endogènes d'activité, possibilités de déplacement) sont aussi considérés comme biotiques (Wardle, D. A., et al., 2006). Enfin, les facteurs biotiques concernent également la présence, à côté d'un organisme, d'autres organismes de la même espèce ou d'espèces différentes, qui rentrent en concurrence, en compétition, ou qui exercent sur lui une prédation, un parasitisme...

I.2. Les paramètres de mesure de la biodiversité des sols

La biodiversité peut être calculée et contrôlée à plusieurs échelles. Nous distinguons plusieurs niveaux d'étude: diversité alpha, diversité bêta et diversité gamma. La diversité alpha concerne la richesse et la régularité des individus au sein d'un habitat ; la diversité bêta permet de comparer la diversité entre les

différents habitats ; et finalement, la diversité gamma étudie la diversité du paysage ou la diversité des habitats dans un paysage ou dans une région (Figure 1).

Les indices de mesure de la biodiversité des sols permettent de caractériser les tendances générales des communautés et d'étudier leur diversité. Ils prennent en compte toute la complexité de chaque communauté, leur distribution géographique et toutes les différences possibles existantes. Seuls les indices utilisés et développés dans ces travaux de thèse seront exposés et détaillés dans ce qui suit.

Nous distinguons trois types d'indices :

- Les descripteurs statistiques, couramment utilisés et permettant de décrire de manière quantitative les peuplements (Richesse Spécifique (S), Biomasse (B), Abondance (A), Dominance...);
- Les indices de diversité (Indice de Shannon Wiener (H'), indice d'équitabilité de Pielou (J'), Indice de Simpson, Indices de Hill...) étudiant la complexité des peuplements et traduisant la répartition des abondances des espèces dans ce peuplement;
- Les indices basés sur des représentations graphiques et distributionnelles, qui à partir de l'analyse de la forme des courbes, ils permettent d'étudier la structure des populations (courbes de dominance k, courbes de Comparaison Abondance/ Biomasse).

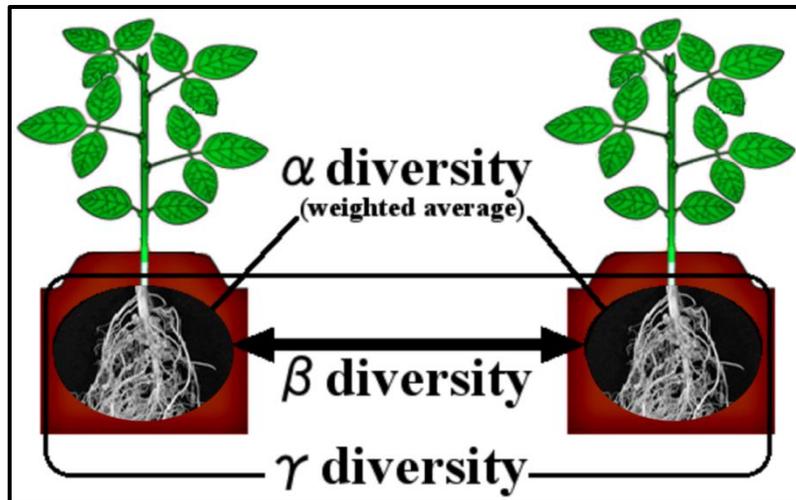


Figure 1: Représentation schématique des diversités alpha, bêta et gamma d'une communauté bactérienne (Saeki, Y., et al., 2014).

I.2.1. Les OTUs (Operational Taxonomic Units)

En phylogénie, une unité taxonomique opérationnelle (OTU) est une définition opérationnelle d'un groupe d'individus de même espèce souvent utilisée quand seulement les données de séquences d'ADN est disponible. Elle est l'unité de la diversité microbienne la plus couramment utilisée. Un OTU est généralement défini comme un ensemble de lectures avec 97 % de similarité, avec l'espoir de correspondre approximativement aux genres. Dans ces travaux de thèse, elles ont été appliquées aux résultats de séquençage de la région 16S de l'ADN ribosomique (16S ADNr) en utilisant le logiciel MOTHUR (Schloss, P. D., et al., 2009). Les méthodes traditionnelles, utilisant des courbes de raréfaction pour évaluer la richesse en espèces, l'utilisation des estimateurs de diversité alpha et bêta se basent essentiellement sur ces OTUs.

I.2.2. Indice et courbe de raréfaction

Les méthodes de raréfaction consistent à estimer le nombre d'espèces pour un certain nombre d'individus. L'avantage de ces méthodes est de décrire les changements progressifs s'effectuant dans le temps ou dans l'espace (Pearson, T. H., et al., 1978) de façon indépendante de la taille de l'échantillon. Les résultats peuvent être représentés par une courbe dont l'ordonnée peut représenter le nombre d'espèces et l'abscisse le temps, la distance par rapport à une source de pollution ou le nombre d'individus, etc...

Chaque courbe de raréfaction est calculée sur la base des distributions des unités taxonomiques OTUs pour chaque échantillon de sol. Dans l'analyse de la diversité bactérienne d'une communauté, plus le nombre d'échantillons est grand et plus le nombre d'espèces trouvées est grand. Généralement, les courbes de raréfaction sont créées de façon aléatoire par ré-échantillonnage (n fois) d'un réservoir de N échantillons, puis le nombre moyen d'espèces présentes dans chaque échantillon (1,2, ... N) est déterminé. Par conséquent, la raréfaction génère le nombre prévu d'espèces dans une petite collection de n individus tirés au sort à partir du grand réservoir de N échantillons (Gotelli, N. J., et al., 2001). En fait, la variabilité de la richesse de chaque individu dans son habitat peut contrôler de manière significative la forme de la courbe de raréfaction en fonction du moment où chaque donneur a été échantillonné.

I.2.3. Indices de diversité

La diversité prend en compte le nombre d'espèces et la fréquence relative des individus au sein de ces espèces. Ces deux facteurs déterminent en fait la richesse spécifique du sol. Deux principaux indices de diversité ont été développés: l'indice de Shannon-Wiener et l'indice de Simpson. L'indice de Shannon est classé dans les indices de type I puisqu'il est sensible aux variations importantes des espèces les plus rares. Ainsi, une communauté dominée par une seule espèce aura un coefficient plus petit qu'une communauté dont toutes les espèces sont co-dominantes. L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même

espèce. Il est classé dans les indices de type II puisqu'il est sensible aux variations importantes des espèces les plus abondantes (Peet, R. K. 1974).

L'indice de Shannon-Wiener est le plus couramment utilisé, recommandé par différents auteurs (Gray., et al., 1992) et se calcule par la formule suivante:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log p_i$$

Où :

p_i = abondance proportionnelle ou pourcentage d'importance de l'espèce $p_i = n_i/N$;

S = nombre total d'espèces;

n_i = nombre d'individus d'une espèce dans l'échantillon;

N = nombre total d'individus de toutes les espèces dans l'échantillon.

L'indice de Simpson pour un échantillon infini est donné par :

$$\lambda = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

et pour un échantillon fini par :

$$L = \sum [n_i(n_i - 1)] / [N(N - 1)]$$

Où :

p_i = proportion des individus dans l'espèce i

n_i = nombre d'individus dans l'espèce i

N = nombre total d'individus.

Ces indices de diversité sont souvent accompagnés d'indices d'équitabilité qui consistent le plus souvent à établir le rapport entre la diversité mesurée et la diversité théorique maximale pour une taille d'échantillon et un nombre d'espèces données. Ils traduisent donc la répartition des espèces les plus abondantes dans le peuplement.

I.3. Les méthodes moléculaires d'analyse des communautés bactériennes

Les méthodes de caractérisation des communautés bactériennes sont de 3 types : les méthodes basées sur les profils des bandes d'ADN, celles basées sur le séquençage d'ADN et celles basées sur l'hybridation de l'ADN sur des micro-puces. Les méthodes basées sur les profils des bandes d'ADN sont des méthodes de génotypage qui classent les bactéries selon les tailles des fragments générés à la suite d'amplification par PCR et/ou d'une digestion de l'ADN génomique par une endonucléase de restriction (Li, W., et al., 2009 et Versalovic, J., et al., 2002) ou par simple analyse du profil s'il s'agit de l'ADN plasmidique. Les méthodes basées sur le séquençage de l'ADN se basent sur la comparaison des résultats de séquençage d'un gène marqueur de différentes souches bactériennes (Li, W., et al., 2009). Les méthodes basées sur des micro- ou macro-puces à ADN comparent le profil d'hybridation des ADNs bactériens sur des sondes de séquences bien connues (Versalovic, J., et al., 2002). Ces méthodes de génotypage sont espèces-dépendantes à l'exception de celles basées sur le séquençage génomique. Dans ce qui suit, les régions de l'ADN qui sont ciblées dans le génotypage bactérien ainsi que le principe de bases de ces techniques, notamment celles utilisées au cours de ces travaux de thèse, sont exposées.

I.3.1. Les régions des gènes utilisées pour le génotypage

I.3.1.1. L'ADN ribosomique 16S

Carl Woese a été le premier en 1987 à proposer l'utilisation du gène de l'ARN ribosomique 16S comme marqueur de phylogénie (Woese, Carl R., et al., 1987). Cette découverte a véritablement révolutionné la taxonomie et l'écologie microbienne. En effet, les séquences d'ADN ribosomiques (ADNr) sont considérées comme des marqueurs permettant d'étudier de près l'évolution des communautés bactériennes. En effet, toutes les cellules renferment des ADNr qui leur sont essentiels pour leur survie (Woese, Carl R., et al., 1987 and Hillis,

D., et al., 1991). Par conséquent, l'amplification et le séquençage des gènes du 16S ARNr sont très utilisés pour l'identification et la classification phylogénique des espèces, des genres et des familles des procaryotes.

Les cellules procaryotes possèdent des ARNr 23S, 16S et 5S. Le choix du marqueur porte généralement sur l'ARNr 16S et non 23S ou le 5S et ceci pour des raisons techniques. L'ARNr 23S est plus long que l'ARN 16S et porte des structures secondaires particulièrement marquées. Le 16S ARNr est une molécule ayant évolué plus lentement que le reste du génome et constitue de ce fait une horloge moléculaire lente. L'ARNr 16S s'organise en opérons pouvant être présents en mono- ou multi-copies dans les génomes (Rainey, F. A., et al., 1996). Il est constitué de 1500 pb et comprend 10 régions conservées (évolution lente avec le temps) et 9 régions hypervariables (V1-V9) (flanquées par les régions conservées) (Cai, H. Y., et al., 2003). Les régions conservées délimitent les régions hypervariables ce qui rend possible l'amplification de ces dernières par PCR grâce à des amorces universelles et de comparer les résultats issus d'un grand nombre de souches bactériennes différentes (Baker, G. C., et al., 2003). En effet, certaines parties conservées sont identiques chez toutes les bactéries et donc utilisables comme sites de complémentarité pour des amorces universelles, tel est le cas du couple d'amorces 27f/1492r utilisé dans ces travaux. Un autre couple, BLS342f/ BACr833^P spécifique d'une région du gène 16S ADNr des *Firmicutes* du sol (Mühling, Martin., et al., 2008) a été également utilisé dans cette étude dans le but de cibler des régions hypervariables précises notamment la région V3, la région V4 et une partie de la région V5 (Figure 2). En effet, la région V3 (433-497 nucléotides) permet de distinguer plusieurs bactéries au niveau de leur genre, les régions V4 (576-682 nucléotides) et V5 (822-879 nucléotides) sont caractérisés par leur séquence qui sont très conservées (Chakravorty, S., et al., 2007). La comparaison des domaines conservés permet de retracer les liens de parenté entre les bactéries éloignées. Alors que l'étude de domaines à vitesse d'évolution plus rapide permettrait d'établir les relations phylogénétiques d'espèces plus rapprochées.

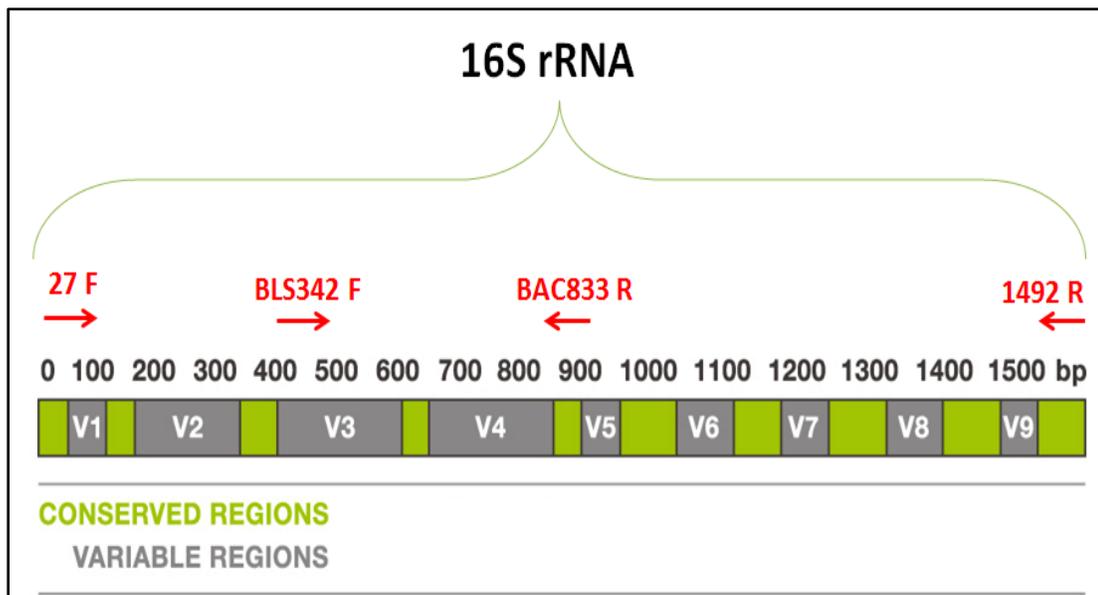


Figure 2: Emplacement des couples d'amorces 27f/1492r et BLS342f/ BACr833^P sur la séquence du gène 16S ARNr (adapté de <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>).

Plusieurs méthodes moléculaires utilisent le gène 16S ARNr pour caractériser les communautés bactériennes des sols (SSCP, TGGE...) et seront exposées dans les sections suivantes. A titre d'exemple, le gène 16S ADNr peut servir comme matrice pour des réactions de PCR quantitative en temps réel pour étudier son abondance. En effet, un ADN extrait du sol, réservoir de plusieurs organismes, sera amplifié au moyen d'une qRT-PCR avec des amorces ciblant des régions spécifiques du gène 16S ADNr d'une communauté bactérienne dans le but d'étudier l'abondance de cette communauté dans le sol en question.

Si l'étude de la diversité bactérienne concernait le niveau d'espèce, le 16S ADNr doit être impérativement complété par d'autres gènes puisqu'il est trop conservé à l'exception de quelques espèces comme *Neisseria meningitidis* (Sacchi, C. T., et al., 2002), *Mycoplasma agalactiae* et *Mycoplasma bovis* (Königsson, M. H., et al., 2002). En effet, dans certains cas, des espèces sont si

proches qu'elles ne possèdent que très peu ou pas de différences dans les séquences 16S. Il faudra donc faire appel à une région plus divergente de leur génome pour pouvoir les différencier. En plus de l'étude des espèces, le pouvoir pathogène est lié à la présence de gènes de virulence portés le plus couramment par un plasmide; alors ce sont ces gènes-là qu'il faudra aussi étudier (Crosa, J. H., et al., 1977 et 1980). Par ailleurs, il est non fiable d'utiliser un seul marqueur pour analyser les relations évolutives entre des organismes ; puisque par exemple, la phylogénie basée sur l'ARNr 16S seul ne prend pas en compte la notion de transferts latéraux (Van Berkum, P., et al., 2003). Pour pallier à ces inconvénients, l'étude de plusieurs gènes est indispensable tels que : *gyrB* (gyrase) (Awad, Mireille Kallassy, et al., 2007), *rpoB* (ARN polymérase) (Kim BJ, et al., 2004), *hsp60* (heat-shock protein), régions ITS (internal transcribed spacer) (Jensen, M. A., et al., 1993)... Couramment, le séquençage du gène 16S ARNr est surtout utilisé pour l'identification des espèces bactériennes.

I.3.1.2. Régions ITS des 16S-23S ARNr

Les espaces internes transcrits (ITS) sont des régions non codantes qui séparent les différents gènes 16S, 23S et 5S ARNr des procaryotes (Sadeghifard, N., et al., 2006). Ces régions sont très utilisées pour l'identification et le typage des bactéries du fait de leur taux élevé de polymorphisme, du degré élevé des variations de longueurs et du nombre varié d'allèles et de leur position sur le chromosome et cela au niveau du genre et de l'espèce (García-Martínez, J., et al., 1999 et Sadeghifard, N., et al., 2006). Par conséquent, ces régions-là sont plus informatives, variables et fournissent une meilleure résolution que l'analyse basée sur le 16S rRNA surtout en ce qui concerne le typage bactérien (Jensen, M. A., et al., 1993)

I.3.1.3. Les gènes de ménage (Housekeeping genes)

Les gènes de ménage sont les gènes requis pour les fonctions cellulaires classiques et sont essentiels à la survie. En effet, l'analyse de la diversité basée sur ces gènes permet de différencier entre des souches très rapprochées qui ne peuvent pas être discriminées par l'analyse utilisant le 16S ARNr. Le gène *rpoB*, codant la sous-unité β de l'ARN polymérase est un exemple de ces gènes. Il est présent en une seule copie chez les bactéries (Mollet, C., et al., 1997 et Adekambi, T., et al., 2006). En 2004, il a été prouvé que ce gène possède un pouvoir plus discriminatoire que le gène 16S rRNA (De Clerck E., et al., 2004). En plus du gène *ropB*, d'autres gènes de ménage comme *hsp65*, *gyrB*, *slpA* (surface layer protein) sont souvent utilisés pour le génotypage bactérien (Cai, H. Y., et al., 2003 ; Khosravi, A. D., et al., 2009 ; Kato H., et al., 2005 and Awad, M. K., et al., 2007).

I.3.1.4. Les éléments BOX

Un élément d'ADN répétitif et hautement conservé a été identifié dans le chromosome de *Streptococcus pneumoniae* (*pneumococcus*) et il lui a été attribué le nom de « BOX repetitive element ». C'était la toute première évidence de la présence d'un ADN répétitif chez les espèces de bactéries Gram positifs (Martin, B., et al., 1992). Approximativement 25 copies de ces éléments ont été trouvées dans des régions non codantes dispersées dans l'ensemble du génome de *S. pneumoniae*. Les éléments BOX sont situés dans les régions inter-géniques et sont capables de former des structures en tige-boucle en raison de leur symétrie dyade. Ils sont composés de différentes combinaisons de trois séquences de sous-unités conservées dénommées *boxA*, *boxB* et *boxC* et qui sont de 59, 45 et 50 nucléotides respectivement (Martin, B., et al., 1992). En fait, la sous-unité *boxA* est conservée parmi les diverses bactéries (Koeuth, T., et al., 1995). La structure secondaire complexe des éléments BOX est la résultante d'un appariement de bases compensé dans différents loci où la répétition est rencontrée. Dans nos travaux, ces séquences consensus ont été utilisées pour

amplifier les fragments d'ADN entre ces éléments répétitifs utilisant l'amorce spécifique BOX-A1R. Cette amorce, trouvée dans de nombreux génomes microbiens, était une préoccupation singulière dans de nombreuses études antérieures (Lee, A., et al., 2009) (Figure 3).

La technique de BOX-PCR ainsi que les méthodes de génotypage sont de haut débit par rapport aux techniques d'analyse de séquençage, en dépit du fait que le séquençage du gène 16S ARNr est considéré comme le « gold standard » pour l'identification microbienne (Clarridge, J. E., et al., 2004 et Weisburg, W. G., et al., 1991). Ces méthodes de génotypage sont souvent plus discriminatoires au sein des espèces que le séquençage du gène 16S ARNr.

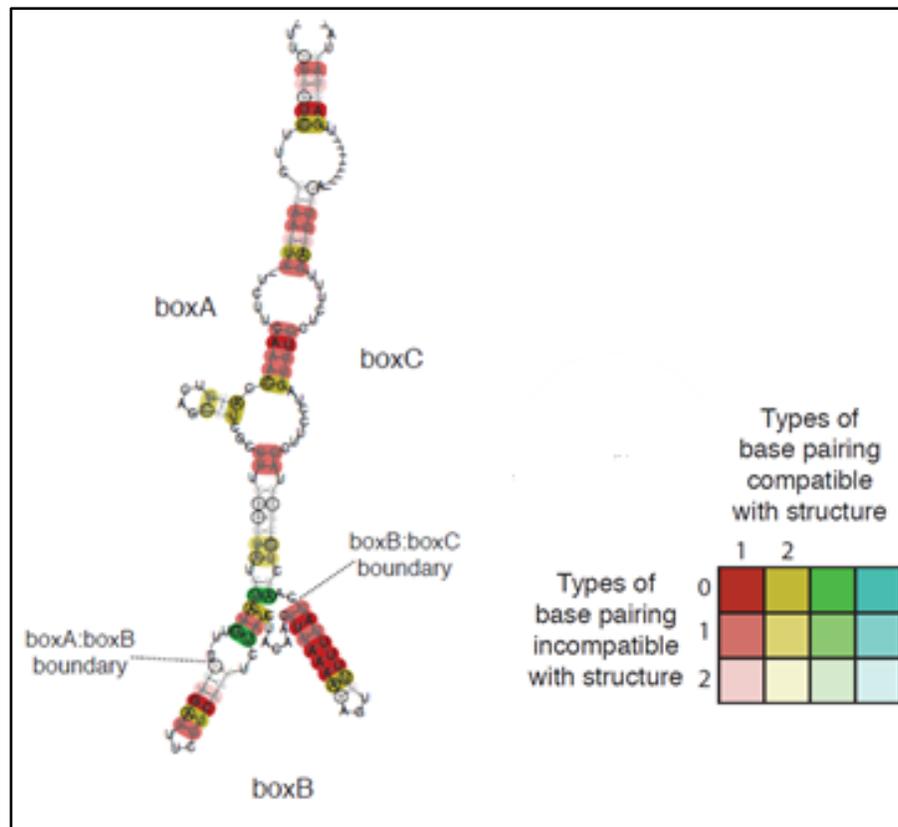


Figure 3: Structures secondaires prédites des séquences Box répétées. Ces structures sont obtenues après alignement de 30 séquences du génome de *S. pneumoniae* ATCC 700669. Les limites entre les différentes séquences sont marquées sur l'image. Les appariements de base sont colorés en fonction de leur conservation dans l'alignement : des couleurs différentes sont utilisées pour indiquer les nombres différents d'interactions compatibles au niveau de cette structure (Adapté de Croucher, N. J., et al., 2011).

I.3.2. Descriptif des méthodes moléculaires d'analyse microbienne

Différentes méthodes moléculaires ont été adoptées jusqu'à là dans le but d'analyser la diversité bactérienne des sols basée sur les marqueurs évoqués ci-dessus. Particulièrement, nous mettrons en valeur celles adoptées au cours de ces travaux de thèse et qui se basent sur l'étude du gène 16S ARNr.

I.3.2.1. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et PCR ribotyping

L'analyse RFLP, appartenant aux méthodes basées sur les enzymes de restriction, est parmi les premières méthodes fréquemment utilisées pour la détection des variations au niveau d'une séquence d'ADN (Todd R., et al., 2001). Le ribotypage est un variant de l'analyse RFPL et utilise des sondes d'ARNr. Ce dernier se base sur l'analyse des séquences de l'opéron de l'ARNr. En effet, les opérons ARNr bactériens comprennent une famille de gènes hautement conservés où chacun est flanqué par des régions d'ADN variables. Comme déjà indiqué, le gène 16S ARNr est très conservé au niveau des espèces et est considéré de ce fait un excellent marqueur pour l'identification des espèces bactériennes. Les variations de séquence au niveau des sites de restriction donnent plusieurs bandes différentes (RFLP) lorsque des sondes reconnaissant les gènes 16S ARNr ou 23S ARNr sont utilisées (Bingen, E. H., et al., 1994 et Harvey, S. P., et., 2005). Outre l'utilisation des gènes 16S et 23S rRNA, l'analyse de la différence génétique des microorganismes peut traiter également les fragments d'opérons situés entre le 16S et le 23S appelés ITS (Internal Transcribed Spacer). En effet, ces ITS bactériens sont caractérisés par un haut taux de polymorphisme au niveau de la longueur et de la séquence. Finalement, cette technique est non coûteuse mais elle analyse uniquement des fragments limités du génome et demande une grande quantité d'ADN génomique de bonne qualité. Par conséquent, son pouvoir discriminant est moins puissant que la RAPD ou la Box-PCR présentées ci-dessous (Bouchet, V., et al., 2008).

I.3.2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

La RAPD, connue aussi comme une PCR à amorces arbitraires (AP) et une empreinte d'ADN amplifiée (DAF), est utilisée comme méthode de génotypage basée sur l'analyse du profil de bandes d'ADN (Speijer, H., et al., 1999). Cette technique est rapide, facile et permet de détecter les différences dans la totalité du génome bactérien et non seulement dans des séquences particulières. Par conséquent, cette méthode est utile pour caractériser des isolats bactériens sur de longues périodes (Ortiz-Herrera, M., et al., 2004). RAPD génère plusieurs profils d'empreintes moléculaires par le biais d'un nombre illimité d'amorces (Leal, N. C., et., 2004) sans une connaissance préalable de l'ADN. Toutefois, cette technique se fie aux conditions optimisées de PCR (Blixt, Y., et al., 2003). A titre d'exemple, les amorces ont besoin d'être optimisées puisque certaines amorces qui fonctionnent avec certaines bactéries risquent de ne pas être appropriées pour d'autres. Les amorces utilisées en RAPD sont généralement de 9 à 10 bases de nucléotides, de séquences arbitraires, s'hybridant avec une affinité suffisante aux chromosomes bactériens. Cette technique a été utilisée pour le typage moléculaire de différents microorganismes particulièrement *Bacillus cereus* (Svensson, B., et al., 2004). Le génotypage bactérien est révélé par cette technique au moyen des différentes bandes obtenues et la relation entre les souches bactériennes est déterminée par comparaison des profils d'empreinte moléculaire (Leal, N. C., et., 2004). Vila et al., en 1996 et Speijer et al., en 1999 ont prouvé que la RAPD est plus discriminante que la RFLP utilisant les gènes 16S ou 23S rRNA mais moins discriminante que la AFLP ou la rep-PCR (Vila, J., et al., 1996 et Speijer, H., et al., 1999).

I.3.2.3. Rep-PCR: Box-PCR

En 1991, Versalovic et al., ont décrit une méthode d'empreinte génomique bactérienne en examinant les profils de PCR obtenus par amplification des éléments d'ADN répétitifs présents dans le génome bactérien et cela pour

différentes espèces et sous espèces bactériennes. Nous distinguons trois principaux ensembles d'éléments d'ADN répétitifs : i) Les éléments palindromiques extra géniques répétitifs (REP) qui sont des unités palindromiques de 35-40 pb et qui contiennent une boucle variable dans leur structure (Stern, M. J., et al., 1984) ; ii) Les séquences consensus inter géniques répétitives des entérobactéries (ERIC) de 124-127 pb sont aussi connues comme des unités répétitives inter géniques (IRUs) (Gillings, M., et al., 1997) et iii) Les éléments BOX de 154 pb qui consistent en des sous-unités conservées, désignées boxA, boxB, et boxC (Martin, B., et al., 1992). Dans ce qui suit, la Box-PCR sera évoquée en détails puisqu'elle a servi dans la caractérisation des sous-espèces de *Bacillus thuringiensis*, étudiées dans ces travaux. L'élément BOX peut être présent dans les deux orientations et l'amorce boxA a été désignée de façon à reconnaître ces éléments-là. Le résultat de PCR est visualisé sur un gel d'agarose et le profil des bandes obtenues est connu sous le nom d'empreinte génomique par rep-PCR qui ressemblent à des barres codes (Versalovic, J., et al., 1994 et Lupski, J. R., et al., 1993). Ces empreintes générées par la Box-PCR à partir d'isolats bactériens permettent de les différencier au niveau des espèces et sous-espèces bactériennes. La Box-PCR est la plus robuste parmi les autres méthodes de rep-PCR et n'est pas affectée par la date d'échantillonnage ou l'âge de la culture bactérienne étudiée (Kang, H. P., et al., 2003). Ces caractéristiques font de la Box-PCR une méthode fréquemment utilisée dans les études biogéographiques en microbiologie environnementale (Cherif, A., et al., 2003; Dombek, P. E., et al., 2000 et Oda, Y., et al., 2003). Toutefois, la résolution pour la bonne observation des bandes doit être optimisée. Finalement, la rep-PCR a montré un potentiel de performance meilleur, plus facile, plus rapide et moins coûteux que les méthodes RISA (ribosomal intergenic spacer analysis), RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) et d'autres techniques (Chmielewski, R., et al., 2002 et Olive, D. M., et al., 1999).

I.3.2.4. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

La DGGE et la TGGE sont deux méthodes très rapprochées adoptées depuis 1993 pour explorer la diversité des communautés bactériennes (Muyzer, G., et al., 1993). Elles peuvent s'appliquer directement sur des échantillons environnementaux (dans notre cas, des échantillons de sols). Ces deux techniques amplifient avec des amorces universelles la partie conservée de la séquence du gène 16S ADNr et donc ciblant toutes les bactéries et non un niveau taxonomique précis. Au cours de ces réactions d'amplification, l'extrémité 5' de l'amorce sens contient une queue composée d'une succession de GC de 35-40 pb (GC-clamp). Ce GC-clamp va créer un domaine de grande stabilité puisqu'il ne s'ouvrira pas ou ne sera pas dénaturé dans le gel suite à la présence d'un gradient de concentration d'un agent dénaturant (formamide ou urée) ou d'un gradient de température. Cette dénaturation étant séquence spécifique, les fragments vont migrer différemment dans le gel de polyacrylamide suivant leur séquence. La DGGE, quant à elle, peut théoriquement séparer des fragments d'ADN qui diffèrent par une seule paire de bases (Miller, K. M., et al., 1999). Le gène 16S ARNr est le gène cible le plus fréquent utilisé dans cette analyse parce qu'il existe chez toutes les bactéries et peut être facilement amplifiable sans connaissances préalables des souches bactériennes. Par cette technique, plusieurs échantillons peuvent être analysés simultanément permettant ainsi de caractériser les communautés bactériennes. Tel est l'approche étudiée dans le chapitre 1 de ce manuscrit. L'avantage de cette technique vient du fait que les bandes sélectionnées du gel peuvent être séquencées. Analysant les profils obtenus, nous notons que les fragments d'ADN de différentes séquences peuvent migrer de la même façon dans le gel polyacrylamide. Par la suite, une bande bien différenciée obtenue après migration ne correspond pas forcément à la présence d'une seule espèce bactérienne dans la communauté (Gelsomino, A., et al., 1999).

I.3.2.5. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Dans cette technique, la région d'intérêt du gène 16S ADNr est amplifiée par PCR suivie d'une PCR nichée après extraction des ADNs totaux des microorganismes à partir d'un échantillon donné, à l'aide de deux couples d'amorces : le premier universel 27f/1492r qui couvre la totalité du gène 16S ADNr des bactéries et le second BLS342f/ BACr833^P spécifique d'une région du gène 16S ADNr des *Firmicutes* du sol (Mühling, Martin., et al., 2008) (Figure 2). Les produits amplifiés sont ensuite soumis à une dénaturation. Les ADNs en conformation simple brin migrent dans un gel de polyacrylamide non dénaturant. Cette mobilité spécifique est due à la conformation spatiale de l'ADN simple brin. En effet, elle provient de la formation de liaisons hydrogènes et électrostatiques au sein des structures primaires qui conduisent à la formation des structures secondaires et tertiaires de l'ADN. Les profils de bandes d'ADN sont générés et représentent la diversité des bactéries présentes dans l'échantillon étudié (Tiedje, J. M., et al., 1999).

La SSCP permet donc d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens. Une communauté microbienne complexe apparaît alors sous la forme d'un profil où il est possible d'affirmer que chaque pic correspond à une séquence, et par la suite, à une espèce. Par conséquent et sans mise en culture, cette « empreinte moléculaire » permet donc de caractériser la diversité d'une communauté bactérienne et d'en suivre, par exemple, sa composition bactérienne en terme de présence grâce à l'ADNr 16S (Larentis, M., et al., 2015) et cet aspect-là a été étudié dans le chapitre 1 de cette thèse et/ou en terme d'activité en utilisant l'ARNr 16S.

I.3.2.6. RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) /ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Ces techniques amplifient par PCR également les gènes 16S ADNr et 23S ADNr mais plus particulièrement les régions IGS (intergenic spacer) situées entre ces sous-unités géniques ribosomales, pouvant alors différencier des espèces très proches. Les produits générés de tailles différentes sont séparés sur gel de polyacrylamide sous conditions dénaturantes (Fisher, M. M., et al., 1999). L'efficacité de ces techniques repose sur leur avantages d'être indépendantes de la culture *in vitro*, hautement reproductibles, robustes et étudiant rapidement la structure des communautés bactériennes (Ramette, A., et al., 2009). Toutefois, ces techniques présentent des limites puisqu'elles sont basées sur une seule étape d'amplification et donc elles sous-estiment la diversité car seules les espèces numériquement dominantes sont détectées (Ramette, A., et al., 2009 et von Wintzingerode, F., et al., 1997). Cela diminue alors la sensibilité de ces techniques qui ne couvrent que les bactéries les plus présentes. Ces techniques ne permettent pas d'étudier la richesse ou l'abondance relative des OTUs (unité taxonomique opérationnelle) (Bent, S. J., et al., 2008) sauf si les bandes sont extraites du gel et séquencées. Ces méthodes d'empreintes moléculaires sont donc généralement inefficaces pour fournir l'identité taxonomique des bactéries impliquées.

I.3.2.7. MLST (Multi- Locus Sequence Typing)

Cette technique utilise le séquençage d'ADN pour découvrir les variants alléliques au niveau de plusieurs gènes conservés (gènes de ménage) et est actuellement l'une des méthodes de génotypage les plus populaires pour la caractérisation de souches bactériennes (Maiden, M. C. J., et al., 1998). MLST utilise 400 à 500 pb des séquences des gènes de ménage dont les séquences sont contrôlées en raison de la fonction essentielle des protéines pour lesquelles ils codent. Un numéro est attribué à chaque séquence différente pour un gène

donné. A chaque souche, un profil allélique est donc attribué comme type de séquence (ST) (Maiden, M. C. J., et al., 1998 et Spratt, B. G. 1999). La MLST, proposé pour la première fois en 1998, est une technique puissante en génétique des populations. Elle est bien utilisée pour une investigation des structures des populations bactériennes à long terme et pour classier les individus des populations bactériennes. Au tout début, elle était utilisée pour caractériser les souches de *Neisseria meningitidis* (Maiden et al., 1998). De nos jours, la MLST est utilisée pour plus de cinquante espèces bactériennes telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Helicobacter pylori*, etc... (<http://www.mlst.net/>).

I.3.2.8. Méthodes basées sur l'hybridation

Ces méthodes requièrent un ADN cible et un fragment d'ADN marqué par un fluorochrome « sonde » qui est complémentaire à l'ADN cible. Une plaque d'ADN « DNA array » est utilisée servant pour l'étude du transcriptosome aussi bien que pour l'étude de la diversité génétique des bactéries. Deux classes de plaque d'ADN, microarrays et macroarrays, sont utilisées. Ces techniques sont le plus souvent appliquées dans les études de génotypage bactérien et dans la détection de mutations (Cai, H. Y., et al., 2003). Cependant ces techniques sont limitantes dans le cas de la différenciation entre des souches bactériennes très rapprochées (Olive, D. M., et al., 1999).

I.3.2.9. Méthode de séquençage : Illuminaseq

Les méthodes basées sur le séquençage ont un grand avantage et sont plus reproductibles que les méthodes basées sur l'analyse des bandes puisqu'elles sont fondées par exemple dans notre étude sur le séquençage des régions hypervariables V4 des gènes 16S ARNr. Ces techniques de séquençage sont très efficaces puisqu'elles identifient des variations génétiques (délétions,

insertions, SNPs...) qui permettent de différencier et de classer phylogénétiquement les souches bactériennes. Parmi les méthodes basées sur le séquençage de l'ADN, nous allons décrire uniquement la méthode Illuminaseq qui a été utilisée au cours de ces travaux. C'est une technologie de séquençage sur puce et elle regroupe plusieurs techniques: les bio puces à ADN, la nanotechnologie, une étape de la technique de Sanger (CRT « Cyclic Reversible Termination), des outils informatiques pour l'analyse. Son principe s'explique par une incorporation réversible de nucléotides fluorescents suivie d'une lecture optique de la fluorescence. Il s'agit d'une terminaison de synthèse basée sur l'utilisation d'un terminateur réversible contenant une protection qui termine la synthèse d'ADN. Le photoclivage élimine le groupement de protection ce qui permet la suite de synthèse d'ADN. Elle consiste en plusieurs étapes : i) Hybridation d'une amorce de séquençage universelle ; ii) Extension d'une seule base à chaque cycle par l'utilisation de nucléotides modifiés (« reversible terminators ») et marqués par fluorescence (une couleur par base) ; iii) Cycle individuel de séquençage : (1) ajout d'une base, (2) acquisition d'image, (3) clivage chimique du groupement « terminator » et du marquage fluorescent pour le cycle suivant. Son avantage réside du fait qu'il s'agit d'une technologie avec le débit le plus important et le coût/base faible ; cependant elle présente des limites étant de précision inférieure à la méthode classique de Sanger. Au cours des dernières années, les amplicons des gènes 16S rRNA ont été analysés en utilisant les méthodes d'empreinte moléculaires en combinaison avec la construction de bibliothèques de clones d'ADN et avec le séquençage de Sanger. Toutefois, ceci n'était pas suffisant pour couvrir et décrire les communautés microbiennes. De nos jours, ces méthodes doivent être couplées aux techniques de séquençage à haut débit qui permettent l'étude d'un nombre énorme de séquences provenant de plusieurs échantillons simultanément (Andersson, A. F., et al., 2008 et Hamady, M., et al., 2008). Ces approches ont proposé une compréhension plus profonde de la diversité des communautés microbiennes (Sogin, M. L., et al., 2006 et Herlemann, D. P. R., et al., 2011) et elles ont permis, par l'accroissement du nombre d'échantillons, d'élargir les possibilités

d'étudier les dynamiques communautaires et des populations sur des échelles temporelle et spatiale plus fines (Eiler, A., et al., 2012 et Herlemann, D. P. R., et al., 2011).

En conclusion, la méthode idéale de génotypage doit avoir les caractéristiques suivantes : validité (applicable à tous les isolats), discriminante (capable de différencier entre les isolats), reproductible, répétitive, rapide, à coût réduit et facile à utiliser. En 2001 puis en 2003, les méthodes PCR-RFLP, TGGE, MLST, et cDNA microarrays ont été démontrées plus adaptées que les autres techniques pour l'étude des échantillons environnementaux et humains qui renferment plusieurs microbes (Kellenberger, E. 2001 et Rappé, M. S., et al., 2003).

II. L'intérêt de l'étude de l'écologie des sols

Préserver les agricultures contre les attaques des pathogènes et protéger l'Homme des épidémies transmises par les diptères vecteurs de maladies sont les deux enjeux majoritairement défendus par la lutte biologique. En effet, les agents utilisés pour le bio contrôle sont des bactéries isolées des sols qui se caractérisent par des formes de résistances dans le sol face aux stress environnementaux et par des propriétés insecticides pour servir à la lutte. Les sols étudiés dans mes travaux de thèse étaient les sols de chêne et de pins libanais. En effet, en 2005, le couvert forestier total libanais (terrain > 0,5 ha avec des arbres > 5 m et une canopée couvrant plus de 10 % du terrain où les arbres sont capables d'atteindre des tailles *in situ*), selon les critères de la FAO 2001, a été estimé à 139 376 ha, soit 13,2 % de la superficie totale du pays. Il est divisé en 3 classes : forêts de feuillus (incluant les chênes) (78 840 ha, 56.6 %), forêts de conifères (incluant les pins) (43 657 ha, 31.2 %) et forêts mixtes (16 879 ha, 9.9 %) (Professeur Magda Boudagher Kharrat, le dossier : nouvelles des forets

méditerranéennes numéro 17, Mars 2010). La présence prédominantes de ces deux sols nous ont mené à investiguer leur diversité microbienne plus particulièrement leur diversité en communautés de *Firmicutes* qui regroupent des bactéries avantageuses et formant ainsi des agents prometteurs pour la lutte contre les diptères spécifiquement.

II.1. Les « *Firmicutes* » des sols

La plupart des bactéries intéressantes dans la lutte biologique appartient au phylum des *Firmicutes*. Le phylum des *Firmicutes* (*Firmus cutis* : peau dure) a été décrit en 1978 par Gibbons et coll. comme regroupant les bactéries à Gram positif. Il a été ensuite divisé en deux pour séparer les bactéries à bas pourcentage G+C, de celles à haut pourcentage G+C qui sont aujourd'hui classées dans le phylum *Actinobacteria*. Dans ce phylum, nous trouvons de façon exceptionnelle des bactéries présentant différents types de paroi (paroi de type Gram négatif et des bactéries dépourvues de paroi). Les bactéries dépourvues de parois, regroupées dans la classe des Mollicutes, avaient été rattachées en 2004 au phylum des *Firmicutes* ; cependant, les travaux de Ludwig et al., en 2009 ont rapidement transféré cette classe dans son phylum d'origine, les *Tenericutes* (Ludwig, W., et al., 2009). Le phylum *Firmicutes* tel qu'il est décrit par Garrity en 2005 est un phylum hétérogène (Garrity, G. M., et al., 2005). Comme la plupart des phyla, il regroupe des bactéries diverses du point de vue de leur métabolisme respiratoire : anaérobies facultatives (streptocoques, lactobacilles...), anaérobies strictes (le genre *Clostridium*), et aérobies (*staphylocoques*, *Listeria spp.*, *Bacillus spp.*, ...), leur morphologie (bacilles, cocci) et leur capacité à former des endospores bactériennes. Le phylum *Firmicutes* comprend actuellement plus de 300 genres bactériens dont plusieurs interviennent dans différents domaines des activités humaines (agroalimentaire, industrie, médecine...) et certains sont responsables de pathologies.

Beaucoup de *Firmicutes* produisent des endospores et sont trouvés dans des environnements différents. Depuis 1980, le *Bergey's Manual of Systematic*

Bacteriology tente de donner et réactualiser la taxonomie du phylum des *Firmicutes*. Ce phylum a été divisé finalement en 3 classes : les *Clostridia*, qui regroupent les bactéries anaérobies, les *Bacilli*, aérobies obligatoires ou facultatifs et les *Erysipelotrichi* (Ludwig, W. et al., 2009). Il est d'ailleurs crucial de noter que les membres des deux genres *Clostridium* et *Bacillus* ont longtemps été considérés comme des membres importants des communautés bactériennes du sol (Garrity, G. M. et al., 2004) et constituent de ce fait les deux genres de bactéries sporulantes les plus abondants au sein du phylum *Firmicutes*. Leur impact dans des domaines aussi variés tels que l'agriculture (ex : *Bacillus thuringiensis* est l'insecticide le plus utilisé au monde en agriculture biologique), la médecine, la production alimentaire et l'écologie en fait un sujet vital d'enquête.

Des limitations apparaissent quant à l'étude de la biodiversité de ce phylum et de l'évolution phylogénétique des bactéries y appartenant. En effet, les caractéristiques phénotypiques des *Firmicutes* ont tendance à être moins conservées à partir du niveau de famille, donc elles ne sont pas des indicateurs fiables de relations phylogénétiques. Cependant parmi les techniques moléculaires et les gènes qui y sont utilisées, l'étude du marqueur phylogénétique 16S ARNr, est capable de distinguer les espèces appartenant à ce phylum des autres bactéries.

Dans ce qui suit nous allons nous intéresser aux bactéries telluriques sporulantes de ce phylum qui préoccupent tout le marché mondial des agents de lutte biologique. Pour résister à la dessiccation, à d'autres stress environnementaux et pour préserver dans les sols, à part la présence de solutés compatibles, certaines bactéries ont la propriété de former de petites unités sphériques douées d'une extraordinaire résistance : endospores. Les endospores sont construites au sein du cytoplasme de certaines espèces de bactéries plus particulièrement dans la cellule mère en différenciation, laquelle se lyse et relâche une spore libre (phénomène de sporulation). Ce qui caractérise les spores, c'est d'abord leur faible teneur en eau. En effet, les cellules bactériennes végétatives contiennent environ 80 % d'eau alors que les spores

n'en contiennent pas plus de 15 %. Cette faible teneur en eau est une des explications des multiples formes de résistance des spores. Les endospores sont thermorésistantes, à titre d'exemple, celles de *Plectridium (Clostridium) caloritolerans* résistent plus de 8 heures à 100 °C et 5 minutes à 120 °C (Margosch, D., et al., 2006). Outre leur faible teneur en eau, les parois des spores contiennent un sel de l'acide dipicolinique (dipicolinate de calcium). Ce sel confère à la spore une résistance à la chaleur humide, sa faible teneur en eau et participe aux mécanismes de sa résistance et lui permet d'être dormante et viable pendant de très longues périodes (Ramirez-Peralta, A., et al., 2012). Par ailleurs, l'acide N succinyl-glutamique, synthétisé dès le début de la sporulation, contribue aussi aux mécanismes de la thermo-résistance (Millet, J., et al., 1960).

Les bactéries qui forment des endospores habitent principalement des sols soumis en permanence à des perturbations de tout ordre. Les endospores peuvent être détectées par chauffage de la culture entre 70 et 80 °C pendant 10 minutes (Alexander M., et al., 1982), suivi d'une incubation sur un milieu de culture approprié. Toutefois, l'endospore n'est pas seulement thermorésistante, elle survit plutôt bien aux attaques des acides, des bases, des antiseptiques, des rayons UV ou X, des antibiotiques, etc. (Leclerc, H., et al., 1975).

L'importance des endospores dans l'environnement sol vient de: (1) leur présence ubiquitaire dans le sol, (2) leur résistance à la chaleur dans le sol (elles permettent à la bactérie de survivre dans des conditions rudes et dans de nombreux processus industriels et biotechnologiques, (3) leur capacité à germiner et à croître dans des conditions favorables...

Les endospores se forment au sein de deux classes bactériennes principales : les **Bacilli** et les **Clostridia**, du phylum des **Firmicutes**. Dans ce qui suit, nous nous intéresserons qu'aux bactéries sporulantes de l'espèce *Bacillus thuringiensis* du genre *Bacillus* appartenant à ce phylum dont nous détaillerons sa participation dans la lutte biologique contre les diptères

II.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

II.2.1. Historique

La bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été le premier microorganisme adopté dans le monde comme bio pesticide. Actuellement, il s'agit du micro-organisme le plus utilisé en lutte biologique. Bt appartient à la famille des *Bacillaceae* faisant partie du groupe *Bacillus cereus* (Bc) qui comprend : *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus manliponensis* et *Bacillus bingmayongensis* (Liu, Y., et al., 2015). Bt est l'agent principal utilisé en lutte biologique puisqu'il se caractérise par sa capacité à produire des inclusions cristallines parasporales à activité entomopathogènes. Etant un agent très adéquat en environnement, cette bactérie, donc, possède la propriété de se multiplier facilement en fermenteurs, les produits formulés à la base de cette bactérie sont très sélectifs, se conservent bien et à prix abordable.

Cette bactérie a été découverte pour la première fois au Japon Shigetane Ishiwata en 1901 dans un élevage de vers à soie (*Bombyx mori*) (Ishiwata, S., et al., 1901). En 1915, Bt a été de nouveau isolée en Thuringe en Allemagne par le bactériologiste allemand, Ernst Berliner, à partir de larves mortes d'*Ephestia kuehniella* (*E.kuehniella*) (Gonzalez, J.M., et al., 1980). Le nom de l'espèce « *thuringiensis* » lui a été attribuée tenant compte de la ville de son identification. En 1915, Berliner a décrit la présence d'une inclusion parasporale trouvée dans la bactérie et ce n'est qu'en 1951, que l'activité insecticide de Bt a été attribuée à cette inclusion parasporale. Après l'utilisation pour la première fois de Bt en 1920 en Hongrie pour contrôler les lépidoptères (Beegle, C.C. et al., 1992), les laboratoires Libec en France ont commercialisé en 1938 le premier bio pesticide à base de Bt : la sporéine. Au cours des années 50, la souche *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) connue sous le nom de HD1 a été isolée et identifiée par Howard Dulmage. HD1 a montré un grand spectre d'activité sur les

lépidoptères tout en montrant une innocuité pour les insectes non ciblés suite au traitement grâce à son inclusion cristalline bipyramidale.

Jusqu'en 1975, 13 sous espèces de *Bt* ont été identifiées ayant une activité sur les lépidoptères. Toutefois, en 1976, deux scientifiques Goldberg et Margalit ont isolé une nouvelle souche *Bt subsp. israelensis (Bti)* (Anderson, I., et al., 2005 du désert Néguev en Israël. Cette souche s'est révélée toxique sur les moustiques (Goldberg, L. J., et al., 1977) et son inclusion cristalline est composée des protéines majeures Cry4A, Cry4B, Cry11A, et Cyt1A. Etant active sur les diptères, *Bti* fut commercialisée pour le contrôle des moustiques et des mouches vecteurs de maladies. En 1983, une troisième sous-espèce *Bt. subsp. tenebrionis* connue sous le nom de *Bt subsp morrisoni*, active sur les coléoptères a été découverte en Allemagne. Cette souche produit des cristaux rhomboédriques composés de protéines Cry3A (Krieg, A., et al., 1983).

Les différentes sous-espèces de *Bt* peuvent être isolées à partir de plusieurs origines comme par exemple: sol d'où nos souches utilisées dans cette thèse ont été isolées (Smith, R. A., et al., 1991 et Carozzi, N. B., et al., 1991), des insectes (Carozzi, N. B., et al., 1991), de la poussière (Meadows, M. P., et al., 1992), des feuilles de conifères (Smith, R. A., et al., 1991 et Kaelin, P., et al., 1994)... Par la suite, les différentes souches isolées sont classées en 82 sérovars selon leurs propriétés biochimiques et l'antigène flagellaire H. Ces souches produisent environ 300 inclusions protéiques différentes (de Barjac, H., et al., 1968 et Lecadet, M. M., et al., 1999).

II.2.2. Identification et classification des sous-espèces de *Bt*

La classification des sous-espèces de *Bt* sur la base de l'analyse sérologique des flagelles (H) antigènes a été introduite dans les années 1960 (de de Barjac, H., et al., 1962). Les sérovariétés correspondent à des sous-espèces bien définies comme par exemple H1 correspond à *Bt subsp. thuringiensis*. Cette classification par sérotype a été complétée par des critères morphologiques et biochimiques (Barjac, H. d., et al., 1981). Jusqu'en 1977, seuls 13 sous-espèces

de *Bt* ont été décrites, et à ce moment toutes les sous-espèces étaient toxiques sur les larves de lépidoptères seulement. La découverte d'autres sous-espèces toxiques sur les diptères, *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) (Goldberg, L.J., et al., 1977), les coléoptères (Krieg, A., et al., 1983) et les nématodes (Narva et al., 1991) a élargi la gamme d'hôtes et a nettement augmenté le nombre de sous-espèces. Jusqu'à la fin de 1998, plus de 67 sous-espèces ont été classées selon les propriétés immunologiques de l'antigène flagellaire H (Tableau 1). La sérologie du cristal a montré qu'un cristal donné peut être produit par un ou plusieurs sérotypes H (Krywienczyk, J., et al., 1978). De plus, une étroite corrélation a été observée entre la classification basée sur l'antigène flagellaire H et l'activité insecticide liée au contenu plasmidique en gènes *cry* malgré le fait que ces deux critères ne soient pas liés.

Tableau 1 : Classification courante de 67 sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* basée sur leur antigène flagellaire (H)^a (WHO, 1999).

Flagellar antigens	<i>B.thuringiensis</i> subspecies						
1	<i>thuringiensis</i>	15	<i>dakota</i>	28a,28c	<i>jegathesan</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
2	<i>finitimus</i>	16	<i>indiana</i>	29	<i>amagiensis</i>	52	<i>kim</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	17	<i>tohokuensis</i>	30	<i>medellin</i>	53	<i>asturiensis</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	18a,18b	<i>kumamotoensis</i>	31	<i>toguchini</i>	54	<i>poloniensis</i>
3a, 3d	<i>smiyoshiensis</i>	18a,18c	<i>yosoo</i>	32	<i>cameroun</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
3a,3d,3e	<i>fukuokaensis</i>	19	<i>tochigiensis</i>	33	<i>leesis</i>	56	<i>rongseni</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	20a,20b	<i>yunnanensis</i>	34	<i>konkukian</i>	57	<i>pirenaica</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	20a,20c	<i>pondicheriensis</i>	35	<i>seoulensis</i>	58	<i>argentinensis</i>
5a,5c	<i>galleriae</i>	21	<i>colmeri</i>	36	<i>malaysiensis</i>	59	<i>iberica</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	22	<i>shandongiensis</i>	37	<i>andalousiensis</i>	60	<i>pingluonsis</i>
6	<i>entomocidus</i>	23	<i>japonensis</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
7	<i>aizawai</i>	24a,24b	<i>neoleonensis</i>	39	<i>brasiliensis</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
8a,8b	<i>morrisoni</i>	24a,24c	<i>novosibirsk</i>	40	<i>huazhongensis</i>	63	<i>bolivia</i>
8a,8c	<i>ostrinae</i>	25	<i>coreanensis</i>	41	<i>sooncheon</i>	64	<i>azorensis</i>
8b,8d	<i>nigeriensis</i>	26	<i>silo</i>	42	<i>jinghongiensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	27	<i>mexicanensis</i>	43	<i>guiyanguebsus</i>	66	<i>gracioensis</i>
10a,10b	<i>damstadiensis</i>	28a,28b	<i>monterrey</i>	44	<i>higo</i>	67	<i>vazensis</i>
10a,10c	<i>londrina</i>			45	<i>roskildiensis</i>		
11a,11b	<i>toumanoffi</i>			46	<i>chanpaisis</i>		
11a,11c	<i>kyushuensis</i>			47	<i>wratislaviensis</i>		
12	<i>thompsoni</i>			48	<i>balearica</i>		
13	<i>pakistani</i>			49	<i>muju</i>		
14	<i>israelensis</i>			50	<i>navarrensensis</i>		

^a Données livrées par l'Unité des Bactéries Entomopathogènes, Institut Pasteur, Paris, France

II.2.3. Cycle de croissance de *Bt*

Le cycle de vie de *Bt*, autrement dénommé le cycle de sporulation, est caractérisé par deux étapes qui comprennent la division cellulaire végétative et le développement des spores (Bulla LA., et al., 1980). La cellule végétative est en forme de tige (2-5 µm de long et environ 1.0 µm de large) et se divise en deux cellules filles uniformes suite à la formation d'une cloison initiée à mi-chemin de la membrane plasmique. La sporulation, quant à elle, implique une division cellulaire asymétrique et se caractérise par sept étapes (Bechtel, D. B., et al.,

1982) qui comprennent (stade I) la formation de filament axial, (phase II) formation de l'inclusion cristalline parasporale et de la présore, (phase III) gonflement de la cellule, (phase IV à VI) formation de la paroi cellulaire, du cortex et de l'enveloppe de la spore, (phase VII) maturation de la spore et lyse sporangiale (Figure 4). Une fois la spore se trouve dans des conditions de croissance favorables, elle sera réhydratée et germe pour donner une cellule végétative qui débutera son cycle de croissance. Ce cycle de division se répète pour donner un ensemble de population sécrétant des enzymes nécessaires à la dégradation de la matière nutritive et à son assimilation. Si le substrat nutritif devient limité, les bactéries rentrent alors dans la phase stationnaire formant ainsi les spores et les cristaux protéiques. En effet, la production des cristaux protéiques de *Bt* pendant la sporulation est un phénomène biologique unique régulée génétiquement qui, probablement, soulage le stress physique en compensant les pertes d'eau au cours de la formation de spores et offre un avantage supplémentaire de survie en exerçant une action létale contre les insectes-hôtes.

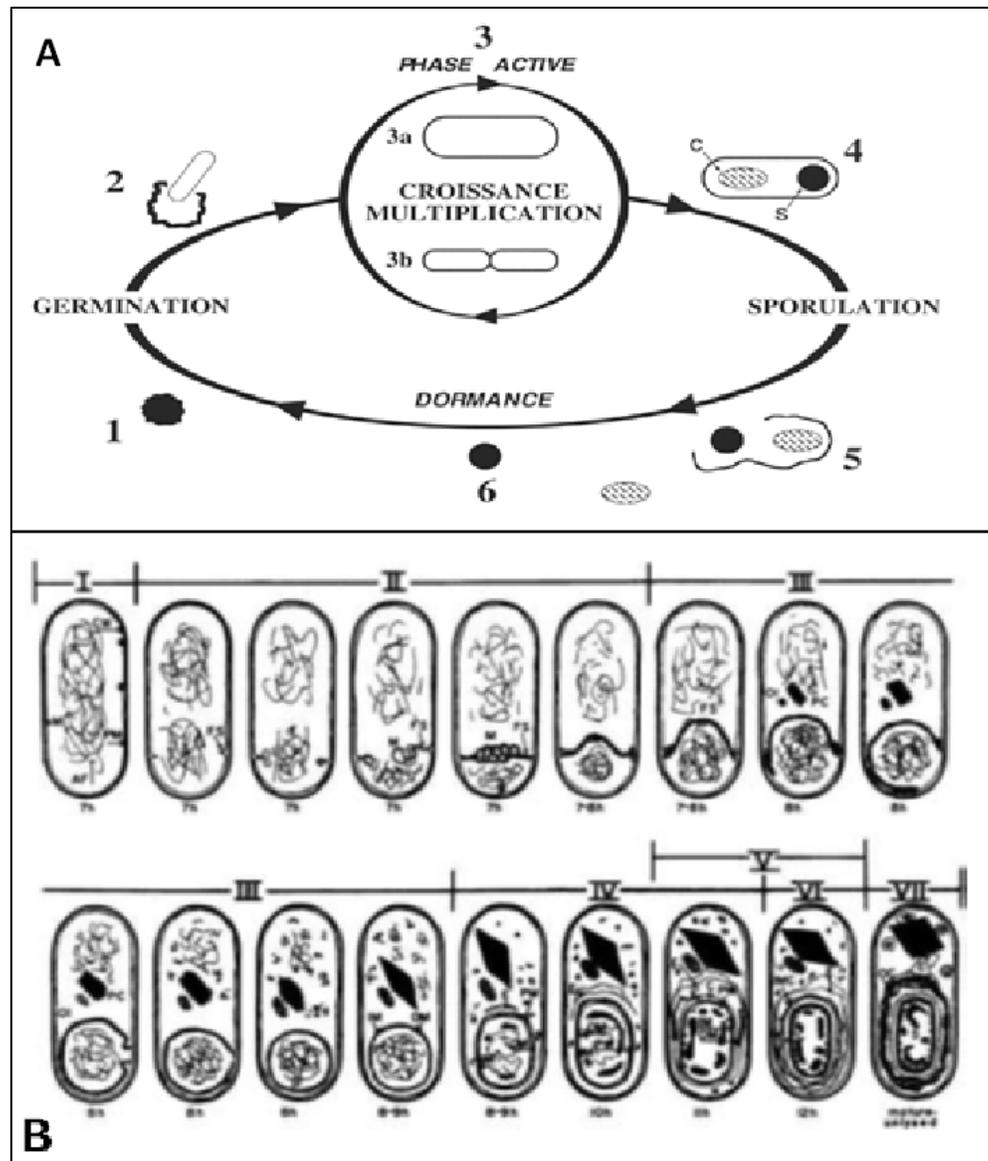


Figure 4. A : Schéma représentatif du cycle vital de *Bacillus thuringiensis*. 1 : germination (réhydratation de la spore), 2 : germination (production de la cellule végétative), 3 : croissance et multiplication des cellules végétatives, 4 : sporulation (formation de la spore (S), et l'inclusion cristalline (C), 5 : lyse et éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et de l'inclusion cristalline, 6 : période de dormance lors des conditions défavorables. (DR. J. O. Lacoursière et Dr. J. Boisvert, université du Québec à Trois-rivieres) **B :** Représentation schématique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis*. Abréviations: M, mésosome; CW, cellule mure ; PM, membrane plasmique ; AF, filament axiale; FS, septum de la préspore; SI, préspore naissante; OI, inclusion

ovoïde ; PC, cristal parasporal ; F, présore ; IM, membrane interne ; OM, membrane externe ; PW, paroi cellulaire primordiale ; E, exosporium ; LC, manteau lamellaire de la spore ; OC, manteau externe de la spore ; C, cortex ; IMC, cytoplasme de la cellule mère ; S, spore mature (Bechtel, D. B., et al., 1976).

III. *Bt* : Bactérie modèle pour la lutte biologique

III.1. Différents facteurs insecticides produits par *Bt*

Bt produit de nombreux facteurs insecticides au cours et à la suite de la phase de croissance logarithmique. En fait, ces facteurs interfèrent dans de nombreux processus cellulaires et de toxicité de *Bt*.

III.1.1. Bêta-Exotoxines (ou Thuringiensin)

Thuringiensin (Thu), également connu sous le nom de β -exotoxine, est un petit oligosaccharide thermostable (701 Da), qui est sécrété par *Bt* pendant sa croissance végétative et ceci indépendamment de la formation du cristal parasporal et des spores. Thu est connu pour être un analogue de l'ATP qui interfère avec l'ARN polymérase; il inhibe la synthèse d'ARN en rentrant en compétition avec l'ATP sur les sites de liaison (Beebe, T., et al., 1972). Il a une activité insecticide contre un large éventail d'insectes (espèces de diptères, coléoptères, lépidoptères, hyménoptères, orthoptères et isoptères, et plusieurs espèces de nématodes) (Liu, X., et al., 2014). Thu affecte également la mue et la nymphose chez les insectes et induit des effets tératologiques à des doses subléthales comme des malformations des antennes, des ailes, des jambes et des parties buccales. Les adultes atteints deviennent soit infertiles soit auront une durée de fécondité et de longévité réduite (Ignoffo, C.M., et al., 1977).

III.1.2. Protéines Insecticides Végétatives (VIP)

En plus des cristaux protéiques à activité insecticides (ICPs), certaines souches de *Bt* produisent des toxines insecticides pendant leur phase de croissance végétative. Ces toxines sont appelés les protéines insecticides végétatives (VIP). Ces protéines ont démontré une nocivité contre plusieurs lépidoptères comme « Dark cut worm » (*Agrotis ipsilon*) et le « Coton leaf roller » (*Haritalodes derogata*) (Kullik, S. A., et al., 2011 et Fadare, T. A., et al., 2004). L'effet toxique de ces VIPs est détecté à des concentrations basses comparées aux doses utilisées pour les toxines Cry contre les lépidoptères (J. Liu, F. S., et al., 2007).

Les toxines VIPs sont divisées en deux groupes selon leur activité spécifique contre les lépidoptères et les coléoptères respectivement : i) le premier groupe inclut deux toxines, Vip1a (a) (~97 kDa) et Vip2a (a) (~49 kDa) (<http://www.btnomenclature.info/>) qui ont été décrites chez *B. cereus* (Carozzi, N., et al., 1997) et leur homologues Vip1a (b) et Vip2a (b) produites chez *B. thuringiensis*. Ces toxines ont été trouvées actives sur les coléoptères et sans aucun impact sur les lépidoptères. ; ii) le deuxième groupe de VIPs est dominé par les toxines Vip3a de 88 kDa qui sont actives sur les lépidoptères (Estruch, J.J., et al., 1996). Une nouvelle protéine a été identifiée par Sun et al. en 2010 et désignée Vip4Aa1 (Liu, X.Y., et al., 2010). Le gène *vip4Aa1* est de 2895 pb de long codant une séquence d'acides aminés de 965 résidus et la protéine déduite a un poids moléculaire de ~ 108 kDa. Sa séquence protéique prédite présente 34 % d'identité par comparaison à la protéine Vip1Aa1. Vip4Aa1 semble être phylogénétiquement plus étroitement liée aux protéines Vip1 qu'aux deux autres groupes de Vip (Vip2 et Vip3) (Crickmore, N., et al., 2014).

III.1.3. Zwittermicin A

Zwittermicine A est un aminopolyol linéaire produit par *B. cereus* UW85 qui représente une nouvelle classe d'antibiotique. Il a été tout d'abord identifié pour son rôle dans la protection des plantes contre les attaques par des espèces de la famille des *Oomycètes* et par quelques bactéries Gram négatifs (Zhou, Y.,

et al., 2008). Zwittermicin A est qualifié par un spectre microbicide large contre les bactéries Gram positifs, Gram négatifs et les microorganismes eucaryotes (Silo-Suh, L. A., et al., 1994). Il contribue également à la potentialisation de l'activité insecticide des protéines Cry produites par *Bt*, conduisant à l'intensification de la létalité des insectes infectés par *Bt* (Broderick, N. A., et al., 2000).

III.1.4. Chitinases

Les chitinases sont produites par divers microorganismes comme les bactéries (Ajit, N. S., et al., 2006), les actinomycètes, les champignons (Viterbo, A., et al., 2001) et aussi par les plantes supérieures (Matsushima, R., et al., 2006). Les chitinases sont utilisées comme des agents de bio contrôles potentiels contre nombreux champignons pathogènes et cela du fait de leur intervention dans la dégradation de la chitine. Le rôle potentiel de la chitinase dans le bio contrôle des insectes et des moustiques est également étudié (Hayes, M., et al., 2008). Plusieurs genres de bactéries comme *Pseudomonas*, *Serratia*, et *Bacillus* sont connus de produire les chitinases parce qu'ils utilisent la chitine comme source de carbone et d'azote (Kallassy Awad, M., et al., 2005).

III.1.5. Protéine Insecticide Secrétée (Sip)

La protéine insecticide sécrétée (Sip) constitue le premier et le seul membre de la famille des protéines secrétées par *Bt* ayant une toxicité démontrée contre les larves de coléoptères. Le gène *sip1Aa1* est de 1104 pb et code pour une protéine de 367 acides aminés de ~ 41 kDa. Son homologie avec les toxines diptéricides MTX3 (membre de la famille des toxines ETX_MTX2) suggère fortement que la toxicité Sip1Aa1 se manifeste par la formation de pores, mais son mode d'action reste inconnu (Donovan, W. P., et al, 2006). Sip1Aa1 cause la mort pour *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) et inhibe la croissance de *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae) et *D. virgifera virgifera*.

III.1.6. Sphaérolysines et Alvéolysines

Les protéines liées aux cytolysines cholestérol-dépendante, comme les sphaérolysines et les alvéolysines, sont produites par certaines souches de *Bacillus* (Schnepf, H. E., et al., 1981). La sphaérolysine produite par *Bacillus sphaericus* induit une hémolyse suite à la formation de pores membranaire. Elle induit cette hémolyse contre le cafard *Blattella germanica* (« German cockroaches ») et les lépidoptères *Spodoptera litura* (Nishiwaki, H., et al., 2007). Par ailleurs, les alvéolysines sont des toxines thiol-dépendantes produites par *Bacillus alvei* et sont impliquées comme cofacteur dans un processus d'hémolyse (Geoffroy, C., et al., 1995).

III.1.7. Protéines accessoires P19 et P20

Un grand nombre de protéines Cry, par exemple, celles dont leur taille de protoxines est de 125-140 kDa et dont leur forme active comporte les 3 domaines, sont capables de diriger leur propre cristallisation. Cependant, d'autres toxines comme la toxine Cry11Aa de *Bti*, peuvent nécessiter la collaboration d'au moins une des deux protéines accessoires auxiliaires (P19 et P20) (Berry, C., et al., 2002 et Ibrahim, M.A., et al., 2010) pour la stabilité de production de cristaux parasporaux. Ces protéines auxiliaires peuvent avoir également d'autres rôles. P19 joue un rôle dans les interactions protéines-protéines (11.7 % de sa séquence en acides aminés sont des résidus cystéines) qui sont essentielles à l'assemblage du cristal (Dervyn, E., et al., 1995) et à sa stabilisation par des ponts disulfures. P20 augmente l'expression et la cristallisation de la protéine Cry1Ac dans la souche acristallifère de *Bt* (Shao, Z., et al., 2010) et agit en synergie avec l'activité toxique de Cry11A contre le troisième stade larvaire de *A. aegypti* (Xu, Y., et al., 2001). P20 semble également avoir un rôle dans la stabilisation de Cyt1Aa et être impliquée dans l'augmentation de la production de Cyt dans *Bt* (Wu, D., et al., 1993 et Nisnevitch, M. C., et al., 2006). En effet, elle augmente la production de Cyt et Cry11A de façon à ce que ces deux toxines soient en quantité plus importante que la protéine Cry4A chez *Bti* (Yoshisue, H., et al., 1992).

III.1.8. Le cristal parasporal (les delta-endotoxines ou δ -endotoxines)

Les cristaux parasporaux de *Bt* sont des oligomères constitués de sous-unités de polypeptide riches en résidus glutamate et aspartate (10-15 %) qui confèrent de points isoélectriques bas observés chez les cristaux solubilisés (Huber, H. E., et al., 1981). Cystéine, méthionine, tryptophane et histidine sont présents beaucoup moins régulièrement, environ une fois chacun, pour chaque centaine de résidus (Fast, P. G. 1981). Le cristal protéique peut être composé de plusieurs protéines différentes comme le cristal protéique de la souche *Bti* qui contient 6 toxines différentes: Cry4A, Cry4B, Cry11A, Cry10, Cyt1A et Cyt2A. Le cristal parasporal est lui responsable de la toxicité des souches contre les larves d'insectes.

III.1.9. Les protéases secrétés par *Bt*

Bt produit des protéases tout au long du cycle de croissance. Il s'agit de deux types de protéases, les intracellulaires et les extracellulaires, produites respectivement lors de la phase de sporulation et la phase végétative (Brar, S. K., et al., 2007). Ces protéases jouent un rôle dans la synthèse des spores et des δ -endotoxines à trois niveaux: (i) la lyse cellulaire conduisant à la libération du cristal protéique et de la spore en fin de phase stationnaire (Balaban, N. P., et al., 2003), (ii) la dégradation des substrats du milieu de culture pour permettre à la bactérie de puiser les acides aminés nécessaires à la synthèse des spores et des toxines (Tan, Y., et al., 2001) et (iii) l'expression des gènes de sporulation *spo* et des gènes *cry* (Aronson, A. 2002). Cependant, ces protéases peuvent affecter la stabilité des toxines Cry (Brar, S. K., et al., 2007). Il existe 2 classes majeures de protéases selon leur site d'action: exopeptidases et endopeptidases. Ces protéases sont globalement impliquées dans le renouvellement des protéines, les modification des enzymes (ex : inactivation par clivage), la régulation de l'expression de gènes (ex : modification protéolytique de la sous-unité bêta de l'ARN polymérase de *Bt*) (Lecadet, M-M., et al., 1977), déclenchement du processus de la sporulation chez *Bacillus* (Dancer, B. N., et al., 1975)...(Rao, M. B., et al., 1998) (Figure 5).

Les exopeptidases agissent uniquement à proximité des parties terminales des chaînes polypeptidiques. Elles sont classifiées en amino- et carboxypeptidases selon la localisation de leur site d'action en N-terminal ou en C-terminal à savoir : i) les aminopeptidases : agissent en N-terminal des chaînes polypeptidiques et libèrent un résidu d'acides aminés, un dipeptide ou un tripeptide. Ces protéases existent chez de nombreuses variétés de champignons et d'espèces bactériennes (Watson, R. R., et al., 1976). En effet, ce sont des enzymes intracellulaires à l'exception d'une aminopeptidase extracellulaire produite par *Aspergillus oryzae* (Labbe, J. P., et al., 1974). ii) les carboxypeptidases : agissent en C-terminal des chaînes polypeptidiques et libèrent un résidu d'acides aminés ou un dipeptide. Elles sont divisées en 3 groupes, carboxypeptidases à sérine, métallocarboxypeptidases, et carboxypeptidases à cystéine, selon la nature de l'acide aminé au niveau de leur site actif. Les carboxypeptidases à sérine sont isolées à partir de *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Aspergillus spp* et *Bacillus spp*. Elles sont toutes similaires au niveau de leur spécificité vis-à-vis du substrat mais elles diffèrent au niveau du pH optimal, de la stabilité, du poids moléculaire et des effets de leurs inhibiteurs. Les métallocarboxypeptidases, isolées de *Saccharomyces spp.* (Felix, F., et al., 1966) et *Pseudomonas spp.* (Lu, A. Y. H., et al., 1969), requièrent pour leur activité les cofacteurs Zn^{2+} or Co^{2+} . Quant aux carboxypeptidases à cystéines ou carboxypeptidases thiols, elles ont un résidu cystéine au niveau de leur site actif et sont activées à un pH optimal neutre par des agents réducteurs tels que la cystéine ou le mercaptoéthanol et inhibées par les réactifs sulphydryl comme le p-chloro mercuribenzoate (pCMB).

Les endopeptidases sont caractérisées par leur action au niveau des ponts peptidiques des chaînes polypeptidiques loin des extrémités N et C-terminales. Elles sont divisées en 4 sous-groupes selon leur mécanisme catalytique : (i) protéases à sérine, (ii) protéases à acides aspartiques, (iii) protéases à cystéine, et (iv) métalloprotéases :

- Protéases à sérine: caractérisées par des résidus sérines et histidine au niveau de leur site actif. Ces enzymes sont le plus actives à un pH ≥ 7 .

- Elles sont inhibées par le diisopropyl fluorophosphate (DFP) et le phényl méthyl sulphonyl fluoride (PMSF) qui se lient covalamment au site sérine actif.
- Protéases acides: ont des résidus d'acides aspartiques au niveau de leur site actif et fonctionnent d'une façon optimale à un pH de 3-4. Ces enzymes sont trouvées très rarement chez les bactéries et plus fréquemment chez les levures et les champignons. Trois familles de protéases acides existent : les pepsines (A1), les rétropepsines (A2), et les enzymes des pararétrovirus (A3) (Barrett, A. J., et al., 2012).
 - Protéases à cystéines: 20 familles de protéases à cystéines sont connues. Leur activité dépend d'une dyade catalytique constituée de cystéine et histidine. En effet, l'ordre des résidus cystéines et histidines (Cys-His ou His-Cys) diffère entre les familles (Barrett, A. J., et al., 1994). Généralement, les protéases à cystéines sont uniquement actives en présence d'agents réducteurs comme le HCN (acide cyanhydrique) ou la cystéine. Ces protéases fonctionnent à un pH optimal neutre à l'exception de quelques-unes comme les protéases lysosomales qui s'activent à un pH acide. Les protéases à cystéines sont connues pour être susceptibles aux agents sulfhydriles comme l'acide p-chloromercuribenzoïque (PCMB) et sont non affectées par le diisopropyl fluorophosphate (DFP) et les agents chélateurs de métaux.
 - Métalloprotéases ou protéases chélateurs de métaux sensibles: elles requièrent un ion métal bivalent pour leur activité. Elles incluent des enzymes de diverses origines comme les collagénases des organismes supérieurs, les toxines hémorragiques du venin des serpents et la thermo lysines des bactéries (Hibbs, M. S., et al., 1985 ; Okada, Y., et al., 1986 et Shannon, J. D., et al., 1989). Les métalloprotéines sont inhibées par des chélateurs d'ions comme l'EDTA (Ethylènediaminetetraacetic acid) et le o-phénanthroline. Selon leur spécificité d'action, les métalloprotéases peuvent être divisées en 4 sous-groupes: (i) neutres, (ii) basiques, (iii) myxobacter I, et (iv) myxobacter II. Les protéases neutres

sont spécifiques des acides aminés hydrophobes, les protéases basiques ont un spectre large de spécificité, les protéases myxobacter I sont spécifiques aux résidus d'acides aminés de part et d'autre de la liaison à cliver et les protéases myxobacter II sont spécifiques aux résidus lysines de la liaison peptidique.

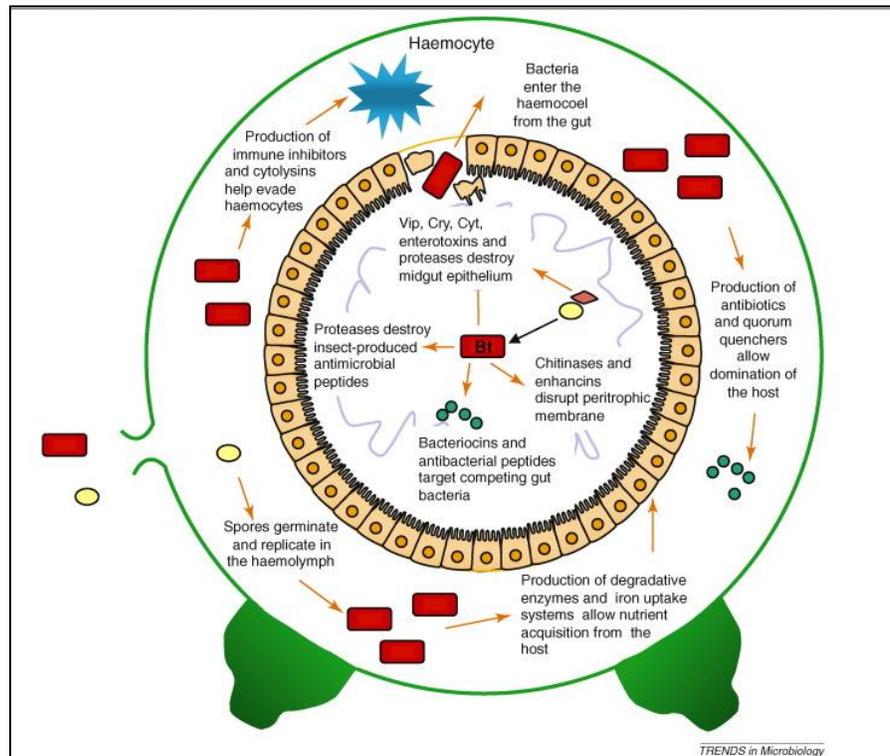


Figure 5 : Manifestation de *Bacillus thuringiensis* une fois ingérée par les larves d'insecte et processus d'intervention des protéases et d'autres métabolites sécrétés par *Bt* (Raymond, B., al., 2010).

III.2. Génomes et plasmides de *Bt*

Bt possède un génome de taille de 2.4 à 5.7 millions de paires de base (Carlson, C. R., et al., 1994). Des plasmides circulaires et/ou linéaires extra chromosomiques sont trouvées dans la plupart des souches isolées de *Bt* (Carlson, C. R., et al., 1994). Les protéines qui constituent les inclusions

parasporales sont codées par des gènes portés par des plasmides conjugatifs de haut poids moléculaires dont certains sont auto-transmissibles lors de la conjugaison (Gonzalez, J. M., et al., 1981). Une même souche peut contenir 1 à 17 plasmides de 2 à 80 MDa (Aptosoglou, S. G., et al., 1997). Il existe deux types de plasmides : les mégaplasmides de taille supérieure à 30 Mbp et les petits plasmides de taille inférieure à 30 Mbp. Ces derniers se trouvent sous un grand nombre de copies n'ayant pas un rôle spécifique. Les mégaplasmides se trouvent sous un nombre faible de copies et portent les gènes *cry* (Jensen, G. B., et al., 1995). Des génomes de souches différentes de *Bt* ont été séquencés et publiés. Nous citons notre souche de référence adoptée dans ces travaux de thèse, *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*). *Bti* abrite huit plasmides circulaires dont la taille varie entre 5 et 210 kb et un réplicon linéaire d'environ 16 kb (Carlton, B. C., et al., 1985). Un de ses plasmides de haut poids moléculaire (128 kb), dont le pourcentage en G+C est de 32.42 %, contient toute l'information génétique pour l'activité sur les diptères (Gonzalez, J., et al., 1984 ; Berry, C., et al., 2002 et GenBank: AL731825.1). Les gènes codant les protéines toxiques ont été clonés et exprimés, leurs séquences analysées et leur toxicité révélée menant à plusieurs informations décrites un peu plus tard dans ce manuscrit. Le sérotype H14, *Bti*, produit 4 toxines majeures (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa) spécifiques aux diptères (les moustiques, les mouches noires et les moucheron Chironomus).

III.3. Les protéines Cry et Cyt : classification, diversité et structure

III.3.1. Classification et diversité

La plupart des gènes *cry* codants pour les protéines insecticides de *Bt* (ICPs) résident sur de grands plasmides transmissibles (González et Carlton, 1984 ; González et al., 1984). Jusqu'à là, de nombreux gènes ont été clonés,

séquencés et même utilisés pour construire des souches de *Bt* ayant un nouveau spectre de toxicité (Höfte et Whiteley, 1989).

Les gènes *cry* connus de *Bt* codent pour des protéines Cry spécifiques à différents ordres d'insectes : lépidoptères (*cryI*), diptères et lépidoptères (*cryII*), coléoptères (*cryIII*), diptères (*cryIV*), lépidoptères et nématodes (*cryV*) (Höfte, H., et al., 1989). Une désignation séparée est adoptée pour les gènes cytolytiques (*cyt*) qui codent pour une protéine cytolytique, présente principalement chez *Bti*.

Cette nomenclature présentait des incohérences. Par exemple les deux gènes *cryIIB* et *cryIIA*, ayant une grande homologie, étaient classés ensemble malgré le fait que le gène *cryIIB* code pour une toxine active uniquement sur les lépidoptères et que le gène *cryIIA* code pour des toxines actives sur les diptères et les lépidoptères. Ces incohérences ont poussé Neil Crickmore à proposer une nouvelle nomenclature plus rationnelle (Crickmore, N., et al., 1998). Cette dernière est basée sur l'attribution de noms aux membres des superfamilles des gènes *cry* en fonction de leur degré de divergence évolutive estimé par des algorithmes et représenté par un arbre phylogénétique. Cette nomenclature a abandonné l'annotation romaine au profit du système arabe (ex : CryIVA devient Cry4A). Les alignements de séquence des gènes *cry* montrent la présence de cinq blocs relativement bien conservés (Figure 6). Tous les gènes *cry* séquencés ont été déposés dans la base de données de Neil Crickmore (<http://www.btnomenclature.info/>). 72 classes regroupent ces gènes en fonction du degré de similitude de leurs séquences. Ces classes sont divisées en sous-classes elles-mêmes contenant plusieurs groupes : la classe des *cry1* est divisée en *cry1A*, *cry1B*, *cry1C*... ; et chacune de ces sous-classes contient plusieurs groupes (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ae*...). Ceci est bien présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) qui montre les groupes des protéines Cry, les sous-espèces de *Bt* à partir desquelles elles ont été isolées et leurs principaux insectes cibles. Comme déjà cité plus haut, deux familles de toxines sont produites par *Bt* : les toxines Cry et les toxines Cyt. A l'intérieur de chaque famille, les toxines sont classifiées en fonction de leur homologie de séquences protéiques. Trois rangs sont adoptés pour classier les toxines (de Maagd RA.,

et al., 2001): i) le premier, représenté par un chiffre qui différencie les toxines possédant moins de 45 % d'identité de séquences protéiques (Cry1, Cry4, Cry11,...) ; ii) le deuxième utilise une lettre majuscule pour distinguer les toxines qui possèdent de 45 à 78 % d'identité de séquences protéiques (Cry4A, Cry4B,...) ; et le troisième rang, une lettre en minuscule est utilisée pour différencier les toxines possédant de 78 à 95 % d'identité de séquence protéique (Cry4Aa, Cry4Ab,...).

Tableau 2 : La nomenclature originale et actuelle de certains gènes *cry*, leurs groupes protéiques, les sous-espèces de *Bt* à partir desquelles elles ont été isolées et leurs principaux insectes cibles. (N / a: Non disponible ou Not available).

Original (based on host specificity and degree of amino acid hemology)	Current (based solely on amino acid identity)	Some Cry proteins variants	Origin (Bt subspecies)	Order (Diptera, Lepidoptera, Coleoptera)	Major target insects (Common names) (Jisha et al. 2013)
<i>cryI</i>	<i>cry1,cry2,cry9,cry15</i>	<i>CryIA(a)</i>	<i>kurstaki</i>	L	Silk worm, Tobacco horn worm, European corn borer
		<i>CryIA(b)</i>	<i>berlineri</i>	L&D	Tobacco horn worm, Cabbage worm, Mosquito
		<i>CryIA(c)</i>	<i>kurstaki</i>	L	Tobacco budworm, Cabbage looper, Cotton bollworm
		<i>CryIA(d)</i>	<i>aizawai</i>	L	Several Lepidoptera
		<i>CryIA(e)</i>	<i>alesti</i>	L	Tobacco budworm
		<i>CryIB</i>	<i>thuringiensis</i>	L	Cabbage worm
		<i>CryIB(c)</i>	<i>morrisoni</i>	L	Several Lepidoptera
		<i>CryIC</i>	<i>entomocidus</i>	D	Cotton leaf worm, Mosquito
		<i>CryIC(b)</i>	<i>galleriae</i>	L	Beet army worm
		<i>CryID</i>	<i>aizawai</i>	L	Beet army worm, Tobacco horn worm
		<i>CryIE</i>	<i>kenyae</i>	L	Cotton leaf worm
		<i>CryIE(b)</i>	<i>aizawai</i>	L	Several Lepidoptera
		<i>CryIF</i>	<i>aizawai</i>	L	European corn borer, Beet army worm
		<i>CryIG</i>	<i>galleriae</i>	L	Greater wax moth
<i>cryII</i>	<i>cry1,cry2</i>	<i>CryIIA</i>	<i>kurstaki</i>	L&D	Gypsy moth, Mosquito
		<i>CryIIB</i>	<i>kurstaki</i>	L	Gypsy moth, Cabbage looper, Tobacco horn worm
		<i>CryIIC</i>	<i>shanghai</i>	L	Tobacco horn worm, Gypsy moth
<i>cryIII</i>	<i>cry3,cry7,cry8,cry14,cry18,cry23</i>	<i>CryIIIA</i>	<i>san diego</i>	C	Colorado potato beetle
		<i>CryIIIA(a)</i>	<i>tenebrionis</i>	C	Colorado potato beetle
		<i>CryIIIB</i>	<i>tolworthi</i>	C	Colorado potato beetle
		<i>CryIIIC</i>	<i>N/a</i>	C	Spotted cucumber beetle
		<i>CryIIID</i>	<i>kurstaki</i>	N/a	N/a
		<i>CryIIV</i>	<i>israelensis</i>	D	Mosquito (<i>Aedes and Culex</i>)
<i>cryIV</i>	<i>cry4,cry10,cry11,cry16,cry17,cry19,cry20</i>	<i>CryIIVB</i>	<i>israelensis</i>	D	Mosquito (<i>Aedes</i>)
		<i>CryIIVC</i>	<i>N/a</i>	D	Mosquito (<i>Culex</i>)
<i>cryV</i>	<i>cry1</i>	<i>CryIIVD</i>	<i>N/a</i>	D	Mosquito (<i>Aedes and Culex</i>)
<i>cryVI</i>	<i>cry5,cry6,cry12,cry13,cry21</i>	<i>N/a</i>	<i>N/a</i>	L&C	European corn borer, Spotted cucumber beetle
<i>CryIX</i>	<i>N/a</i>	<i>N/a</i>	<i>N/a</i>	N/a	N/a
<i>cryX</i>	<i>cry1,cry2</i>	<i>N/a</i>	<i>galleriae</i>	L	Greater wax moth
<i>cryX</i>	<i>cry1,cry2</i>	<i>N/a</i>	<i>N/a</i>	N/a	N/a

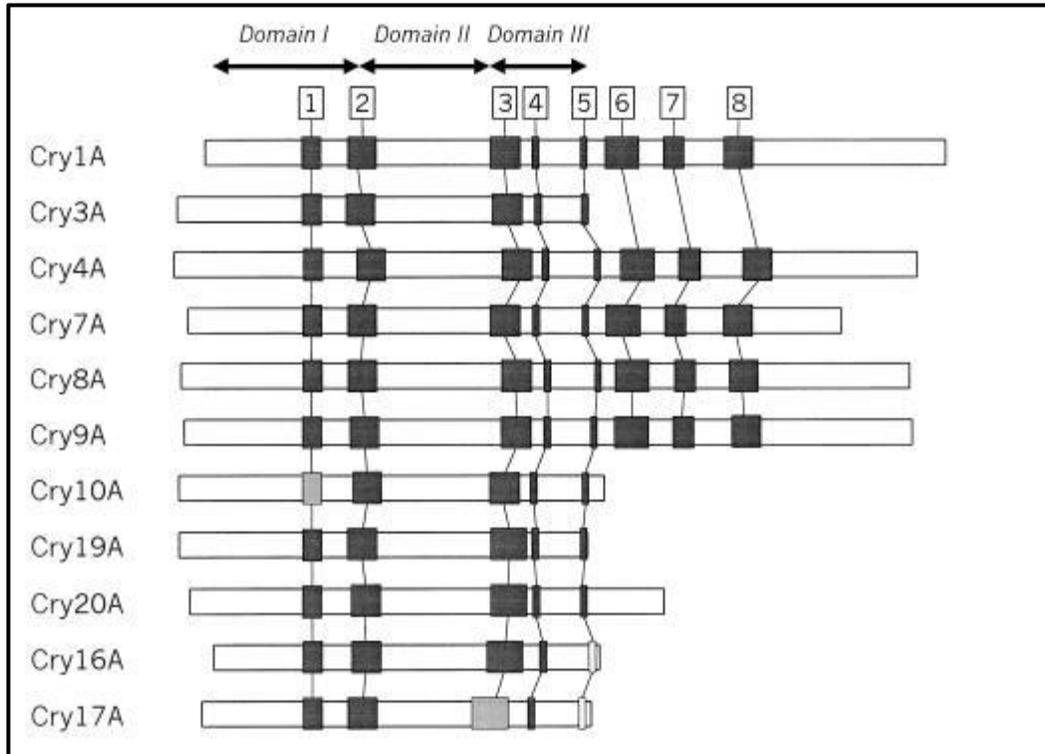


Figure 6 : Les positions des blocs conservés au niveau des protéines Cry. Le schéma représente quelques protéines Cry et les arrangements de séquences pour chaque holotype de toxine (ex: Cry1Aa1). Les séquences des blocs sont représentées en gris foncé, gris clair ou blanc faisant référence aux degrés d'homologie hauts, moyens et faibles respectivement (Adapté de Schnepf, E., et al., 1998).

Comme nous le remarquons d'après ce tableau, chaque toxine se caractérise par un spectre d'activité spécifique sur un nombre restreint d'hôtes, et toutes ces toxines agissent contre un grand nombre d'ordres d'insectes : lépidoptères (papillons, mites), coléoptères (scarabées, charançons), diptères (moustiques, mouches) ou hyménoptères (guêpes, abeilles). Cependant, uniquement une minorité de toxines présente une toxicité contre d'autres organismes comme par exemple les nématodes (Huffman, D. L., et al., 2004 et Griffiths JS., et al., 2005).

La diversité des toxines Cry est attribuée à la forte plasticité génétique des plasmides qui portent les gènes codant pour ces toxines (Schnepf, E., et al., 1998) ; mais aussi au caractère conjugatif de ces plasmides transmissibles entre différentes souches de *Bt* (Gonzalez JM., et al., 1982 et Thomas DJI., et al., 2001). Elle s'explique par la présence de nombreux transposons et éléments d'insertion flanquant les gènes. Ces éléments facilitent la multiplication des gènes *cry* et l'élaboration de nouvelles toxines (de Maagd RA, et al., 2001). Nous citons dans ce qui suit quelques exemples d'appoint. Sur le plasmide pBtoxis de *Bti*, plusieurs éléments d'insertion (IS231F, V, W et IS240A et B) sont caractérisés et permettent la transposition, la duplication, le réarrangement et la modification des gènes *cry* (Ben-Dov, E., et al., 1999 et Mahillon, J., et al., 1994). L'élément IS231W chez *Bti* est adjacent au gène *cry11Aa* (Rezsohazy, R., et al., 1993), alors que le gène *cry4A* est flanqué par les IS240 A et B (Bourgouin, C., et al., 1988). Les IS240 appartiennent à la famille des IS6. Le premier élément transposable caractérisé chez *Bt* était le Tn4430 (Agrawal, N., et al., 2002) qui se trouve au voisinage des gènes *cry1A* chez les souches actives sur les lépidoptères (Kronstad, J. W., et al., 1986).

Selon leur composition en protoxines, la forme des inclusions cristallines varie. En effet, les cristaux peuvent avoir une forme bipyramidale (Cry1), cubique ou rectangulaire (Cry2, Cry3A), irrégulière (Cry3B), sphérique (Cry4A, Cry4B) ou rhomboédrique (Cry11A) (Li, J., et al., 1998). Les molécules de Cry2A sont stabilisées au sein des inclusions rectangulaires grâce aux protéines codées par les gènes *orf2* (opéron Cry2A) et *orf3* (opéron Cry11A), qui potentialisent la synthèse de Cry2A en la stabilisant au sein des inclusions rectangulaires, et en agissant en tant que molécules chaperonnes (Ge, B., et al., 1998). L'organisation des gènes *cry* en opérons a été mise en évidence chez différentes souches de *Bt* spécifiquement pour les gènes *cry1F*, *cry2Aa*, *cry2Ac*, *cry9Ca* et *cry11Aa*. Certains opérons contiennent au moins un cadre de lecture en amont du gène *cry* tel qu'*orf1* ou *p19* et un deuxième cadre de lecture, *orf2* ou *p20*, existe aussi au niveau des opérons des gènes *cry2* et *cry11*. Par conséquent, cette organisation des gènes *cry* en opérons facilite leur expression différentielle. Cela

explique que les inclusions cristallines peuvent contenir plusieurs toxines Cry ou qu'une même souche puisse produire plusieurs cristaux de compositions protéiques différentes. En se basant sur la diversité des gènes *cry* et leur organisation complexe, de nouvelles souches de *Bt* sont découvertes. En effet, la mise en évidence de nouveaux gènes associés à la toxicité, la caractérisation de leurs séquences nucléotidiques et leur appartenance à de nouvelles familles de toxines Cry permettent l'émergence de nouvelles souches de *Bt* sur le marché.

II.3.2. Structures des δ -endotoxines Cry

La cristallographie aux rayons X des protéines Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Ba, Cry4Aa et Cry8Ea1 indique que la majorité des δ -endotoxines se caractérise par une structure qui englobe trois domaines (Li, JD., et al., 1991, Grochulski, P., et al., 1995, Boonserm, P., et al., 2006, Boonserm, P., et al., 2005, Derbyshire, DJ., et al., 2001, Galitsky, N., et al., 2001, Guo, S., et al., 2009 et Morse, RJ et al., 2001). Chacun de ces domaines joue un rôle particulier dans la toxicité : le domaine II et III sont responsables de la liaison aux récepteurs localisés sur la paroi intestinale et le domaine I est responsable de la formation de pores dans la membrane cellulaire. Toutes les toxines Cry partagent une homologie de leur structure tridimensionnelle où chaque structure est impliquée spécifiquement dans le mode d'action de la toxine : les feuilletts bêta assurent la reconnaissance des sites de fixation tandis que les hélices alpha forment le pore transmembranaire déclenchant la mort cellulaire (Li, J., et al., 2001 et Boonserm, P., et al., 2005) (Figure 7).

II.3.2.1. Domaine I

Le domaine I est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine Cry et présente des similitudes importantes avec d'autres toxines formant des pores (Morse, RJ, et al., 2001). Ce domaine se compose de huit hélices α reliées par des boucles. Sept hélices (α 1, α 2a, α 2b, α 3, α 4, α 6 et α 7) sont situées autour de

l'hélice $\alpha 5$ centrale hautement conservée et amphipathique (Figure 8). Les hélices amphipathiques périphériques sont riches en résidus polaires ou chargés et ces groupes polaires sont situés entre les hélices et sont impliqués dans la formation des liaisons par pont d'hydrogène ou des ponts salins. La plupart des hélices, de plus de 30 Å de long, sont capables de s'insérer dans la membrane hydrophobe. Ainsi, le domaine I a comme fonction primaire la formation de pores dans la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'hélices hydrophobes (Schnepf, E., et al., 1998).

Quant aux protéines à activité diptéricide de *Bti*, le domaine I de Cry4Aa (résidus Glu-69 à Lys-317) comprend sept hélices α comme les protéines Cry1Aa et Cry3Aa (Grochulski, P., et al., 1995 et Galitsky, N., et al., 2001). Toutefois, la structure des hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ de Cry4Aa est unique du fait de la présence d'un pont disulfure et d'un motif riche en proline qui permettent de rigidifier l'épingle à cheveux et de limiter la flexibilité de la boucle entre les hélices (Boonserm, P., et al., 2006). Par conséquent, par opposition à Cry4Ba, Cry4Aa par ses caractéristiques de structure ne permet pas la libération de calcéine (marqueur de viabilité cellulaire) (Boonserm, P., et al., 2006) qui suggère une différence de comportement des canaux et par la suite, une différence dans le mode d'action entre Cry4Aa et Cry4Ba. En effet, le domaine I de Cry4Ba (résidus Ile-40 à Arg-271) ne contient pas sept hélices α mais uniquement cinq (Boonserm, P., et al., 2005). Les deux hélices 1 et 2 sont absentes malgré le fait que leurs séquences d'ADN soient présentes au niveau du gène *cry4Ba*, ce qui signifie qu'elles ont été enlevées par protéolyse au cours du processus de cristallisation. Toutefois, Cry4Ba conserve toujours son activité diptéricide.

Le domaine I, composé d'hélices α dont le nombre varie entre Cry4Aa et Cry4Ba, participe dans la toxicité par la formation de pore membranaires à la suite de l'insertion dans la membrane des épingles à cheveux transmembranaires $\alpha 4$ et $\alpha 5$ (Boonserm, P., et al., 2005, 2006 et Pornwiroon, W., et al., 2004). Des mutations ponctuelles dans différentes parties du domaine I affectent également la toxicité. A titre d'exemple, au niveau de Cry4B, la

substitution des résidus Trp243, Phe246, Phe264 et Tyr249 de l'hélice $\alpha 7$ par l'alanine a abouti à une diminution spectaculaire de la toxicité contre *Stegomyia aegypti* (Tiewsir, K., et al., 2007). De plus, au niveau de la protéine Cry2A, la suppression de 42 résidus d'acides aminés en amont de l'hélice $\alpha 1$, suivie par la substitution des résidus Lys63 en proline et Lys63 en alanine, conduit à une amélioration de la toxicité de la protéine. En 2007, Mandal et al. suggère que ce clivage des 42 résidus expose la région qui se lie au récepteur (Mandal, CC., et al., 2007).

II.3.2.2. Domaine II

Le domaine II comprend trois feuillets β antiparallèles (jointés en clé grecque) emballés autour d'un noyau hydrophobe formant une structure en « β -prisme ». Les boucles de raccordement des feuillets β sont exposées à la partie supérieure de ce domaine et représentent les régions les moins conservées qui jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et la liaison au récepteur et donc dans sa spécificité (Figure 8). La taille des boucles varie entre les différentes toxines: Cry1A, Cry2A, Cry3A, Cry4A et Cry5A et possèdent les plus grandes boucles documentées alors que Cry3Aa possède la plus courte (Xin-Min, Z., et al., 2009). La taille des boucles contribue à la mise en place de la conformation du domaine II et affecte l'interaction de la toxine avec les récepteurs spécifiques. Chez *Bti*, une différence clé existe dans le domaine II des toxines Cry. Cette différence se situe plus particulièrement au niveau des boucles liant les feuillets β (Boonserm, P., et al., 2005, 2006). Ce domaine est le plus polymorphe entre les toxines Cry et ces boucles sont impliquées dans les liaisons spécifiques aux récepteurs. Cry4Aa (résidus Tyr318 à Val527) et Cry4Ba (résidus Tyr272 à Val469) diffèrent significativement en taille spécialement au niveau de la taille de la boucle 2. En plus de cette différence de taille, en 2003, Abdullah et al. démontrent que la séquence des boucles du domaine II de ces deux protéines et l'échange avec les boucles 3 conduisent à une augmentation de la toxicité de

Cry4Ba sur *Culex* alors que sa toxicité reste inchangée sur *Aedes* et *Anopheles* (Abdullah, M. A., et al., 2003). Cela indique que principalement la boucle 3 est impliquée dans la spécificité de liaison aux récepteurs chez *Culex* tandis que les boucles 1 et 2 sont responsables de cette spécificité de liaison chez *Aedes* et *Anopheles* (Abdullah, M. A., et al., 2003). Ces données indiquent également que les protéines Cry4Aa et Cry4Ba, étroitement liées, présentent des spécificités et des structures différentes et elles agissent en synergie au sein de l'inclusion parasporale de *Bti* dans le but d'augmenter le spectre d'activité.

II.3.2.3. Domaine III

Le domaine III est une structure en β -sandwich composée de deux feuillets β antiparallèles torsadés et empilés formant une configuration en « jelly roll » (Figure 8). Chaque feuillet β est composé de cinq brins, avec une couche extérieure qui fait face au solvant et une couche intérieure emballée contre le domaine II. Il existe également deux boucles qui permettent l'interaction entre le domaine III et le domaine I (Grochulski, P., et al., 1995). Ces boucles représentent les variabilités structurales du domaine III principalement prouvées selon leur longueur, leur séquence et leur orientation (Boonserm, P., et al., 2006). Chez Cry4Aa ce domaine s'étale des résidus Asp528 à Thr678 et chez Cry4Ba de Asp470 à Thr634. Ce domaine peut jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale des toxines (Li, J. D., et al., 1991 et Nishimoto, T., et al., 1994), dans la régulation de la formation de pore par effet de conductance (Wolfersberger, M. G., et al., 1996) et peut contribuer dans la liaison spécifique réversible aux récepteurs (Aronson, A. I., et al., 1995; Dean, D. H., et al., 1996 ; Flores, H., et al., 1997 et Boonserm, P., et al., 2005, 2006). Des mutations dans ce domaine ont été décrites et leur conséquences sur la toxicité ont été relevées. La majorité des mutations concernent des substitutions du domaine III d'une toxine par le domaine III d'une autre toxine (Lucena, W. A., et al., 2014). A titre d'exemple, l'échange du domaine III de Cry1Ia avec celui de Cry1Ba résulte en une toxine qui est trois fois plus active sur le coléoptère *Leptinotarsa decemlineata* (Naimov, S., et al., 2001). Les mutations peuvent

aussi concerner des substitutions d'acides aminés de ce domaine. Tel est le cas de la mutation T524N du domaine III de Cry1Ac qui conduit à une toxine ayant une toxicité améliorée contre les larves de *Spodoptera exigua* (Shan, S., et al., 2011). De plus, la substitution de Ser503 et Ser504 par l'alanine chez Cry1Ac diminue l'affinité de la toxine aux récepteurs et par la suite sa toxicité (Aronson, A. I., et al., 1995).

Ces trois domaines sont bien maintenues ensembles grâce aux liaisons de van der Waals, aux ponts d'hydrogènes, aux ponts salins et aux interactions électrostatiques, où le plus grand nombre d'interactions à lieu entre les domaines I et II (Li, J. D., et al., 1991 ; Grochulski, P., et al., 1995 et Boonserm, P., et al., 2006).

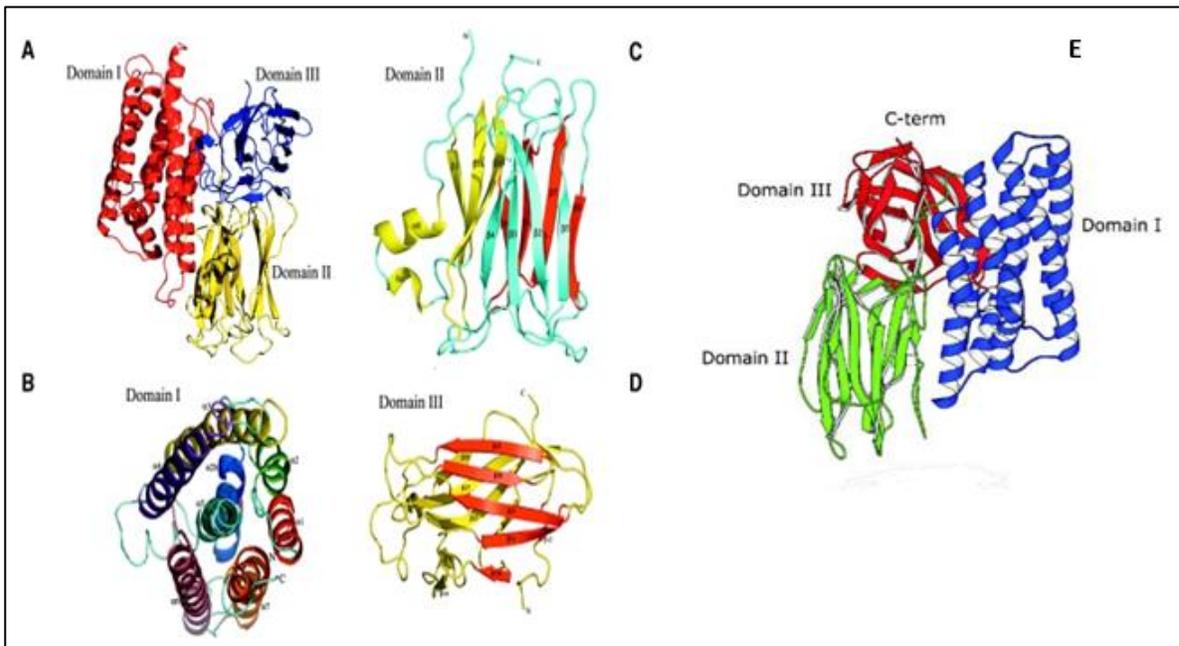
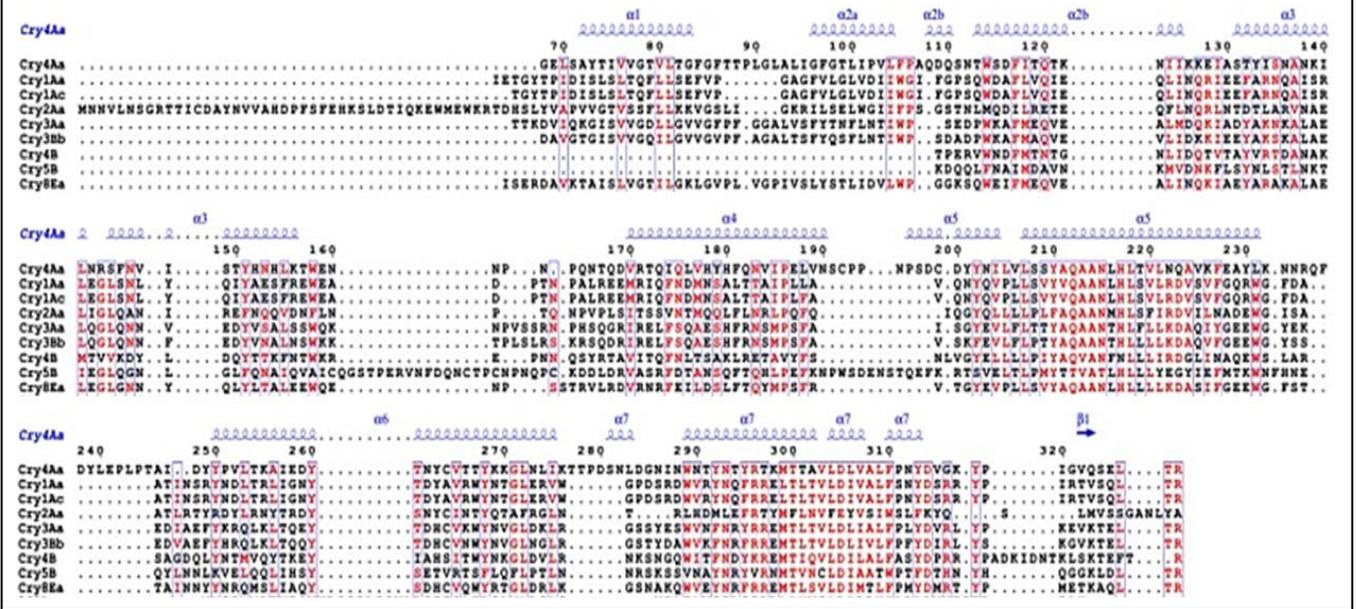


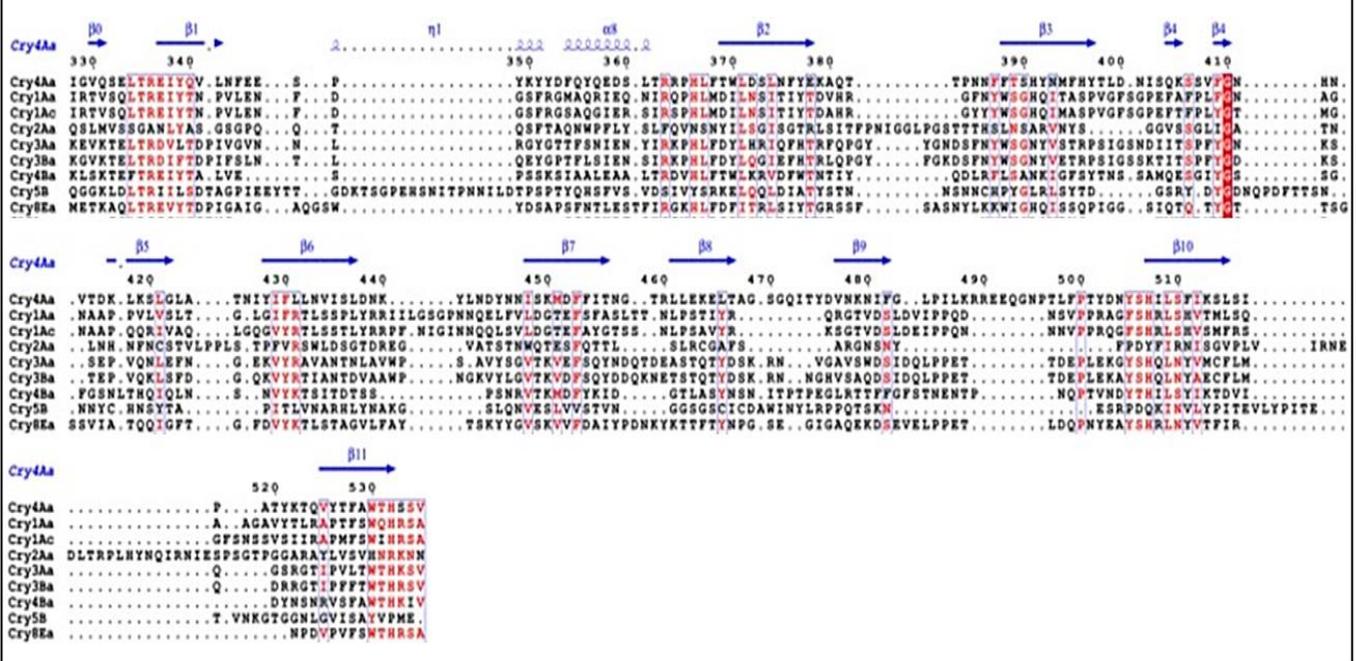
Figure 7 : Représentation en ruban du repliement des protéines Cry4Aa et Cry4Ba de *Bti*. (A) Vue d'ensemble de la toxine Cry4Aa, qui est composée de trois domaines : le domaine I de formation de pores est en rouge, le domaine II est celui de la fixation au récepteur putatif et représenté en jaune, et le domaine III C-terminale en bleu. Les

éléments de structure secondaire de chacun des trois domaines sont marqués dans les panneaux B à D. Chaque feuillet β individuel est d'une couleur différente. (E) La structure tridimensionnelle des domaines I, II et III de Cry4Ba : le domaine I (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine II (feuilletts bêta) en vert et le domaine III (feuilletts bêta) en rouge (Boonserm P, et al., 2006 et Angsuthanasombat, C., et al., 2004).

Domaine I



Domaine II



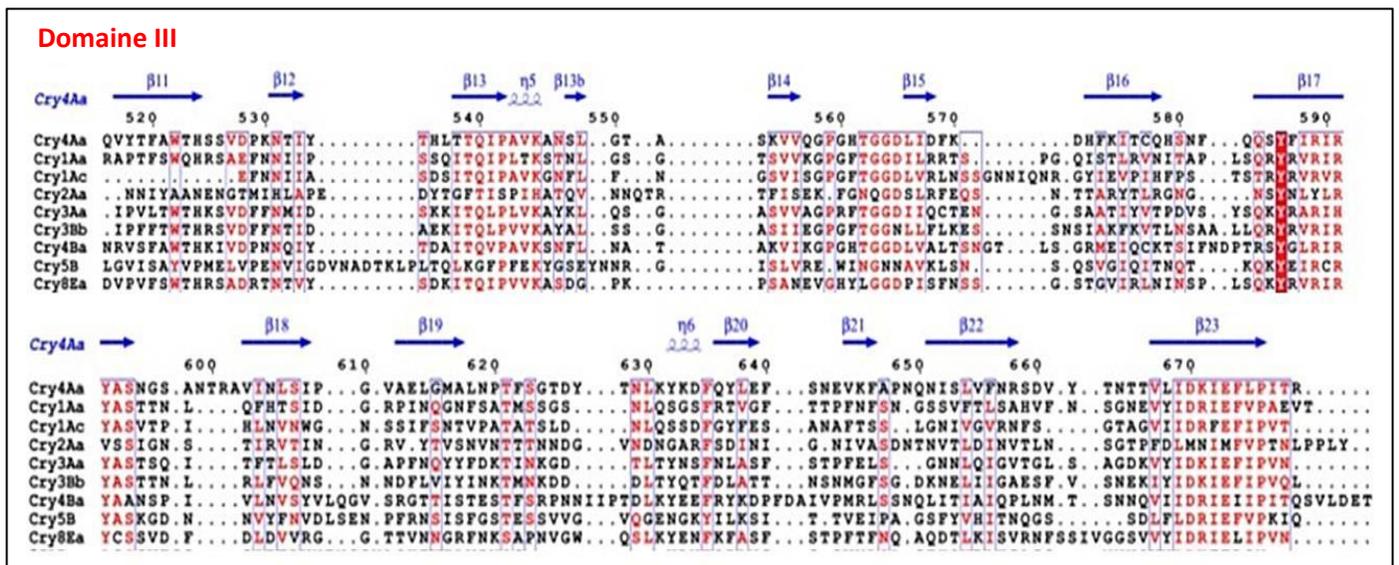


Figure 8 : Alignement des domaines I, II et III des protéines Cry (Cry4Aa, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4B, Cry5B et Cry8Ea) et comparaison de leur structure. Les dispositions des structures secondaires : hélices α , hélices 3_{10} η (Barlow, D. J., et al., 1988) et brins β de Cry4Aa sont représentées au début de chaque alignement. La figure a été préparée par ESPript (Adapté de Xu, C., et al., 2014).

III.3.3. Structure des protéines Cyt

La structure des protéines Cyt diffère entièrement de celle en trois domaines des protéines Cry décrite précédemment (Li, J., et al., 1996). Uniquement la structure tridimensionnelle de Cyt2Aa de *B. thuringiensis subsp. kyushuensis* a été étudiée. Par alignement de séquences entre Cyt1Aa et Cyt2Aa et grâce à l'existence de 70 % de similitudes entre les séquences de leur acides aminés, la structure de Cyt1Aa, protéine cytolytique majeur de *Bti*, a été prédite (Gazit, E., et al., 1997). En effet, les protéines Cyt ont un seul domaine α - β et sont organisées en feuillet β formé de 8 brins β (1 à 7) antiparallèles flanqués de chaque côté par deux courtes hélices α : d'un côté, αA et αB et de l'autre côté αC et αD (Li, J., et al., 1996 ; Cohen, S., et al., 2011 ; Cohen, S., et

al., 2008 et Xu, C., et al., 2014) (Figure 9). Par opposition aux protéines Cry de *Bti*, le domaine transmembranaire des protéines Cyt est formé de brins β et non d'hélices α qui sont connues pour être impliquées dans les liaisons entre les protéines et l'oligomérisation (Du, J., et al. 1999; Li, J., et al., 1996 et Gazit, E., et al., 1997). D'après la structure tridimensionnelle de la protéine Cyt1Aa, nous pouvons suggérer que la toxicité des protéines Cyt1Aa est en corrélation avec leur capacité à subir des changements de conformation qui sont nécessaires avant leur insertion dans la membrane et l'induction de sa perforation. Ce repliement permet aux hélices α de s'écarter à une distance permettant l'insertion du feuillet β dans la membrane. De plus, l'alignement des séquences en acides aminés de six protéines Cyt de différentes sous-espèces de *B. thuringiensis* a permis l'identification de quatre entités conservées (Butko, P. 2003) (Figure 9) :

- L'hélice A (séquence consensus YILQAIQLANAFQGALDP),
- La boucle après l'hélice D du brin 4 (TFTNLNTQKDEAWIFW),
- Les brins 5 et 6 (TNYYYNVLF AIQNEDTGGVMACVPIGFE),
- Le brin 6a et la boucle suivante (LFFTIKDSARY)

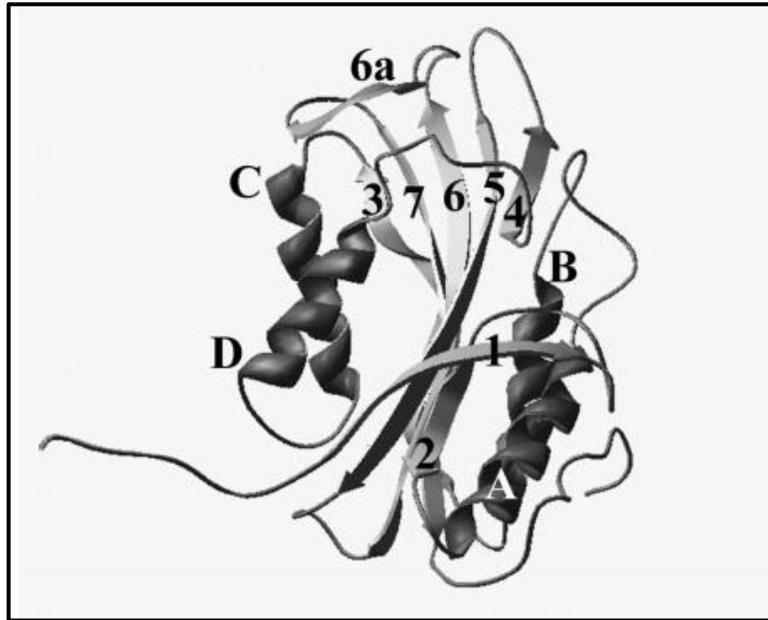


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1A : les hélices α sont marquées en lettres et les feuillets β en chiffres (Butko, P. 2003).

Ces différences claires au niveau structural et fonctionnel des domaines des protéines Cry et Cyt de *Bti* sont à être prises en compte lors de l'étude du mode d'action de ces protéines chez les diptères et dans le phénomène de résistance à *Bti*.

III.4. Régulation de l'expression des gènes *cry* codant pour les delta-endotoxines

La majorité des gènes *cry* et *cyt* sont exprimés au cours de la phase stationnaire. Leurs produits s'accumulent dans la cellule, entre le stade III et le stade VII de la sporulation, pour former les inclusions cristallines qui font 20 à 30 % de la masse de la matière sèche d'une population sporulante (Ibrahim, M. A., et al., 2010). Cependant, il existe des gènes *cry* qui sont transcrits lors de la phase végétative, de là vient la nécessité de distinguer entre les gènes exprimés

lors de la phase végétative et ceux exprimés lors de la phase de sporulation. La production des inclusions cristalline est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels, post-traductionnels ou autres.

III.4.1. Régulation transcriptionnelle

La régulation primaire de l'expression des gènes *cry* se fait au niveau transcriptionnel. Les gènes *cry* ont été classés en deux types selon leur mécanisme de régulation transcriptionnelle: les gènes *cry* dépendant de la sporulation sont contrôlés par des facteurs sigma spécifiques : σ_H , σ_F , σ_E , σ_G et σ_K ; et les gènes indépendants de la sporulation sont sous le contrôle du facteur σ_A . Les facteurs σ_A et σ_H sont actives dans la cellule en pré-division, les facteurs σ_E et σ_K sont actives dans la cellule mère et les facteurs σ_F et σ_G sont actives dans la pré-spore (Agaisse, H., et al., 1995). Les facteurs spécifiques à la phase de sporulation, nommés « sigma-factors », se fixent à l'ARN polymérase et dirigent la transcription depuis des promoteurs spécifiques (Moran, CP et al., 1993). En effet, la transcription de plusieurs gènes, comme les gènes *cry1* (Yang, H., et al., 2012 et Bravo, A., et al., 1996), *cry4* (Yoshisue, H. I., et al., 1995 ; Dervyn, E., et al., 1995 et Poncet, S., et al., 1997), *cry8* (Du, L., et al., 2012), *cry11* (Poncet, S., et al., 1997) et *cry18* (Zhang, J., et al., 1998), est contrôlée par les deux facteurs σ_E et σ_K . La transcription est initiée par σ_E au début de la sporulation et poursuit avec σ_K vers la fin de cette phase (Lereclus, D. A., et al., 2000). Cette activation successive de ces deux facteurs sigma assure la continuité de cette forte transcription des gènes *cry* dans les cellules mères. Cela permet la production en grande quantité des protéines Cry durant la sporulation. L'expression des gènes *cry4* et *cry11* dépendant de la sporulation (Poncet, S., et al., 1997) est initiée par le facteur sigma végétatif σ_H . Les promoteurs de ces gènes dépendants de σ_H chevauchent avec les promoteurs dépendant de σ_E (Poncet, S., et al., 1997 ; Yoshisue, H. I., et al., 1995 et Deng, C., et al., 2014). De plus, certains gènes comme *cry1Aa* sont régulés par deux promoteurs chevauchant (Btl et BtlI) (Wong, H. C., et al., 1983). La transcription est initiée par σ_E entre les étapes II et VI de la sporulation suite à la liaison en

aval au promoteur Btl. Du stade VI jusqu'à la fin de la sporulation, la transcription de *cry1Aa* est facilitée par σK qui utilise le promoteur en amont, BtII.

La régulation temporelle et spatiale des gènes pendant le processus de sporulation chez *Bt* est fondamentalement le même que chez *B. subtilis* (*Bs*). La protéine Spo0A liant l'ADN est le principal régulateur responsable du déclenchement de la sporulation chez *B. subtilis* (Deng, C., et al., 2014) et les protéines Spo0A de *Bt* et *Bs* sont homologues (Lereclus, D., et al., 2000). La forme phosphorylée de Spo0A (Spo0A ~ P) se lie à une séquence d'ADN connue sous le nom de « OA-box » et agit comme un répresseur des gènes exprimés durant la phase végétative et comme un activateur de gènes spécifiques de sporulation. Une étude *in silico* révèle que les « OA-box » sont des séquences d'ADN situées en amont de certains gènes *cry* chez Bti (*cry4A*, *cry4B* et *cry11A*) (Poncet, S., et al., 1997). Le niveau de transcription du promoteur de *cry11A* a été amélioré dans un mutant Spo0A. De même, la suppression de « OA-box » putative augmente significativement l'expression de l'opéron *cry11A*. Ces résultats suggèrent que l'expression de *cry11A* est réprimée par Spo0A via sa liaison à la « OA-box » putative (Poncet, S., et al., 1997). Au contraire, le promoteur de *cry1Ac* a une activité légèrement réduite dans un mutant de Spo0A ce qui implique que ce gène *cry* est positivement régulé par Spo0A durant la croissance (Yang, H., et al., 2012). Ceux-ci prouvent que Spo0A joue différents rôles de régulation pour différents gènes *cry*, y compris: (i) un rôle modérateur permettant de réguler l'expression des gènes *cry* avant le début de la sporulation; et (ii) un rôle majeur impliquant le déclenchement de l'activité des « sigma-factors » spécifiques à la sporulation cités préalablement.

Certains gènes *cry*, semblent être exprimés indépendamment de la sporulation. En effet, un mécanisme de régulation supplémentaire de l'expression de certains gènes *cry* au niveau transcriptionnel repose sur une protéine régulatrice qui se lie à une région inversée répétée de 200 à 300 paires de bases en amont de différents promoteurs des gènes *cry1*. Cette protéine régulatrice a été reconnue comme étant la sous-unité E2 de la pyruvate déshydrogénase. Il a été démontré que l'implication de la sous-unité E2 de la

pyruvate déshydrogénase dans la régulation du gène *cry* élucide une association entre l'activité catabolique et la synthèse des toxines Cry (Walter, T., et al., 1999).

III.4.2. Régulation post-transcriptionnelle

La régulation de l'expression des gènes *cry* au niveau post-transcriptionnel peut compter sur la stabilité de l'ARNm. En effet, la demi-vie de l'ARNm des gènes *cry* est d'environ dix minutes, ce qui est au moins cinq fois plus élevée que la demi-vie d'un ARNm bactérien courant (Glatron, M. F., et al., 1972). La présence de terminateurs de transcription putatifs, agissant comme rétrorégulateurs positifs à l'extrémité 3' de nombreux gènes *cry*, pourrait contribuer à la stabilité de l'ARNm (Wong, H.C., et al., 1986). De plus, la présence de séquences inversées répétées au niveau de la région non traduite en 3' des gènes permet la stabilisation de l'ARNm en formant des structures en boucles. Ceci permettra d'empêcher les attaques de l'ARNm par les 3'-5' exoribonucléases (Agaisse, H., et al., 1995). Davantage, la stabilisation de l'extrémité 5' de l'ARNm du gène *cry3A* a été démontrée suite à la fixation de la sous unité ribosomique 30S à la séquence STAB-SD (séquence Shine-Dalgarno (SD)-like proche de l'extrémité 5' au niveau de la position -129). Ceci empêche l'attaque par la 5'-3' RNase J1 exoribonucléolytique (Mathy, N., et al., 2007 et Deng, C., et al., 2014).

III.4.3. Régulation post-traductionnelle

Les inclusions cristallines formées sont stables dans la cellule. Le mécanisme de régulation post-traductionnelle est essentiel pour garantir la bonne formation du cristal en protégeant les toxines d'une dégradation protéolytique prématurée. La présence d'une région riche en cystéine au niveau de l'extrémité C-terminale des protoxines assure la stabilité de la structure des cristaux due à la formation des ponts disulfures (Bietlot, H. P., et al., 1990). Il est

connu que les ponts salins intramoléculaires et les interactions hydrophobes stabilisent la structure même en l'absence de cystéine. Tel est le cas de la protoxine Cry3A (Li, J. D., et al., 1991). Certains cristaux parasporaux nécessitent des protéines accessoires pour optimiser leur synthèse et leur cristallisation : à titre d'exemple, la protéine de 20 kDa codée par orf3 de l'opéron *cry11Aa* de *Bti* (Berry, C., et al., 2002 et Ibrahim, M.A., et al., 2010).

III.4.4. Répression catabolique par le glucose

Chez les bactéries Gram positifs, la répression catabolique de nombreux opérons fait intervenir la protéine « phosphocarrier HPr » qui, une fois phosphorylée, lie la protéine de contrôle catabolique CcpA formant ainsi un complexe ayant une forte affinité de liaison à l'ADN. Le complexe phosphorylé HPr-CcpA module la transcription des gènes en se fixant à leur séquence *cre* (Hueck, C. J., et al., 1995). Il a été démontré que l'expression de *cry4A* dans *Bti* est réprimée par le glucose au niveau de l'ARN messager (Banerjee-Bhatnagar, N., et al., 1998). En particulier, le complexe HPr-CcpA réprime cette expression en se fixant à la séquence *cre* de 15 pb chevauchant avec le promoteur de *cry4A* à la position -35. Une mutation qui survint à la position -49 dans ce promoteur, une guanine remplacée par une adénine, abolit la répression catabolique du glucose sur *cry4A* et renforce l'activité du promoteur de deux à trois fois. De même, l'activité du promoteur de *cry4A* a été prouvée augmentée dans un mutant HPr phosphorylé désactivé. Par conséquent, dans *Bti*, la synthèse des protéines Cry est commandée par HPr-CcpA qui sert comme intermédiaire provoquant la répression catabolique du glucose (Deng, C., et al., 2014).

III.4.5. Régulation métabolique par la polyphosphate kinase (PPK)

Certains nutriments minéraux, particulièrement le phosphate inorganique, sont très importants pour la production des protéines Cry chez *Bt* (Banerjee-Bhatnagar, N., et al., 1999 et Özkan, M., et al., 2003). Le polyphosphate est synthétisé par la polyphosphate kinase (PPK) à partir du phosphate terminal de

l'ATP (Ahn, K., et al., 1990) et peut être dégradé en phosphate inorganique par les enzymes endopolyphosphatase et exopolyphosphatase (Akiyama, M., et al., 1993). En 2013, Doruk et al. démontrent que la sur expression de PPK dans *Bti* mène à l'augmentation simultanée de la concentration intracellulaire en polyphosphate et de la production des protéines Cry (Doruk, T., et al., 2013). Ces auteurs ont également prouvé que la transcription du facteur sigE est stimulée dans des souches qui surexpriment PPK (Doruk, T., et al., 2013). Par conséquent, des modifications du métabolisme du polyphosphate pourront influencer la production des protéines Cry de *Bt*, probablement par l'intermédiaire de σE .

III.4.6. Régulation par le facteur sigma 54

Nommé aussi σL , le facteur sigma 54 contrôle les gènes impliqués dans la biosynthèse des enzymes intervenant dans l'assimilation de l'ammoniac, la biosynthèse du flagelle et du pili et dans des métabolismes chez les bactéries. Récemment, Peng et al. ont démontré qu'une mutation au niveau du facteur sigma 54 chez la souche de *Bt* HD73 conduit à une diminution de la production de la protéine Cry1Ac sur son milieu de culture (Peng et al., résultats non encore publiés). Les effets positifs du facteur sigma 54, sur la production des delta endotoxines, se situent au niveau transcriptionnel et peuvent faire intervenir de façon indirecte les voies de signalisation métaboliques dépendantes du facteur sigma 54. A titre d'exemple, la formation de spores et du cristal parasporal de *B. thuringiensis* corrèle avec la présence de l'acide γ -aminobutyric (GABA) qui est contrôlé par sigma 54 et régulé par GabR (Aronson, J. N., et al., 1975 et Zhu, L., et al., 2010). Cependant, sigma 54 n'affecte pas la transcription de Cry1Ac et sa production sur un milieu favorisant la sporulation. Cela indique que les voies de régulation, qui affectent la production des protéines Cry, dépendent des conditions de la croissance des souches de *Bt*.

III.4.7. Régulation par deux facteurs négatifs

En 2008, Yu et al. étudient cette régulation en analysant le gène *cry6Aa2* avec son orf2 en aval, qui sont co-transcrits (provenant de la souche *Bt* YBT-1518) et la séquence inversée répétée qui se trouve entre les deux cadres de lecture ouverts orfs. La séquence inversée répétée perturbe l'expression de orf2 (Yu, Z. B., et al., 2008), probablement par régulation négative de la transcription de orf2. La sur-expression de orf2 réduit l'expression de *cry6Aa2*, néanmoins, la suppression de orf2 améliore véritablement l'expression de *cry6Aa2*. Par conséquent, cela démontre que l'expression du gène orf2 régule négativement l'expression du gène *cry6Aa2*.

IV. Les principaux gènes *cry* codant pour des δ -endotoxines actives sur les diptères

IV.1. *Bacillus thuringiensis serotype israelensis (Bti)* et son contenu génique

Bti est la souche de référence qui est couramment utilisée comme bio pesticide dans la lutte contre les diptères. Au fil des années, la toxicité de *Bti* a été étudiée contre plusieurs organismes et il a été considéré comme remarquablement sans danger pour l'environnement, car il est non toxique envers les organismes non ciblés. Toutefois il est hautement toxique contre différents insectes vecteurs de maladies humaines, notamment *Aedes*, *Culex* et *Anophèles* (Margalith, Y., et al., 2000). *Bti* est caractérisé par huit plasmides circulaires de taille allant de 5 à 210 kb (3.3 à 135 MDa) et un réplicon linéaire d'environ 16 kb (Carlton, B. C., et al., 1985). L'information génétique responsable de l'activité insecticide contre les moustiques a été largement liée au plus grand plasmide pBtoxis de taille 128 kb (Carlton, B. C., et al., 1985 ; Sekar, V., et al.,

1985 et Berry, C., et al., 2002 ; GenBank: AL731825.1). Ce plasmide porte les gènes codant les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa et Cyt2Ba (Berry, C., et al., 2002 et Ben-Dov, E. 2014).

Dans le tableau suivant (Tableau 3), nous présentons les différents variants des gènes *cry* et *cyt* de *Bti* enregistrées dans la base de données de Neil Crickmore, leur région codante, leur position sur le plasmide pBtoxis, les protéines qu'ils codent, la taille de leurs toxines activées ainsi que le spectre de toxicité *in vivo* de leurs toxines.

Tableau 3 : Les variants des gènes *cry* et *cyt* de *Bti*, leur région codante, leur position sur le plasmide pBtoxis, les protéines qu'ils codent, la taille de leurs toxines activées ainsi que le spectre de toxicité *in vivo* de leurs toxines et leur spectre de toxicité (*Ae*: *Aedes*, *Cx*: *Culex*, *An*: *Anopheles*).

Noms des gènes révisés	Gène d'origine	Auteurs et Année	Souche d'origine	Numéro d'accès	Région codante (en paire de base)	Position sur le plasmide pBtoxis	Protéines Codées (kDa)	Toxines Activées (kDa)	Ordre de toxicité
<i>cry4Aa1</i>	<i>cryIVA</i>	Ward and Ellar, 1987	<i>Bt israelensis</i>	Y00423	1-3540	14 kb-SacI	Cry4Aa (134 kDa)	20 et 45	Cx > An ≥ Ae
<i>cry4Aa2</i>	<i>cryIVA</i>	Sen et al., 1988	<i>Bt israelensis HD522</i>	D00248	393-3935				
<i>cry4Aa3</i>	<i>cryIVA</i>	Berry et al., 2002	<i>Bt israelensis</i>	AL731825	1-3540				
<i>cry4A4</i>	<i>cryIVA</i>	Li et al., 2012	<i>Bti BRC-LLP29</i>	JQ228565	1-3543				
<i>cry4A-like</i>	<i>cryIVA</i>	Mahalakshmi et al., 2005	<i>Bt LDC-9</i>	DQ078744	434 pb de long				
<i>cry4Ba1</i>	<i>cryIVB</i>	Chungjatpormchai et al., 1988	<i>Bt israelensis 4Q2-72</i>	X07423	157-3564	9.9 kb-SacI ou 9.6 kb-EcoRI	Cry4Ba (128 kDa)	18 et 45	An ≥ Ae > Cx
<i>cry4Ba2</i>	<i>cryIVB</i>	Tungpradubkul et al., 1988	<i>Bt israelensis</i>	X07082	151-3558				
<i>cry4Ba3</i>	<i>cryIVB</i>	Yamamoto et al., 1988	<i>Bt israelensis</i>	M20242	526-3930				
<i>cry4Ba4</i>	<i>cryIVB</i>	Sen et al., 1988	<i>Bt israelensis HD522</i>	D00247	461-3865				
<i>cry4Ba5</i>	<i>cryIVB</i>	Berry et al., 2002	<i>Bt israelensis</i>	AL731825	1-3410				
<i>cry4B-like</i>	<i>cryIVB</i>	Mahalakshmi et al., 2005	<i>Bt LDC-9</i>	DQ078743	264 pb de long				
<i>cry10Aa1</i>	<i>cryIVC</i>	Thorne et al., 1986	<i>Bt israelensis</i>	M12662	941-2965	?	Cry10Aa (78 kDa)	58-68	Ae > Cx
<i>cry10A2</i>	<i>cryIVC</i>	Aran and Toomasu, 1996	<i>Bt israelensis ONR-60A</i>	E00614	926-2971				
<i>cry10A3</i>	<i>cryIVC</i>	Berry et al., 2002	<i>Bt israelensis</i>	AL731825	1-2039				
<i>cry10A4</i>	<i>cryIVC</i>	Li et al., 2012	<i>Bti BRC-LLP29</i>	JQ228566	1-2028				
<i>cry10A-like</i>	<i>cryIVC</i>	Mahalakshmi et al., 2006	<i>Bt LDC-9</i>	DQ167578	328 pb de long				
<i>cry11Aa1</i>	<i>cryIVD</i>	Donovan et al., 1988	<i>Bt israelensis</i>	M31737	41-1969	Entre P19 et P20	Cry11Aa (72 kDa)	30-33 et 34-38	Ae ≥ Cx > An
<i>cry11Aa2</i>	<i>cryIVD</i>	Adams et al., 1989	<i>Bt israelensis</i>	M22860	<1-235*				
<i>cry11Aa3</i>	<i>cryIVD</i>	Berry et al., 2002	<i>Bt israelensis</i>	AL731825	1-1931				
<i>cry11Aa4</i>	<i>cryIVD</i>	Li et al., 2012	<i>Bti BRC-LLP29</i>	JQ228566	1-1929				
<i>cry11A-like</i>	<i>cryIVD</i>	Mahalakshmi et al., 2007	<i>Bt LDC-9</i>	DQ166531	302 pb de long				
<i>cyt1Aa1</i>	<i>cytA</i>	Waalwijk et al., 1985	<i>Bt israelensis</i>	X03182	140-886	9.7 kb-Hind III	Cyt1Aa (27 kDa)	22-25	Cx ≥ Ae > An
<i>cyt1Aa2</i>	<i>cytA</i>	Ward and Ellar, 1986	<i>Bt israelensis</i>	X04338	509-1255				
<i>cyt1Aa3</i>	<i>cytA</i>	Earp and Ellar, 1987	<i>Bt morrisoni PG14</i>	Y00135	36-782				
<i>cyt1Aa4</i>	<i>cytA</i>	Gajjar et al., 1987	<i>Bt morrisoni PG14</i>	M35968	67-813				
<i>cyt1Aa5</i>	<i>cytA</i>	Berry et al., 2002	<i>Bt israelensis</i>	AL731825	1-749				
<i>cyt1Aa6</i>	<i>cytA</i>	Zhang et al., 2005	<i>Bt LLP29</i>	DQ302752	1-750				
<i>cyt1Aa7</i>	<i>cytA</i>	Qinyang Hong, 2013	<i>Bt BRC-HQY1</i>	Donnée non fournie	Donnée non fournie				
<i>cyt1Aa-like</i>	<i>cytA</i>	Mahalakshmi et al., 2007	<i>Bt LDC-9</i>	DQ200984	35-429				
<i>cyt2Ba1</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt israelensis 4Q2</i>	U52043	287-655	10.5 kb-SacI	Cyt2Ba (29 kDa)	22.5	Cx ≥ Ae > An
<i>cyt2Ba1</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt israelensis 4Q2</i>	AF020789	469 pb de long				
<i>cyt2Ba2</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt israelensis PG14</i>	AF022884	469 pb de long				
<i>cyt2Ba3</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt fuokukaensis</i>	AF022884	469 pb de long				
<i>cyt2Ba4</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt morrisoni HD12</i>	AF022885	469 pb de long				
<i>cyt2Ba5</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt morrisoni HD518</i>	AF022886	471 pb de long				
<i>cyt2Ba6</i>	<i>cytB</i>	Guerschicoff et al., 1997	<i>Bt tenebrionis</i>	AF034926	472 pb de long				
<i>cyt2Ba7</i>	<i>cytB</i>	Yu and Pang, 2000	<i>Bt T301</i>	AF215645	289-1080				
<i>cyt2Ba8</i>	<i>cytB</i>	Yu and Pang, 2001	<i>Bt T36</i>	AF215646	288-1079				
<i>cyt2Ba9</i>	<i>cytB</i>	Berry et al., 2002	<i>Bt israelensis</i>	AL731825	30321-31112				
<i>cyt2Ba10</i>	<i>cytB</i>	Sauka and Benintende, 2009	<i>Bti HD 567</i>	GQ919039	1-792				
<i>cyt2Ba11</i>	<i>cytB</i>	Sauka and Benintende, 2010	<i>Bti HD 522</i>	GQ919040	1-792				
<i>cyt2Ba12</i>	<i>cytB</i>	Sauka and Benintende, 2011	<i>Bti INTA H41-1</i>	GQ919041	1-792				
<i>cyt2Ba13</i>	<i>cytB</i>	Sauka and Benintende, 2012	<i>INTA 160-2</i>	FJ205865	741 pb de long				
<i>cyt2Ba14</i>	<i>cytB</i>	Sauka and Benintende, 2013	<i>Bti IPS82</i>	FJ205866	1-757				
<i>cyt2Ba15</i>	<i>cytB</i>	Zhang et al., 2011	<i>Bt LLP29</i>	JF283552	1-789				
<i>cyt2Ba-like</i>	<i>cytB</i>	Mahalakshmi et al., 2007	<i>Bt LDC-9</i>	DQ171939	358 pb de long				

IV.2. Mode d'action des toxines Cry and Cyt chez les diptères

Plusieurs études ont été menées afin de comprendre le mode d'action des toxines de *Bti*. En 1998, Schnepf (Schnepf, E et al., 1998) et Rajamohan (Rajamohan, F et al., 1998) décrivent un modèle où les cristaux ingérés sont solubilisés et activés dans l'intestin moyen des larves. La toxine activée peut alors se lier à des récepteurs sur les cellules épithéliales conduisant au déclenchement de la formation de pores dans ces membranes. Ce processus aboutit à la perte des propriétés physicochimiques des membranes et donc conduit à la mort de l'insecte.

Les études de base des structures et des modes d'action des delta-endotoxines de *Bti* et de leurs récepteurs sont importantes pour le développement futur de bio pesticides qui ne seront pas sujette à la résistance des insectes (Pigott, C. R., et al., 2007)

Dans le mécanisme d'intoxication des larves de diptères par *Bti*, quatre étapes principales existent :

IV.2.1. Etape 1 : L'ingestion

Les suspensions de spores et cristaux de *Bt* sont largement répandus dans divers environnements : le sol, sur les plantes à protéger des phytophages, les eaux des gîtes à moustiques... Dans le cas de *Bti*, différentes formulations existent qui sont pourvues ou non de spores afin de lutter contre les larves de diptères. Ces suspensions sont ensuite ingérées par ces larves.

IV.2.2. Etape 2 et 3 : Solubilisation et Activation

Après ingestion, le cristal est dissout dans l'intestin des larves de diptères à un pH de 12 (pH de 9.5 chez les lépidoptères). La dissolution se produit suite aux cassures des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes qui assurent la stabilité du cristal (Gill, S. S., et al., 1992). Les protoxines constituant le cristal sont inactives à l'état natif. Elles doivent alors devenir actives pour acquérir leur pouvoir insecticide. Elles sont activées par plusieurs enzymes digestives

intestinales des larves de diptères, mais aussi elles subissent l'action de certaines enzymes produites par la bactérie *Bt* (Oppert, B. 1999 et Rukmini, V., et al., 2000). Généralement, l'activation des protoxines est effectuée par l'action des protéases à sérine comme les trypsines et les chymotrypsines (Oppert, B. 1999). Les formes activées de Cry4Aa et Cry4Ba par les protéases bactériennes sont d'à peu près 70 kDa et leur activation *in vitro* et *in vivo* par les enzymes intestinales des larves conduit à l'obtention de deux fragments de 45 et 20 kDa pour Cry4Aa et de 45 et 18 kDa pour Cry4Ba (Angsuthanasombat, C., et al., 1993 ; De Barros Moreira Beltrão, H., et al., 2007 et Komano, T., et al., 1998) (Figure 10) . L'activation de Cry11Aa conduit également à l'obtention de deux fragments de 38 et 30 kDa (Dai, S.-M., et al., 1993 et Yamagiwa, M., et al., 2002 ; 2004). En effet, il a été montré que 28 résidus sont éliminés de l'extrémité N-terminale de la protoxine Cry11Aa (70 kDa) résultant en l'obtention de ces deux fragments de 34 et 32 kDa (Dai, S.-M., et al., 1993). Ces deux fragments restent associés et conservent leur toxicité (Yamagiwa, M., et al., 2004). Cette activation diffère de celle observée chez les toxines spécifiques aux lépidoptères (Bravo, A., et al., 2007) (Figure 10).

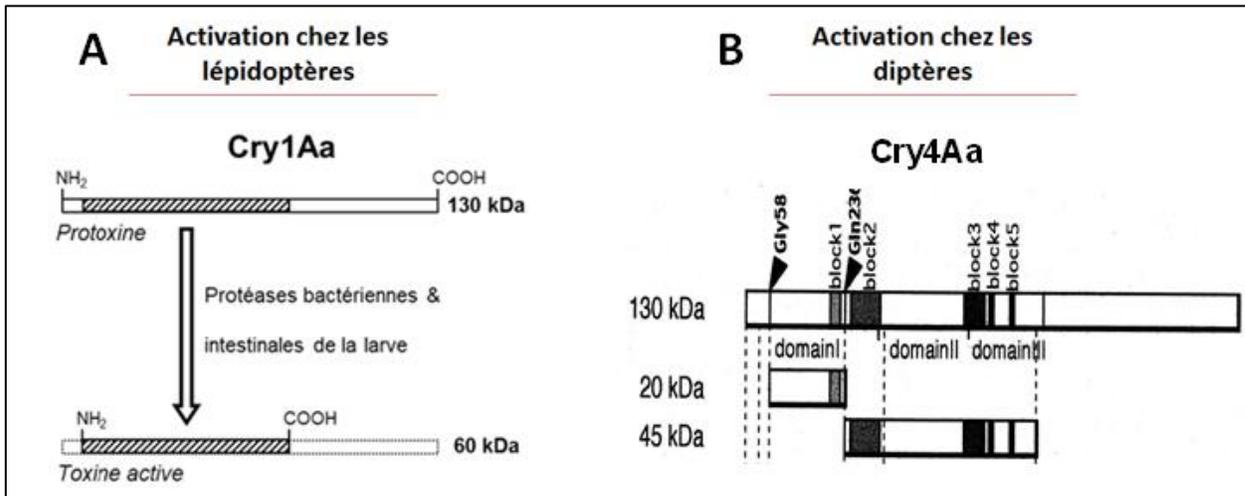


Figure 10 : Exemples d'activation des protoxines chez les lépidoptères (**A** : Cry1Aa) et les diptères (**B** : Cry4Aa). Les protoxines sont activées sous l'action combinée des protéases bactériennes et intestinales des larves d'insectes cibles. (**A**) : La toxine activée est hachurée et les régions tronquées de la protoxine sont symbolisées en pointillés. Adapté de Rukmini, V., et al., 2000. (**B**) : Les flèches indiquent les sites de clivage par le jus intestinal des larves de diptères. Les domaines putatifs et les cinq blocs sont également représentés (Adapté de Yamagiwa, M., et al., 1999).

IV.2.3. Etape 4 : Fixation au(x) récepteur(s) membranaire(s)

La fixation des toxines aux récepteurs membranaires, leur oligomérisation, leur insertion dans la membrane lipidique conduisant à la formation de pore et canaux membranaires sélectifs aux cations, seront discutés dans ce qui suit (Knowles, B. H., et al., 1994 et Aronson, A. I., et al., 2001). La létalité est due à la déstabilisation du potentiel transmembranaire, avec lyse osmotique des cellules qui tapissent l'intestin moyen des larves (Knowles, B. H., et al., 1987). La spécificité des endotoxines de *Bacillus thuringiensis* est corrélée à la présence de sites de liaison de haute affinité au niveau de la membrane de bordure en brosse des insectes cibles (Hofmann, C., et al., 1988). Des recherches préliminaires ont montré que les toxines Cry actives contre les diptères se fixent

à des récepteurs protéiques similaires à ceux trouvés chez les lépidoptères. Il existe trois principales familles de récepteurs aux toxines Cry chez les diptères :

- les cadhérines : sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et sont impliquées dans les jonctions intercellulaires (Ivanov, D. B., et al., 2001). Elles sont constituées : d'un domaine cytoplasmique, qui permet la régulation de leur fonction par les caténines ; d'un domaine transmembranaire, permettant leur insertion dans la membrane plasmique ; et de plusieurs domaines répétés (entre 9 et 12 chez les insectes) (Angst, B. D., et al., 2001). Les toxines Cry se fixent au niveau des domaines proximaux de la membrane alors que la fonction de jonction est assurée par les domaines des cadhérines éloignées de la membrane. Les cadhérines ont été identifiées pour la première fois comme récepteurs des protéines Cry1Aa chez *Manduca sexta* (Vadlamudi, R. K., et al., 1993)
- les N-aminopeptidases (APN) : sont des métalloprotéases qui clivent les acides aminés de la région N-terminale des protéines. Ce clivage leur confère un rôle important dans la digestion des aliments par la larve (Taylor, A. 1993). Chez les insectes généralement, les N-aminopeptidases (APNs) sont des enzymes membranaires ancrées grâce à un motif GPI (glycosylphosphatidylinositol). Des études ont montré que les toxines Cry présentent une plus faible affinité (environ 100 fois moins) pour les APNs que pour les cadhérines (Pigott, C. R., et al., 2007).
- les phosphatases alcalines (ALP) : comme les APNs, elles sont ancrées dans les membranes lipidiques par le GPI et se localisent principalement au niveau de radeaux lipidiques (Pigott, C. R., et al., 2007).

La spécificité de chaque toxine pour leurs insectes cibles revient à la spécificité de leurs récepteurs (Bravo, A., et al., 2011). Plusieurs récepteurs différents peuvent fixer une même toxine et plusieurs toxines peuvent partager le même récepteur (Ferré, J., et al., 1995). L'identification de récepteurs des

protéines diptéricides a été principalement réalisée chez *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles quadrimaculatus* et *Anopheles albimanus*.

La protéine Cry4Aa est codée par une séquence de 3543 pb (1180 acides aminés). Cry4Aa est très toxique contre les larves de *Culex*, moins sur *Anopheles* et *Aedes* (Otieno-Ayayo, Z.N., et al., 2008 et Poncet, S., et al., 1995). La protéine Cry4Ba est codée par une séquence de 3408 pb (1136 acides aminés). Cette protéine se caractérise par des activités larvicides élevées contre les larves d'*Anopheles* et d'*Aedes* mais très faible contre *Culex*. En effet, l'identité entre les séquences d'acides aminés au niveau des extrémités N-terminales de ces toxines est seulement d'environ 30 % (Sen, K., et al., 1988 et Angsuthanasombat, C., et al., 2004). Des études de structures sur ces deux protéines révèlent qu'elles partagent les trois domaines déjà décrits dans les sections précédentes et rencontrés chez les toxines actives sur les lépidoptères et les coléoptères (Angsuthanasombat, C., et al., 2004 et Boonserm, P., et al., 2005). L'activation des protéines Cry4Aa et Cry4Ba génèrent deux fragments de 45 et 20 kDa et 45 et 18 kDa respectivement avec l'élimination de la moitié de l'extrémité C-terminale de ces protoxines (Angsuthanasombat, C., et al., 1992; 1993). La protéine Cry4Aa possède, dans ses domaines II et III, des sites multiples de liaison aux récepteurs de l'intestin des larves de diptères et qui diffèrent des sites trouvés chez les autres toxines Cry de *Bt* (Howlader, M. T. H., et al., 2010). De plus, la structure trimérique du pré-pore des protéines Cry4Aa ou Cry4Ba semblent se former dans la monocouche lipidique facilitant par la suite l'insertion de leur « hairpins » $\alpha 4$ - $\alpha 5$ dans la membrane (Likitvivanavong, S., et al., 2006 et Boonserm, P., et al., 2005). Cette épingle à cheveux renferme un seul résidu tyrosine hautement conservé (Cry4A: Tyr202 et Cry4B: Tyr170) dont la structure aromatique de sa chaîne latérale joue un rôle crucial dans la reconnaissance des récepteurs chez les diptères. En effet, ce résidu est impliqué dans l'interaction avec les têtes des phospholipides stabilisant la structure oligomérique du pore formé (Kanintronkul, Y., et al., 2003 et Pornwiroon, W., et al., 2004). Protéolytiquement activée, Cry4Ba *in vitro* peut également former des pré-pores en oligomères qui interviennent dans la formation de pores et de

canaux ioniques stables même en l'absence des récepteurs (Rodríguez-Almazán, C., et al., 2012). Les toxines Cry4Ba se fixent *in vitro* à la membrane apicale en brosse des cellules intestinales du coecum gastrique et de l'estomac postérieur chez les larves d'*An. gambiae* (Ravoahangimalala, O., et al., 1995) et aux microvillosités intestinales chez *Ae. aegypti* (De Barros Moreira Beltrão, H., et al., 2007). Les mêmes cellules chez *Cx. pipiens* fixent spécifiquement Cry4Aa (*in vitro* et *in vivo*) (Yamagiwa, M., et al., 2001). Davantage, les fragments de 20 kDa (domaine I) de Cry4Aa et de 45 kDa (les hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$ du domaine I et des domaines II et III), produits suite au clivage intra-moléculaire du fragment de 65 kDa, sont séparément non toxiques contre les larves de *Cx. pipiens*, mais ensemble, ils causent une toxicité significative (Komano, T., et al., 1998).

Sur un autre plan, les différents spectres d'activité contre les moustiques des deux toxines Cry4Aa et Cry4Ba semblent provenir des différences structurales trouvées au niveau du domaine II des toxines Cry et des différents sites de liaisons aux récepteurs cibles (Angsuthanasombat, C., et al., 2004). En effet, les boucles 2 et 3 de Cry4Aa sont d'importants déterminants de la toxicité spécifique de cette toxine contre les larves d'*Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (Howlader, M.T.H., et al., 2009). Par contre, chez Cry4Ba, les deux boucles 1 et 2 de ce même domaine spécifient la toxicité contre *Anopheles* et *Aedes* (Buzdin, A.A., et al., 2002).

Quant à la toxine Cry11Ba, elle se fixe une APN chez *Anopheles quadrimaculatus* (Abdullah MA, et al., 2006). En effet, chez ces derniers, APN (aminopeptidase) ancrée à GPI a été reconnue comme récepteur putatif de Cry11Ba (Abdullah, M. A. F., et al., 2006 et Zhang, X., et al., 2008) mais n'interagit pas avec les toxines Cry4Ba ou Cry11Aa (Abdullah, M. A. F., et al., 2006). De plus, la protéine Cry11Aa, codée par une séquence de 1929 pb (643 acides aminés), présente une toxicité élevée contre les larves d'*Aedes* et de *Culex* mais plus faible contre les larves d'*Anopheles* (Revina, L.P., et al., 2004). Les récepteurs de Cry11Aa identifiés sont: GPI-aminopeptidase N (APNs), GPI-alkaline phosphatase (ALPs), cadhérine et α -amylase (Chen, J., et al., 2013 ; Fernandez, L., et al., 2006 ; Chen, J., et al., 2009 ; Fernandez-Luna, M. T., et al.,

2010 ; Chen, J. A., et al., 2009). Le processus d'activation de Cry11Aa implique une élimination spécifique des 27 résidus en N-terminal et d'un clivage intramoléculaire en deux fragments de 30–33 et 34–36 kDa. La coexistence de ces deux fragments est essentiel pour la toxicité contre *Cx. pipiens* et *Cx. Quinquefasciatus* (Dai, S.-M., et al., 1993 et Yamagiwa, M., et al., 2004). Dans le cas de la toxine Cry11Aa, il a été démontré que l'hélice α -8 du domaine II est un important épitope impliqué dans la liaison au récepteur et est susceptible d'être responsable de la sélectivité (Fernandez, L. E., et al., 2005). L'interaction de Cry11Aa avec ses récepteurs implique au moins trois régions exposées du domaine II (hélice α 8, β 4 et la boucle 3) (Fernandez, L. E., et al., 2005). Les deux toxines Cry11Aa et Cry4Ba ont montré une interaction avec une ALP de *Aedes aegypti* (Fernandez, L., et al., 2006 et Bayyareddy, K., et al., 2009). A ce sujet, des travaux reconnaissent des protéines de 200 kDa, 100 kDa et 65 kDa dans les cellules de l'intestin moyen d'*Aedes aegypti* qui pourraient lier la toxine Cry11Aa. Ces résultats proposent la présence de nombreuses molécules réceptrices pour les toxines Cry sur la membrane intestinale des moustiques. Les protéines de 100 et 65 kDa ont été trouvées ancrées à la membrane par GPI (glucosyl phosphatidyl inositol) (Fernandez, L.E., et al., 2006). En effet, GPI-ALP (phosphatase alcaline) est une molécule réceptrice importante qui aide à la toxicité de Cry11Aa contre les larves d'*Aedes aegypti*. En fait, l'isoforme ALP1 a été identifié comme étant le récepteur de Cry11Aa et deux sites de liaison de cet ALP ont été trouvés liant le domaine III RVQSQNSGNN et la boucle α -8 du domaine II de la toxine Cry11Aa (Fernandez, L.E., et al., 2009). Par la suite, il a été montré que ALP1 lie aussi Cry4Ba et Cry11Ba chez *Aedes aegypti* (Jiménez, A. I., et al., 2012) et chez *Anopheles gambiae* une ALP a également été identifiée comme une protéine de liaison de Cry11Ba (Hua, G., et al., 2009).

En 2009, Chen et al., et en 2008, Hua et al., ont montré que les deux toxines Cry4Ba et Cry11Aa sont reconnues par des protéines « cadherin-like » démontrées chez *Anopheles gambiae* et *Aedes aegypti* respectivement (Hua, G., et al., 2008 et Chen, J. A., et al., 2009). Comme chez les lépidoptères, les protéines cadhérines ont été identifiées chez *Aedes aegypti* et *Anopheles*

gambiae avec des affinités de liaison considérables à Cry11Aa, Cry11Ba et Cry4Ba (Hua, G., et al., 2008 et Chen, J. A., et al., 2009). Chez les lépidoptères aussi bien que chez les diptères, les récepteurs de type cadhérines sont situés sur les microvillosités du caecum et sur les cellules de l'intestin postérieur, les mêmes sites de liaison étudiés pour Cry11Aa et Cry4Ba (Hua, G., et al., 2008 et Chen, J. A., et al., 2009).

Au cours d'une étude faite en 2003 par Abdullah et al. Cry4Ba ne montre aucune toxicité contre les espèces du genre *Culex* et ceci par opposition à Cry4Aa. Ce phénotype a été modifié lorsque la région de la boucle 3 du domaine II de Cry4Ba a été soumise à une mutagenèse (Abdullah, M. A., et al., 2003). D'avantage, la mutagenèse de la boucle 1 et la boucle 2 de ce même domaine de Cry4Ba inhibe la toxicité contre les larves d'*Aedes* et d'*Anophèles* (Abdullah, M. A., et al., 2003). De même, les liaisons par compétition au domaine II de Cry11Aa ont montré que l'hélice $\alpha 8$, la partie $\beta 4$ et l'hélice 3 étaient indispensables pour la fixation aux BBMV d'*Aedes aegypti* (vésicules membranaires de bordure en brosse). Ces résultats démontrent que les régions en boucles du domaine II sont exceptionnellement essentielles pour l'association toxine Cry-récepteur chez les moustiques. Le récepteur de Cry11Aa identifié chez *Aedes aegypti* est caractérisé comme étant une phosphatase alcaline ancrée au GPI de taille 65 kDa trouvée dans les cellules du caecum gastrique et l'estomac postérieur (Fernandez, L., et al., 2006).

A part ces principaux récepteurs, plusieurs autres protéines ont montré une capacité à fixer des toxines Cry. Il s'agit chez les moustiques, de différentes protéines telles que des V-ATPases, l'actine ou des glycosidases identifiées chez *Ae. aegypti* et qui sont capables de fixer la toxine Cry4Ba de *Bti* (Bayyareddy, K., et al., 2009). Des études supplémentaires, basées sur l'analyse des protéines de liaison de Cry4Ba aux BBMV d'*Aedes aegypti*, ont révélé deux protéines associées aux « lipid rafts », la flotilline et la prohibitine. Ces données montrent que des protéines supplémentaires et des protéines intracellulaires peuvent avoir un rôle actif dans le mode d'action des toxines Cry chez les diptères (Hua, G., et al., 2009). D'autres études ont montré que les deux toxines

Cry4Ba et Cry11Aa se lient à des protéines ayant des homologies avec la famille des protéines α -amylase, connues également sous le nom de la famille 13 des glycosides hydrolases qui regroupent ensemble un grand nombre d'enzymes qui agissent sur les liaisons glycosidiques α (1–4) présentes dans l'amidon, le glycogène et d'autres polysaccharides (Janeček, S. 1997). D'autres membres de la famille des protéines α -amylase ont été rapportés en tant que récepteurs pour des toxines bactériennes. C'est le cas des α -amylases identifiées chez *Cx. pipiens* and *An. gambiae* comme liant les toxines binaires (Bin) de *Bacillus sphaericus* (Opota, O., et al., 2008). Bien que l' α -amylase Amy1 trouvée chez *Bti*, appartienne aussi à la famille des α -amylases, elle montre uniquement une identité modérée avec les α -amylases trouvées comme récepteurs des toxines binaires. Cette Amy1 est définie comme une nouvelle classe de récepteurs aux toxines Cry. Des études supplémentaires sont nécessaires portant sur les interactions entre les structures monomériques et oligomériques des toxines Cry4Ba et Cry11Aa avec l' α -amylase Amy1. En effet, ces études permettront de déterminer le rôle que joue ce récepteur dans le mécanisme d'action des toxines Cry (Fernandez-Luna, M., et al., 2010). Chez *An. albimanus*, c'est une α -amylase qui a été décrite comme un récepteur aux toxines Cry4Ba et Cry11Aa (Fernandez-Luna, M. T., et al., 2010a). Chez *Ae. Aegypti*, une α -amylase AAEL010540 a été identifiée comme liant aussi les toxines Cry4Ba et Cry11Aa (Després, L., et al., 2014).

La multiplicité des récepteurs aux toxines Cry décrits rend utile l'élaboration de plusieurs modèles pour tenter d'expliquer cette étape complexe de fixation des toxines à la paroi intestinale des diptères (Figure 11). En effet, trois modèles différents ont été proposés :

- Le modèle de Bravo consiste en un modèle autrefois appelé « pore-forming » étudié en 1987 par Knowles et Ellar et ensuite mis à jour par plusieurs auteurs (Bravo, A., et al., 2007; Soberon, M., et al., 2009; Likitvivatanavong, S., et al., 2011b). Ce modèle défend le principe de la fixation à un récepteur de type cadhérine ou à des protéines GPI-

ancrées (ALP ou APN). La toxine fixée subit un changement conformationnel qui facilite le clivage de son hélice $\alpha 1$ par des protéases de la membrane intestinale. Des incertitudes demeurent sur l'enchaînement des interactions. Ce modèle présente une ambiguïté : soit les toxines se fixent à un récepteur de type cadhérine puis à une ALP/APN avant de s'oligomériser, soit elles se fixent selon un modèle « ping-pong », donc tout d'abord à une ALP/APN et ensuite à un récepteur de type cadhérine pour se refixer sur une ALP/APN avant de s'insérer dans la membrane épithéliale (Pacheco, S., et al., 2009; Likitvivatanavong, S., et al., 2011b). Des études supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de trancher parmi ces deux alternatives et décider laquelle choisir selon quelles toxines (Gómez, I., et al., 2010)

- Le modèle de Zhang suggère qu'une cascade de signalisation intracellulaire est activée en aval d'un récepteur de type cadhérine qui est nécessaire à la toxicité (Zhang, X., et al., 2006). Il exclu donc que la mort cellulaire soit induite par l'insertion dans la membrane épithéliale de toxines Cry oligomérisées (Zhang, X., et al., 2005). Ce modèle est basé sur l'induction de mécanismes de mort cellulaire suite à la fixation de la toxine à un récepteur de type cadhérine (Zhang, X., et al., 2006).
- Le modèle de Jurat-Fuentes englobe les deux cités préalablement. Il implique une première fixation sur un récepteur de type cadhérine, puis une fixation sur des protéines GPI-ancrées (ALP ou APN). Cela induirait à la fois une perforation de la membrane cellulaire par des toxines Cry oligomérisées mais également une cascade de signalisation provoquant la mort cellulaire (Jurat-Fuentes, J. L., et al., 2006).

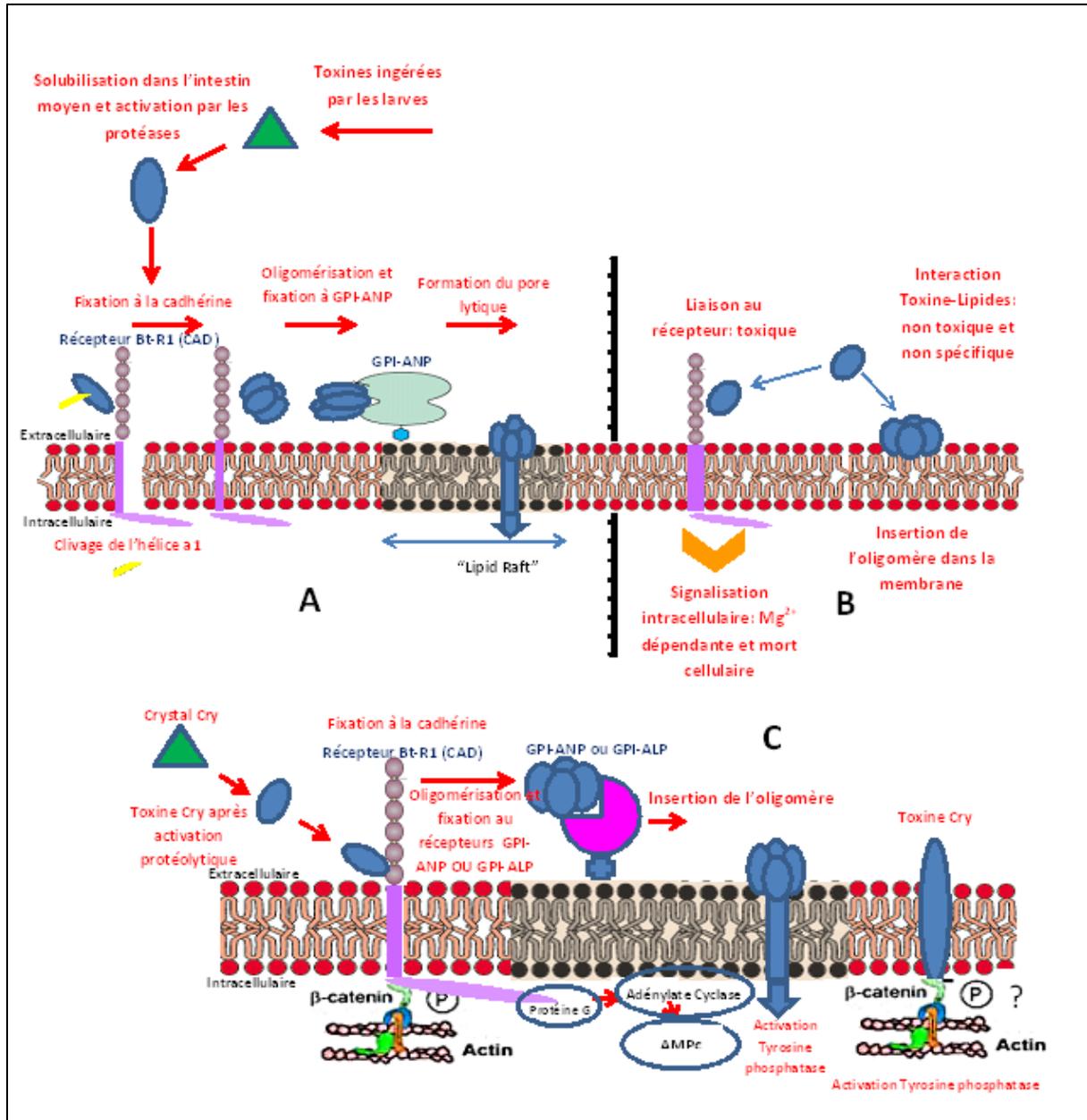


Figure 11 : Mode d'action des toxines Cry selon les trois modèles. (A) : Le modèle de Bravo, (B) : Le modèle de Zhang et (C) : Le modèle de Jurat-Fuentes (Adapté de Pardo-Lopez, L., et al., 2009, Gordon, R.L., et al., 1973, Pigott, C.R., et al., 2007).

IV.2.4. Mode d'action des protéines cytolytiques Cyt

L'activité insecticide de Cyt1Aa, codée par une séquence de 744 pb (248 acides aminés), est faible contre les trois genres de diptères (*Aedes*, *Anopheles* et *Culex*) (Thiery, I., et al., 1997 et Bourgouin, C., et al., 1986) et elle est caractérisée par un mécanisme d'action bien défini. Cette protéine exerce également une activité cytolytique *in vitro* sur certaines cellules de vertébrés et invertébrés (Thomas, W. E., et al., 1983). La cytotoxicité semble résulter d'une interaction entre le fragment hydrophobe de la protéine Cyt1Aa et la membrane phospholipidique. La séquence de Cyt1Aa ne présente aucune homologie avec celle des polypeptides Cry (Crickmore, N., et al., 1998) et elle est connue d'avoir un rôle dans le retard de la résistance aux toxines Cry de *Bti* (Wirth M.C., et al., 1997 et Wirth, M. C., et al., 2005). Cyt1Aa ne se lie pas à des récepteurs spécifiques mais elle possède une affinité importante aux acides gras insaturés qui composent la membrane des cellules intestinales des larves de diptères (Cantón, P. E., et al., 2013). La présence chez les diptères d'une grande proportion de phospholipides insaturés, non rencontrée chez les autres insectes, peut-être la raison de cette importante affinité des toxines Cyt aux membranes cellulaires des diptères et par la suite de leur activité *in vivo*. Deux grands mécanismes d'action sont décrits et discutés pour cette famille de toxines : Premièrement, la toxine cytolytique d'approximativement 27 kDa, cible principalement les liposomes des membranes plasmiques formés de phospholipides, avec une affinité remarquable aux lipides composés d'acides gras insaturés (Thomas, W. E., et al., 1983). Les toxines Cyt pourraient donc interagir directement avec les phospholipides afin de s'insérer dans les membranes en formant un pore (c'est la théorie « pore forming »). Leur partie C-terminale composée majoritairement de brins β s'insère dans la membrane et leur partie N-terminale, comprenant principalement des hélices α , est exposée à l'extérieure de la membrane (Cohen, S., et al., 2011 et Rodriguez-Almazan, C., et al., 2010). L'oligomérisation à la surface de la membrane provoque la formation de pores ce qui induit un déséquilibre ionique, un flux net d'eau, un gonflement cellulaire, provoquant ainsi la lyse cellulaire. Le deuxième

mécanisme décrit que, lors de son interaction, Cyt provoque un réarrangement « detergent-like » des lipides membranaires accompagné d'une hypertrophie rapide, perturbation de l'intégrité de la membrane et cytolysse, et tout cela sans former des pores (c'est la théorie du « détergent ») (Butko, P. 2003) (Figure 12).

Le processus de toxicité de Cyt1Aa a été bien étudié aussi. Il démarre par l'interaction de Cyt1Aa avec les lipides, suivi par son agrégation dans la bicouche plane de phosphatidyl-éthanolamine des cellules épithéliales et la formation des pores (Gill et al., 1993). Ces pores, de 1 à 2 nm de largeur, sont considérés des canaux sélectifs des cations comme K^+ et Na^+ . Une fois l'équilibre de ces ions à travers la membrane cellulaire de l'insecte s'établit, cela conduit à un flux osmotique d'eau provoquant la lyse de la cellule (Knowles, B. H., et al., 1993). Il a été décrit que les hélices A et C (Figure 9) de Cyt1Aa sont les structures majoritaires qui sont incorporées dans la membrane lipidique et de ce fait elles détiennent un rôle essentiel dans le processus d'oligomérisation de Cyt1Aa (Butko, P. 2003).

L'activation *in vitro* de la protoxine Cyt1Aa, par la trypsine, la protéinase K et les protéases endogènes, mène à la formation d'un seul fragment actif de 22–25 kDa (Al-yahyaee, S. A. S., et al., 1995 et Cahan, R., et al., 2008) qui est trois fois plus efficace que la protoxine (Butko, P., et al., 1996 et Butko, P., et al., 1997). La protoxine Cyt1Aa de 27 kDa soluble à pH alcalin a été démontrée active *in vitro* sur des lignées cellulaires de moustiques et des érythrocytes humains (de Maagd, R. A., et al., 2003). *In vivo*, elle se lie à la membrane apicale des cellules épithéliales des intestins des diptères, des cellules du coecum gastrique et des cellules de l'estomac des larves de diptères. Cependant, l'existence de récepteur spécifique chez ces insectes peut être essentielle à la spécificité des toxines Cyt (Koni, P. A., et al., 1993). Les toxines Cyt sont aussi synthétisées sous forme de protoxines et sont activées suite au clivage d'une petite fraction de leur partie N-terminale et C-terminale (Armstrong JL., et al., 1985, Gill SS., et al., 1987 et Li, J., et al., 1996). Par exemple, 32 résidus d'acides aminés et 15 autres sont éliminés des parties N et C terminales

respectivement de la protéine Cyt2Aa par une protéase, créant ainsi une protéine monomérique ayant une activité hémolytique (Koni, P. A., et al., 1994).

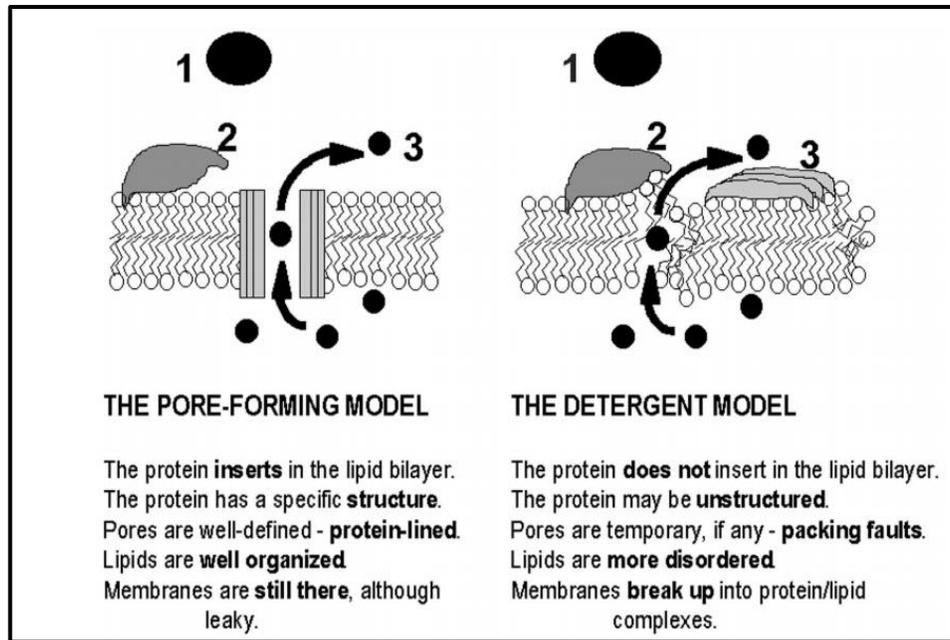


Figure 12 : Les deux modes d'action proposés de la protéine Cyt1A. (1) La toxine soluble dans le milieu extracellulaire. (2) La toxine s'approche de la membrane lipidique, change de conformation et se lie aux lipides de la membrane. (3) La toxine soit elle s'insère dans la membrane lipidique où elle forme des pores oligomériques, soit elle forme des agrégats et s'allonge le long de la surface de la membrane qui se fragmente en plusieurs complexes lipides-toxines. Les molécules intracellulaires (cercles noirs) fuient soit à travers les pores soit à travers la membrane lipidique fragmentée et déstabilisée (Butko, P. 2003).

IV.2.5. Particularités des toxines mineures produites par *Bti*

La protéine Cry10Aa, codée par une séquence de 2025 pb (675 acides aminés), diffère remarquablement des protéines Cry4Aa et Cry4Ba. Son activité insecticide est comparable à celle des toxines Cry et est synergique avec Cyt1Aa

contre les larves d'*Aedes aegypti* (Hernández-Soto, A., et al., 2009) et avec Cry4Ba contre les larves de *Culex pipiens* (Delécluse, A., et al., 1988).

La protéine Cyt2Ba, codant par une séquence de 789 pb (263 acides aminés), est trouvée à une faible concentration dans le crystal de *Bti* (Guerchicoff, A., et al., 1997). La protéine Cyt2Ba protéolytiquement active, est hémolytique *in vitro* et exerce des toxicités faibles contre les larves de *Culex*, *Aedes* et *Anopheles* et cela par comparaison à Cyt1Aa (Juárez-Pérez, V., et al., 2002). Toutefois, elle exerce une toxicité plus importante que Cyt1Ab qui provient de *Bt subsp. medellin* (Wirth, M. C., et al., 2001). Cyt2Ba agit en synergie avec Cry4Aa, Cry4Ba et Cry11Aa (Manasherob, R., et al., 2006 et Ben-Dov, E. 2014) et contribue à la toxicité globale de *Bti*.

VI.2.6. Complexité des mélanges et synergisme entre les toxines

Plusieurs études ont montré que des interactions complexes existent entre les toxines Cry et Cyt conférant des activités différentes contre une variété d'espèces de moustiques avec des variations du niveau de toxicité (Crickmore, N., et al., 1995 et Delecluse, A., et al., 1995). Nous parlons de synergisme lorsque le mélange de deux produits induit une mortalité plus importante que leur simple effet additif. Par opposition, le terme antagonisme s'applique lorsque que le mélange de deux produits induit une baisse de leur efficacité. Aucune interaction antagoniste n'a été décrite entre les toxines du *Bti*. La toxicité de quatre protéines Cry, notamment Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, a été comparée à celle des toxines Cyt1Aa et Cyt2Ba. Les résultats obtenus indiquent que les toxines Cry ont un effet toxique plus important que les protéines Cyt. Toutefois, les cristaux de *Bti* ont montré une activité plus marquée que celle de chaque toxine séparée citée avant (Chilcott, C. N., et al., 1988). En effet, les associations de Cry4Aa avec Cry4Ba, ou avec Cry11Aa, ou de ces trois protéines ensemble, ont montré une activité synergique de ces toxines contre les larves de *Culex*, *Aedes* et *Anophèles* (Angsuthanasombat C., et al., 1992, Ben-

Dov E., et al., 1995 et Delecluse A., et al., 1993). Similairement, Cry4Ba et Cry11Aa ont montré une toxicité combinée contre *Aedes aegypti* (Crickmore N., et al., 1995). En 2005, Perez et al. ont montré que la protéine Cyt1Aa agit en synergie avec Cry11Aa et Cry4Ba en fonctionnant comme un récepteur à ces protéines (Perez C., et al., 2005). Les interactions synergiques les plus importantes impliquent la toxine Cyt1A qui permet d'augmenter plus de 20 fois la toxicité des mélanges de toxines Cry (Wu, D., et al., 1994). En 2005, Perez et al. ont démontré qu'un domaine de la toxine Cyt1A, situé au niveau de la boucle $\beta 6$ - αE , peut fixer trois boucles du domaine II des toxines Cry (boucles 2, $\alpha 8$ et $\beta 4$, Perez C., et al., 2005). En effet, la fixation de Cry11Aa à Cyt1Aa déclenche l'oligomérisation de la toxine Cry11Aa formant une structure de 250 kDa. Dans cette même étude, ils ont aussi montré que cette structure est capable de former des pores, ce qui suggère que Cyt1Aa imite au moins le rôle d'un récepteur de type cadhérine en ce qui concerne la formation d'oligomères (Perez, C., et al., 2007). Par conséquent, la présence de la toxine Cyt1A permet donc d'augmenter largement le nombre de récepteurs membranaires et ainsi l'activité et la toxicité des toxines Cry. Cyt2Aa est également susceptible de fonctionner comme un récepteur pour Cry4Ba (Cantón, P. E., et al., 2011). La production combinée de toxines et de leurs récepteurs par *Bti* explique probablement l'apparition retardée d'insectes résistants (Perez, C., et al., 2005) (Figure 13).

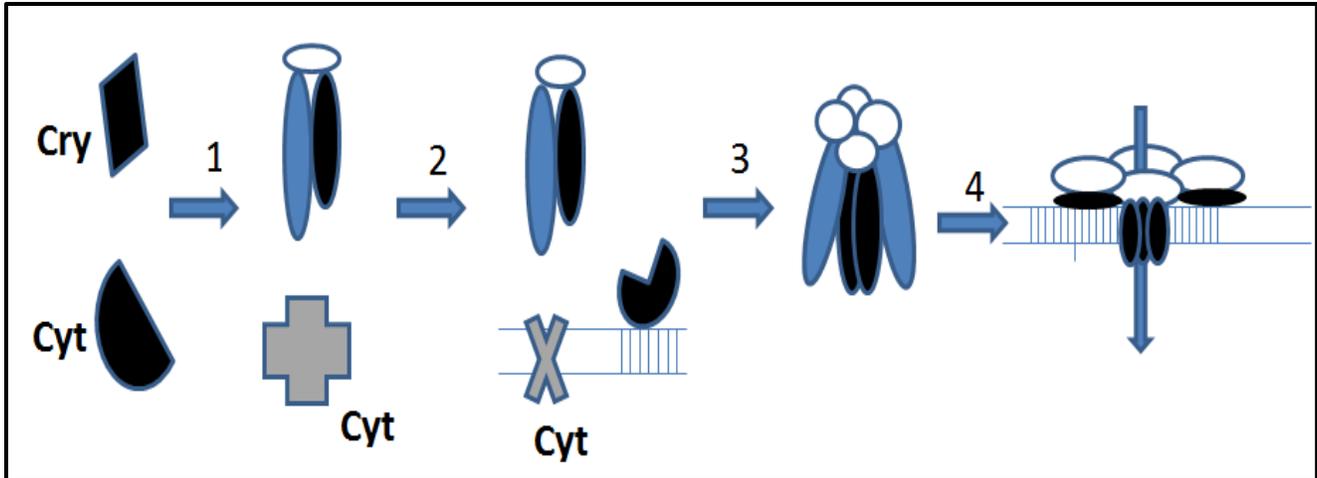


Figure 13 : Rôle des toxines Cyt et Cry dans l'intoxication des larves de diptères. (1) Solubilisation et activation des toxines Cry et Cyt ; (2) La toxine Cyt s'insère dans la membrane et la toxine Cry se fixe aux récepteurs membranaire ; (3) Induction de l'oligomérisation des toxines Cry ; (4) L'oligomère s'insère dans la membrane conduisant à la formation des pores (Adapté de Bravo A., et al., 2008).

V. Autres fonctions des δ -endotoxins de *Bti*

Outre leurs activités insecticides, plusieurs toxines Cry et Cyt ont montré des activités antibactériennes et anticancéreuses. Une fois le gène *cyt1Aa* est exprimé seul dans une bactérie recombinante acristallifère *Bt kurstaki* ou dans *E. coli* (Manasherob, R. Z., et al., 2003), il provoque la perte de la capacité de formation de colonies, de la croissance des cellules et de la réplication de l'ADN et par la suite une lyse partielle des cellules. Ces résultats suggèrent que, à part son activité au niveau de la formation de pore membranaire, Cyt1Aa perturbe particulièrement les associations du nucléoïde avec la membrane cytoplasmique lors de la division cellulaire. Parallèlement, la haute affinité de Cyt1Aa envers les phospholipides zwitterioniques et l'ADN, peut faciliter la séparation de l'ADN de

la membrane et modifier ultérieurement le compactage du nucléoïde. Sa co-expression avec P20 (codant pour une protéine chaperonne) assure sa stabilité et protège la cellule de l'action létale de Cyt1Aa (Manasherob, R., et al., 2001). L'activité antibactérienne de la protéine Cyt1Ca tronquée au niveau N-terminal et exprimée dans *E. coli* provoque un arrêt instantané de la croissance de la biomasse et une diminution de la viabilité cellulaire (Itsko, M., et al., 2007).

Cyt1Aa, Cry4Ba et Cry11Aa ont une activité antibactérienne contre *E. coli* et certaines espèces Gram positifs telles que *Micrococcus luteus*, *Streptomyces chrysomallus* et *Staphylococcus aureus* (Cahan, R., et al., 2008 et Revina, LP., et al., 2005). L'activité bactéricide de Cyt1Aa se manifeste par des modifications morphologiques et par une altération de l'équilibre ionique sur *E. coli*, alors qu'elle préserve un effet bactériostatique pour *Staphylococcus aureus* (Cahan, R., et al., 2008). Cyt1Aa peut se lier à la couche externe de cellules Gram-négatifs et s'infiltrer efficacement à travers la membrane cytoplasmique. Davantage, il a été démontré que Cyt1Aa peut aider l'activité antibactérienne de quelques antibiotiques et ceci par rupture partielle de la membrane externe, ce qui conduit à une meilleure pénétration de l'antibiotique (Cahan, R., et al., 2008).

Cyt1Aa et Cyt2Ba affichent également des activités anticancéreuses. Cyt1Aa manipulée *in vitro* révèle une activité anti-cancéreuse contre le myélome multiple (Cohen, S., et al., 2007). Quant à Cyt2Ba, elle s'est révélée toxique *in vitro* contre les cellules humaines du cancer du sein (MCF-7) (Corrêa, R. F. T., et al., 2012).

Enfin, il est important de noter dans ce contexte que les toxines Cry d'autres sous-espèces de *Bt* (*kurstaki*, *galleriae*, *tenebrionis*) sont aussi toxiques contre les bactéries anaérobies Gram positifs *Clostridium butyricum* et *Clostridium acetobutylicum* et les archées *Methanosarcina barkeri* (Yudina, TG., et al., 2007).

VI. Nouvelles δ -endotoxines identifiées à activité sur les diptères

V.1. Cry56Aa1

Cry56Aa1 protéine, isolée à partir de *Bacillus thuringiensis* Ywc2-8, du sol du bassin de Sichuan en Chine occidentale, est toxique à la fois contre les diptères (*Aedes aegypti*) et les lépidoptères ravageurs (*Plutella xylostella* et *Helicoverpa armigera*). Une comparaison Clustal X de la protéine Cry56Aa1 avec d'autres séquences de protéines Cry connues a montré que cette nouvelle protéine présente une faible identité avec d'autres protéines telles que Cry4Aa, Cry10Aa, Cry30Aa, Cry30Ba, Cry24Aa, et Cry54Aa. Une analyse détaillée a révélé que cinq blocs de Cry56Aa1 contiennent des séquences conservées d'acides aminés qui sont présents dans la plupart des protéines Cry (Schnepf, E., et al., 1998). L'analyse de la séquence en acides aminés de Cry56Aa1 utilisant le service de ProDom a démontré que la protéine est composée de trois domaines distincts qui sont trouvés chez les protéines Cry cristallisées (Cry1Aa1, Cry2Aa1, Cry3Aa1, Cry3Bb1 et Cry4Ba1). Toutefois, Cry56Aa1 ne contient pas la moitié carboxy-terminale des protéines typiques de 130 kDa (Li, J., et al., 1991). L'analyse de cette protéine a démontré également qu'elle avait une activité similaire à la protéine Cry2A de *Bt. krustaki* utilisée pour contrôler les ravageurs lépidoptères et diptères (Schnepf, E., et al., 1998). Une étude a montré que Cry56Aa1 possède un grand spectre d'activité insecticide, et est caractérisée par une activité 25 fois plus importante ($LC_{50} = 0.476 \mu\text{g/mL}$) contre *Aedes aegypti* par rapport à la souche mondialement connue *Bti* ($LC_{50} = 3,8 \mu\text{g/mL}$) (Berón, C. M., et al., 2007). Ainsi, il est important d'analyser plus en détail cette protéine et son mode d'action afin de l'utiliser comme une alternative pour contrôler les moustiques et les ravageurs des cultures.

V.2. Cry44A

En 2006, Takeshi Ito et al. ont montré que les cristaux Cry44A (dont le gène correspondant est cloné à partir de *Bacillus thuringiensis subsp. Entomocidus* INA288) ont montré une forte toxicité contre *Culex pipiens* ($LC_{50} = 0.006 \mu\text{g/mL}$) et *Aedes aegypti* ($LC_{50} = 0.012 \mu\text{g/mL}$). Ces cristaux de Cry44A sont d'environ 49 fois et 22 fois plus toxiques que les cristaux Cry4A contre *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*, respectivement. Ils sont légèrement toxiques contre *Anopheles stephensi* ($LC_{50} = 1.265 \mu\text{g/mL}$). Il est essentiel d'effectuer des essais biologiques supplémentaires en utilisant ces toxines Cry contre les colonies de moustiques résistantes sélectionnées avec les toxines de *Bti*. Ces études prouvent que de nouveaux gènes *cry* de la protéine Cry44Aa peuvent être appropriés dans la gestion de la résistance et / ou comme composant de nouvelles de toxines à activité diptéricide (Takeshi Ito, T. I., et al., 2006).

V.3. Cry20Aa

Cry20Aa est naturellement tronquée et a une masse moléculaire de 86138 Da. Les 11 premiers acides aminés de cette protéine de 86 kDa provenant de *B. thuringiensis fukuokaensis* (Yu, Y.M., et al., 1991) ont été déterminés par séquençage protéique comme étant la séquence suivante MNPYQNNNEIV. En fait, cette dernière est homologue à l'extrémité N-terminale des toxines Cry4Aa et Cry10Aa de *Bti*, MNPYQNKNEYE (Thorne, L., et al., 1986 et Ward, E.S., et al., 1987). Cry20Aa possède une petite similitude de séquence comparée à celle de Cry4A, Cry4B, et Cry10A. Cette similitude est trouvée principalement dans les séquences des blocs conservés avec des niveaux d'identité de 21 à 23 % en acides aminés. L'évaluation de son activité toxique a été faite sur des larves d'*Aedes aegypti* et de *Culex quinquefasciatus*. Cette protéine Cry20Aa a montré une toxicité de l'ordre de 600 à 700 $\mu\text{g/mL}$ (Lee, H.-K., et al., 1997).

V.4. Cry19A

Cry19A (isolé à partir de *Bacillus thuringiensis jegathesan*) est un polypeptide de 648 résidus avec une masse moléculaire de 74.7 kDa. La séquence d'acides aminés de Cry19A a été comparée à celles d'autres toxines connues de *Bt*. Les seules similarités par rapport aux toxines de *Bt* ont été localisées dans les cinq blocs conservés des delta-endotoxines (Höfte, H., et al., 1989). Les delta-endotoxines Cry4A et Cry10A ont des similarités de séquences élevées avec Cry19A, mais qui sont restreintes aux premiers 51 acides aminés (60 % d'identité). Aucune autre similitude significative n'a été trouvée. Des tests *in vivo* ont révélé que Cry19A est toxique contre *Anopheles stephensi* (LC₅₀ = 24.926 ng/mL) et *Culex pipiens* (LC₅₀ = 10.282 ng/mL) (Rosso, M.-L., et al., 1997).

V.5. Cry16A

Cry16A est une toxine Cry-like qui est la première à être trouvée dans un organisme anaérobie, non-*Bt* (*Clostridium bifermentans subsp. malaysia* CH18). Les régions de fortes similitudes avec les toxines Cry de *Bt* sont situées dans la partie amino-terminale, en particulier dans les blocs I à IV. La séquence du bloc V et l'extrémité carboxy-terminale des delta-endotoxines sont absents de Cry16A. Cette toxine ne montre pas de réactions croisées avec des anticorps dirigés contre l'une des toxines de Bti ou d'autres toxines de *Bt* (Nicolas, L., et al., 1993). Cela vient pour confirmer que cette protéine appartient à une nouvelle classe de toxine diptéricide. Enfin, Cry16A est toxique contre les larves de moustiques des espèces d'*Aedes aegypti*, *Culex pipiens* et *Anopheles stephensi* (Barloy, F., et al., 1996).

V.6. Cry29A et Cry30A

Ces deux protéines partagent seulement 27.1 % de leur séquence d'acides aminés. Leur identité avec Cry4A, Cry10A ou Cry19A varie de 28 à 36 %. En fait, les 52 premiers acides aminés de Cry29A et Cry30A sont semblables à ceux de Cry4A, Cry10A, et Cry19A. Testées contre les larves de moustiques

des espèces d'*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles stephensi*, Cry29A et Cry30A n'ont pas montré de toxicité (seule ou combinées) (Juárez-Pérez, V., et al., 2003). Toutefois, une synergie entre Cry29A et la protéine hautement toxique Cry11Bb a été observée contre les larves d'*Aedes aegypti*. Cependant, la même association de ces deux toxines interagit d'une façon antagoniste sur *Anopheles stephensi* (Ibarra, J. E., et al., 2003).

V.7. Cry54Aa1 et Cry30Fa1

Ces deux protéines ont été isolées du sol de Chine de la bactérie *Bacillus thuringiensis* BtMC28. La protéine Cry54Aa1 est de 673 acides aminés de masse moléculaire 76.3 kDa. Elle présente 38 % d'identité avec Cry10Aa de *Bt*. La protéine Cry30Fa1 est de 687 acides aminés de masse moléculaire 77.1 kDa. Elle présente 74 % d'identité avec la protéine Cry30Aa. Une analyse détaillée a montré que ces deux protéines contiennent les cinq blocs conservés (bloc 1 à 5) qui sont présents dans presque toutes les protéines Cry de *Bt* (Tan, F., et al., 2009). Une analyse plus poussée de la séquence de Cry54Aa1 montre que cette protéine est composée de trois domaines distincts comme indiqué pour les protéines Cry cristallisées (Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb et Cry4Ba) et ne contient pas la moitié carboxy-terminale trouvée chez les protéines de 130 kDa (Li, J., et al., 1991 et Morse, R. J., et al., 2001). Concernant son activité insecticide, la protéine Cry 54Aa a des effets insecticides remarquables contre *Laphygma exigua*, *Helicoverpa armigera*, et *Aedes aegypti*. En fait, Cry54Aa1 se caractérise par a un large spectre insecticide touchant non seulement les lépidoptères ravageurs (*Laphygma exigua* et *Helicoverpa armigera*), mais aussi pour les diptères nuisibles (*Aedes aegypti*).

V.8. Cry30Ga1

Le gène cry30Ga1 a été isolé de la souche *Bacillus thuringiensis* (HS18-1) du sol de Chine. La protéine Cry30Ga1 est de 75 kDa et possède un spectre large d'activité insecticide contre les diptères (*Aedes aegypti*: LC₅₀ = 7.101 µg/mL) et les lépidoptères (*Plutella xylostella*: LC₅₀ = 6.829 µg/mL). Cette

protéine renferme les séquences des cinq blocs conservés trouvés chez les autres delta-endotoxines de *Bt* (Schnepf, E., et al., 1998).

Le tableau 4 suivant regroupe les différents variants de ces protéines conformément à la base de données de Neil Crickmore:

Tableau 4 : Les différents variants des autres protéines impliquées dans la toxicité contre les diptères

Protéines	Variants	Numéro d'accès	Auteurs	Année	Souche de Référence	LC50	Larves testées
Cry16A	Cry16Aa1	CAA63860	Barloy et al.,	1996	<i>Cb malaysia CH18</i>	Ordre de 150 et 300 µg/mL	<i>Anopheles stephensi</i> <i>Culex pipiens</i> <i>Aedes aegypti</i>
Cry19A	Cry19Aa1	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	<i>Bt jegathesan 367</i>	24.926 ng/mL 10.282 ng/mL	<i>Anopheles stephensi</i> <i>Culex pipiens</i>
Cry20A	Cry20Aa1	AAB93476	Lee & Gill	1997	<i>Bt fukuokaensis</i>	700 µg/mL 648 µg/mL	<i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Aedes aegypti</i>
Cry30A	Cry30Aa1	CAC80986	Delecluse et al.,	2000	<i>Bt medellin</i>	Données non fournies	Données non fournies
Cry54A	Cry54Aa1	ACA52194	Tan et al.,	2009	<i>Bt MC28</i>	5.08 µg/mL 13.6 µg/mL 9.02 µg/mL	<i>Laphygma exigua</i> <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Aedes aegypti</i>
	Cry54Aa2	GQ140349	Lixin Du et al.,	2012	<i>Bt FBG25</i>		
Cry56A	Cry56Aa1	ACU57499	Zhu et al.,	2010	<i>Bt Ywc2-8</i>	0.476 µg/mL	<i>Aedes aegypti</i>
	Cry56Aa2	GQ483512	Guan et al.,	2009	<i>Bt G7-1</i>		
	Cry56Aa3	JX025567	Qiao Li et al.,	2012	<i>Bt HS18-1</i>		
	Cry56Aa4	KJ740651	Yu et al.,	2014	<i>BN7-5</i>		
Cry44A	Cry44Aa	BAD08532	Ito et al.,	2006	<i>Bt entomocidus INA288</i>	0.006 µg/ml 0.012 µg/ml 1.265 µg/ml	<i>Culex pipiens</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Anopheles stephensi</i>
Cry30Ga	Cry30Ga1	ACG60020	Zhu et al.,	2008	<i>Bt HS18-1</i>	6.829 µg/mL 7.101 µg/mL	<i>Plutella xylostella</i> <i>Aedes aegypti</i>
	Cry30Ga2	HQ638217	Tian et al.,	2010	<i>Bt S2160-1</i>		
Cry30Fa	Cry30Fa1	ACI22625	Tan et al.,	2008	<i>Bt MC28</i>	Données non fournies	Données non fournies

VII. Le contrôle biologique des diptères

Nos travaux se sont articulés autour de l'activité contre les diptères. En effet, la lutte contre les diptères nuisant ou vecteurs de maladies (Diptera-Culicidae) est une vitalité dont les enjeux socio-économiques, sanitaires et environnementaux sont considérables. Plusieurs événements, tels que l'épidémie historique de chikungunya à La Réunion, l'introduction et l'expansion d'espèces tropicales (*Aedes albopictus*) en Europe, la première épidémie de chikungunya en Italie ainsi que les attaques des diptères (*Mayetiola destructor*, *Ceratitis capitata*,...) aux céréales et aux fruits, ont abouti à une prise de conscience des effets néfastes de ces diptères. Les autorités internationales se mobilisent face à l'urgente nécessité de disposer d'outils d'aide à la lutte contre ces diptères. L'élaboration d'outils de lutte contre les moustiques doit prendre en compte la prévention des risques d'apparition de phénomènes de résistance, faire face à la diversité des espèces de diptères et aux possibles changements climatiques susceptibles de modifier la distribution des espèces nuisibles et des vecteurs potentiels.

Depuis le fait que la nécessité de lutter contre les moustiques a été reconnue comme un élément essentiel des initiatives de la santé publique au début du 20^e siècle, une meilleure connaissance de la biologie des moustiques a entraîné l'élaboration d'une variété de moyens de lutte visant à réduire avec succès les niveaux de nuisance des moustiques et la transmission de maladies. La visée principale étant donc de maximiser le contrôle, tout en minimisant les impacts négatifs humains et environnementaux. Pour se faire, la gestion intégrée des diptères se fixe des lois comme suit :

- Protéger la santé de l'Homme, des animaux et de l'environnement ;
- Promouvoir un usage rationnel des pesticides ;
- Réduire la contamination environnementale des sols, des nappes phréatiques, des eaux de surface, des pollinisateurs, la faune et les espèces en voie de disparition en raison des activités de lutte contre les moustiques ;

- Utiliser les contrôles biologiques (prédateurs natifs et non invasifs) ;
- Utiliser la méthode de réduction des sources de diptères (élimination ou réduction des habitats des diptères) ;
- Utiliser des pesticides spécifiques bien ciblés, à de plus faibles concentrations qui sont efficaces dans la mesure du possible ;
- Trouver le moment propice pour effectuer les applications des pesticides ;
- Minimiser les problèmes de résistance aux pesticides.

Le *Bti* est le moyen de lutte le plus utilisé pour contrôler les moustiques et les mouches noires. Egalement, il est utilisé dans la prévention des maladies transmises par les moustiques. Le *Bti* représente une solution écologique non toxique pour les humains et les animaux et s'élimine rapidement dans l'environnement par dégradation. Il se trouve sans aucun impact nocif significatif sur les habitudes alimentaires des autres espèces animales.

Ce bio-larvicide est appliqué dans l'eau stagnante ou courante, en d'autres termes dans les endroits où pondent les moustiques et les mouches noires. En effet, la lutte contre les insectes piqueurs, au moyen de tels larvicides biologiques, permet d'atteindre et de conserver un meilleur équilibre entre les actions de la nature et celles de l'Homme. Au cours des années 1980, l'utilisation à grande échelle du *Bti* pour le contrôle des moustiques (comme dans la vallée du haut Rhin) a permis de réaliser de nombreuses évaluations de l'innocuité de la bactérie pour les organismes aquatiques non ciblés. En effet, aucun des taxons exposés dans l'eau à de fortes concentrations de *Bti* n'a semblé incommodé (Merritt, R. W. 1989 et Becker, N., et al., 1993).

La sous-espèce *israelensis* (*Bti*) est très toxique pour les larves de certains diptères (moustiques et simulies) suite à l'ingestion du mélange spores-cristaux. La toxicité du *Bti* est limitée à quelques familles de Nématocères. En plus des moustiques et des simulies, seuls les Dixidés, famille étroitement apparentée, est sensible au *Bti*. Les larves de Psychodidés, de Chironomidés, de Sciaridés et de Tipulidés sont en général beaucoup moins sensibles. En outre, d'autres diptères, comme la mouche domestique (*Musca domestica* Linnaeus,

Muscidés) et les *Syrphidés*, comme le *Helophilus pendulus Linnaeus*, sont insensibles au *Bti* (Ali, A. 1981; Mulla, M. S., et al., 1982; Back, C., et al., 1985 et Becker, N., et al., 1993). En Allemagne, des études ont montré que les larves de *Chironomus plumosus* et *Chlorophorus annularius*, qui se produisent dans les sédiments aquatiques, sont uniquement affectés par Bactimos® PT, dont le principe actif est les cristaux et les spores de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (souche AM65-52). En parallèle, en 1990 en Californie, Mulla et al. ont constaté que *Conomurex decorus* pourrait être contrôlé avec succès par VectoBac® TP, qui est aussi une suspension aqueuse de cristaux et spores de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (souche AM65-52), utilisée pour le contrôle des moustiques, les mouches noires et les larves de mouche (Mulla, M. S. 1990).

En ce qui concerne les moustiques vecteurs de maladies, ils posent des problèmes sanitaires car ils sont vecteurs de nombreuses maladies : certains moustiques du genre *Anopheles* transmettent la malaria, tandis que certains *Aedes* la dengue ou le chikungunya, et certains *Culex* la filiarose, le West Nile virus ou l'encéphalite (Hemingway, J. 2000). En effet, la malaria est causée par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium* et est très répandue au monde. Chaque année, environ 500 millions de personnes sont infectées et 600000 en meurt (WHO, 2014). D'ailleurs, certains virus comme le virus du Nil occidental, sont fréquemment observés en Europe (Hubálek, Z., et al., 1999). Récemment, plusieurs facteurs favorisent l'augmentation des aires de répartition des moustiques et entraînent l'expansion des maladies qu'ils provoquent, nous citons à titre d'exemple : l'augmentation des échanges économiques et humains ainsi que les changements climatiques globaux. Effectivement, c'est le cas du moustique asiatique *Aedes albopictus* qui, depuis l'Asie, a colonisé l'Amérique, l'Afrique et l'Europe depuis les années 1990 (Dalla Pozza, G., et al., 1992), et qui a causé en 2007 l'épidémie de chikungunya en Italie (Rezza, G., et al., 2007).

Les trois modèles d'insectes qui ont servi pour tester les souches de *Bt* étudiées dans le cadre de cette thèse sont : *Culex pipiens*, *Aedes Albopictus* et *Anopheles gambiae*. Elles ont été fournies par Dr. Mike Osta et Dr. Zakaria Kambris du Département de Biologie de l'Université Américaine (AUB) de Beyrouth.

1- *Culex pipiens*

Culex pipiens est connu comme étant le vecteur de plusieurs maladies notamment des arboviroses. Certains chercheurs le considèrent comme l'un des principaux vecteurs du virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLE) aux États-Unis. Egalement, il a été considéré aussi comme le principal vecteur de l'épidémie du virus West Nile qui a frappé les États-Unis en 2002 (Palmisano et al., 2005). La vie du moustique *Culex pipiens* est composée de deux phases distinctes: une phase aquatique et une phase aérienne. Après l'accouplement, les femelles prennent un repas sanguin nécessaire à la formation des œufs. Toutefois, les femelles de *Culex pipiens* peuvent faire une première ponte sans repas sanguin: elles sont dites « autogènes ». En effet, pour se faire, elles utilisent les réserves accumulées durant leur stade larvaire. L'éclosion se produit environ 24 h à 48 h après l'oviposition. Les larves ont un mode de vie exclusivement aquatique, d'une durée de 5 à 6 jours. Ces larves subissent 4 mues avant de se transformer en nymphe, à ce stade, la nymphe ne se nourrit plus et de profondes modifications anatomiques s'opèrent. Après 2 à 3 jours, l'adulte est complètement formé dans son enveloppe nymphale. *Culex pipiens* a une répartition géographique caractéristique, et est présent en Europe, au Nord et au Sud de l'Afrique, en Asie non tropicale et en régions tempérées de l'Amérique du Nord et du Sud (Harbach et al., 1985).



Figure 14 : Photographie de *Culex pipiens* femelle

2- *Aedes albopictus*

Le moustique-tigre *Aedes (Stegomyia) albopictus* (*Stegomyia albopicta*) est un insecte de la famille des *Culicidae*, originaire d'Asie du sud-est. Elle a l'avantage de s'élever facilement en laboratoire à des températures comprises entre 25 et 30°C et les femelles pondent en moyenne 74 œufs tous les 3-4 jours. Ce moustique transmet le virus du chikungunya et de la dengue. En effet, seules les femelles sont porteuses du virus du chikungunya, car les mâles ne piquent pas.



Figure 15 : Photographie d'une femelle d'*Aedes albopictus* piquant sa proie

3- *Anopheles gambiae*

Anopheles gambiae de la famille des *Culicidae* a un cycle qui dure 48 heures lorsque la moyenne de température jour/nuit est de 23°C. Le nombre d'œufs pondus après chaque cycle varie en fonction de l'espèce (environ 200 à 300). En effet, le moustique *Anopheles gambiae* est le principal vecteur du paludisme en Afrique. Selon les dernières statistiques de l'OMS, cette maladie parasitaire affecte de 300 à 500 millions de personnes par an dans le monde, et en tue plus d'un million et demi chaque année. L'Afrique est le continent le plus touché avec 90% des cas de paludisme recensés dans ses zones tropicales. L'Europe, quant à elle, connaît des cas de paludisme dits d'importation. Les parasites du genre *Plasmodium*, responsables de la maladie, sont transmis à l'Homme lors de la piqûre d'un moustique femelle infecté. Une meilleure connaissance de la biologie de l'anophèle permettrait de mieux le combattre. Il s'agit de la première espèce de moustique, et même de vecteur parasitaire, dont le génome ait été séquencé en entier, par un consortium international en 2002.



Figure 16 : Photographie d'*Anopheles gambiae*

VIII. La résistance aux toxines de *Bacillus thuringiensis*

Les insectes sont connus pour leur capacité à développer une résistance aux pesticides. La résistance des insectes observée contre certains insecticides synthétiques est due à la prévalence de rares mutations dans les gènes de résistance chez quelques individus d'insectes. Par conséquent, la sélection de ces gènes porteurs de la résistance a lieu. Les mécanismes responsables de la résistance des insectes constituent une préoccupation importante des scientifiques et sont largement non résolus.

La plus part des cas de résistance répertoriés contre *Bacillus thuringiensis* sous les conditions du laboratoire concernent les lépidoptères (Pardo-Lopez, L., et al., 2013). 3 espèces d'insectes ont montré une résistance aux formulations de *Bt* appliquées sur les champs *Plutella xylostella* (Tabashnik, B. E. 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat, A. F. et al., 2003) et *Plodia interpunctella* (McGaughey, W. H., 1985). Cette résistance peut s'expliquer à différents du cycle d'infection de *Bt* et la littérature nous informe sur quelques exemples de ces différents niveaux de ce mécanisme de résistance : (i) la dégradation du cristal par les protéases, ii) aberrations au niveau de l'activation des protéines du cristal, (iii) des altérations au niveau des récepteurs membranaires ou (iv) la formation et l'insertion du pore membranaire.

Le phénotype de résistance le plus connu contre *Bt* chez les lépidoptères est nommé « modus 1 » et est caractérisé par un niveau très élevé de résistance (500 fois plus élevé comparé à une souche sensible) aux toxines de la famille de Cry1A. Ce phénotype a été trouvé chez au moins une souche des insectes suivants *Plutella xylostella* (la teigne des crucifères), *Heliothis virescens* (la tordeuse des bourgeons de tabac), et *Plodia interpunctella* (La Teigne des fruits secs).

Au fil des années, *Bacillus thuringiensis* a été découvert comme pesticide naturel; mais avec tout type de pesticide le problème de la résistance est presque évident. Nous allons exposer quelques résistances décrites au *Bacillus*

thuringiensis. En 1985, la première preuve de développement de la résistance sur le terrain contre les delta-endotoxines de *Bt* a été publiée. La reconnaissance du potentiel du problème de la résistance au *Bt* est devenue plus critique avec la survenue des rapports de haute résistance aux toxines de *Bt* en 1990 en provenance de Hawaï, de la Floride, et de New York (Neppel, C. C. 2000). En effet, les espèces trouvées moins susceptibles aux toxines de *Bt* ont été *Plutella xylostella*, la teigne des crucifères. La Malaisie a également signalé la résistance aux *Bt* de la teigne des crucifères en 1990 (Chaufaux, J. 1995). Au moment où la résistance au *Bt* a été découverte chez *Plodia interpunctella*, cette résistance a été sélectionnée dans les populations au laboratoire sur un total de treize espèces d'insectes. Onze de ces espèces ont développé une résistance à diverses souches de toxine de *Bt* au laboratoire, mais pas sur le champs: *Ostrinia nubilalis* (la pyrale du maïs), *Heliothis virescens* (la tordeuse des bourgeons de tabac), *Pectinophora gossypiella* (le papillon de ver rose du cotonnier), *Culex quinquefasciatus* (le moustique), *Caudra cautella* (la pyrale des amandes), *Chrysomela scripta* (le *Chrysomelidae* bois du coton), *Spodoptera exigua* (le légionnaire de betterave), *Spodoptera littoralis* (le coton noctuelle égyptien), *Trichoplusia ni* (la pyrale du tigre), *Leptinotarsa decemlineata* (le doryphore de la pomme de terre) et *Aedes aegypti* (moustique causant la fièvre jaune) (Gould et al., 1997 et Liu et al., 1996).

VIII.1. La résistance des insectes au *Bti*

Aucun mécanisme de résistance aux toxines du *Bti* n'a encore été décrit chez les diptères sur les champs des cultures. Au laboratoire, la résistance de *Culex quinquefasciatus* et *Culex pipiens* à *Bti* a été retrouvée (Wirth, MC., et al., 2010) mais cependant, seulement des niveaux de résistance insignifiants ont été atteints contre *Aedes aegypti*. Dans ces deux exemples, et en l'absence de pression sélective des larves, la résistance était instable et a diminué de 50 % après trois générations. La synergie entre Cyt1Aa et les toxines Cry est significativement élevée contre les larves résistantes (Wirth, MC., et al., 2005) en

raison de la caractéristique de Cyt1Aa qui sert de récepteur supplémentaire pour les toxines Cry de *Bti*. L'interaction entre les divers mélanges des δ -endotoxines de *Bti*, en particulier avec Cyt1Aa, permet une utilisation à long terme de *Bti* comme agent la lutte biologique contre les moustiques et les mouches noires. Par conséquent, *Bti* contient un complexe de δ -endotoxines unique qui confère une défense efficace contre le développement de la résistance chez les organismes cibles, et qui promet un contrôle naturel efficace sur de nombreuses années à venir.

Récemment, en 2013, Guillaume Tétreau et al. ont montré un manque de résistance, sur le champ, à *Bti* des moustiques traités pour longtemps avec ce bio-insecticide. Dans cette étude, les auteurs ont développé un nouvel outil: des essais biologiques avec des toxines Cry individuelles de *Bti*, basé sur les observations du phénotype de résistance de souches *Bti* résistantes au laboratoire. Cette procédure très sensible pourrait être utilisée en parallèle avec des essais biologiques utilisant *Bti* pour améliorer le suivi de la susceptibilité des populations de moustiques du champ traitées en continu avec ce bio insecticide (Guillaume Tetreau, R. S., et al., 2013).

VIII.2. Mécanisme de la résistance

De nombreux mécanismes de résistance aux toxines Cry ont été décrits chez les lépidoptères (Morin, S., et al., 2003), les coléoptères (Fabrick, J., et al., 2009) ou les nématodes (Griffitts, J. S., et al., 2001). Les mécanismes utilisés par les insectes pour résister aux effets des toxines de *B. thuringiensis* sont étroitement liées au mode d'action de *Bt*. En effet, les mécanismes de résistance contre *Bt* s'explique par (Figure 17) :

- Modification des récepteurs membranaires auxquels se lient les toxines de *Bt* ou modification du nombre de récepteurs de toxines, ce qui réduit ainsi leurs sites de liaison : En effet, ces modifications impliquent des altérations des structures primaires et/ou secondaires des récepteurs. En 2011, Bravo et al., ont parlé d'une réduction du nombre des récepteurs aux toxines Cry incluant des mutations ou une

perte des récepteurs comme les cadhérines, les phosphatases alcalines (ALP) ou les N-aminopeptidases (APN) (Bravo, A., et al., 2011). En 1991, Ferre et al., ont démontré que la résistance de *Plutella xylostella*, au niveau des champs exploitée au laboratoire, était due à une faible affinité de la toxine Cry1A aux récepteurs de la membrane épithéliales des insectes (Ferré, J., et al., 1991). En outre, la résistance de *Heliothis virescens* et *Helicoverpa armigera* aux toxines Cry1A s'expliquent par des mutations qui réduisent ou détruisent l'expression des récepteurs aux cadhérines (Ferré, J., et al., 2002 et Heckel, D. G. 2012). De plus, les mécanismes de résistance diffèrent selon la nature des toxines Cry (Liu, Y.-B., et al., 2000). En effet, Herrero et al., en 2005, révèlent l'absence de récepteurs N-aminopeptidases (APN) chez *Spodoptera exigua* qui est résistante à la toxine Cry1C (Herrero, S., et al., 2005). Les mécanismes de résistance aux *Bt* n'impliquent pas toujours des mutations aux niveaux des récepteurs. En effet, en 2010, chez *Spodoptera exigua*, les APNs solubles dans la lumière intestinale agissent en tant que compétiteurs des APNs membranaires et empêchent la fixation des toxines Cry. Ces APNs solubles sont présents même en absence d'une intoxication par *Bt* ce qui pourra impliquer le système immunitaire (Hernández-Martínez, P., et al., 2010).

- Un autre mécanisme de résistance implique un transporteur ABC (ATP-binding cassette transporter). Ce mécanisme a été découvert à la suite de l'identification d'une mutation au niveau du gène codant ce transporteur chez une population de *Heliothis virescens* résistante à la toxine Cry1Ac. L'ouverture de la membrane épithéliale par le transporteur ABC favoriserait l'insertion des pores préformés. Toutefois, le rôle exact de ce transporteur ABC n'est pas totalement élucidé bien que son implication ait été démontrée dans la résistance aux *Bt* (Soberón, M., et al., 2012).

- L'implication des protéases joue également un rôle déterminant dans l'infection des insectes suite à leur activation des toxines Cry. Chez des populations *Plodia interpunctella* résistants aux Bt (Oppert, B., et al., 1997), il existe une réduction du taux des protoxines Cry1A hydrolysées ce qui induit une réduction de l'activité protéolytique dans l'intestin des larves rendant moins efficace la digestion des protoxines par la trypsine. Par conséquent, l'absence d'une protéinase majeur de l'intestin moyen de l'insecte, associée au clivage protéolytique, réduit donc l'activation des protoxines de *Bt*, ce qui altère ainsi l'efficacité des toxines.
- La membrane péritrophique (PM) contribue à un manque de sensibilité envers les toxines Cry chez certains insectes. En fait, les toxines Cry peuvent se lier de manière spécifiques et non spécifique à la PM-glycosylée où les protéases associées peuvent ensuite cliver la toxine la rendant inactive (Rees, J. S., et al., 2009).

Enfin, d'autres mécanismes de résistance peuvent également intervenir durant ces étapes du mode d'action comme la modification du comportement alimentaire, les mécanismes de réparation cellulaires impliquant des estérases (Gunning, R. V., et al., 2005, Meunier, L., et al., 2006), ou la modification du système immunitaire (Huffman, D. L., et al., 2004).

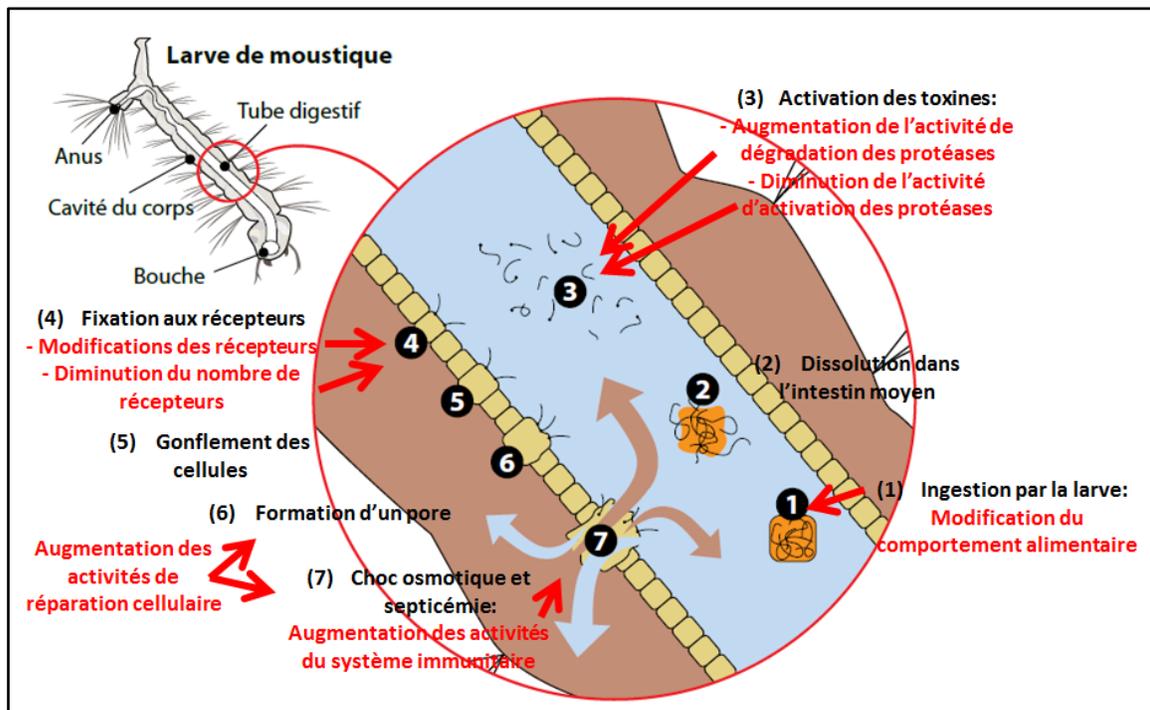


Figure 17 : Mécanismes de la résistance aux toxines selon chaque étape de leur mode d'action dans l'intestin moyen des larves de diptères. En noir, le nom de chaque étape du mode d'action des toxines avec les numéros correspondants sur le schéma. En rouge, les mécanismes de résistance possibles pour chaque étape.

VIII.3. Résistances croisées entre toxines

Les mécanismes de résistance croisée entre les toxines Cry sont complexes et semblent principalement être liés aux mécanismes de résistance impliqués.

De prime abord, lorsque le mécanisme de la résistance repose sur une modification de l'activité des protéases, des résistances croisées sont observées pour de nombreuses toxines car les protéases interviennent dans le clivage non spécifique et l'activation de plusieurs toxines (Gould, F., et al., 1992 et Rukmini, V., et al., 2000). Toutefois, quand la résistance s'explique par une modification du récepteur membranaire de la toxine, les résistances croisées s'établissent

généralement aux toxines très proches. En raison de la forte spécificité entre les toxines et leurs récepteurs, le nombre de résistances croisées liés aux mécanismes de mutation des récepteurs est très faible (Tabashnik, B. E., et al., 1997 ; Jurat-Fuentes, J.L., et al., 2003 ; Griffiths, J.S., et al., 2005 ; Pigott, C. R., et al., 2007). A titre d'exemple, une aminopeptidase N chez le moustique *Anopheles quadrimaculatus* fixe la toxine Cry11B et non la toxine très proche Cry11A (Abdullah, M.A., et al., 2006).

De plus, ce phénomène de résistance croisée au *Bt* a été décrit dans plusieurs études (Tabashnik, B. E., et al., 1994). En fait, une résistance croisée peut se développer contre les toxines de *Bt* qui présentent des similitudes ou des différences dans leur structure et leur activité. Dans le cas de *Bti*, la résistance croisée a été observée au niveau des souches résistantes; par exemple, une souche résistante à Cry11A a montré une résistance croisée importante à Cry4A + Cry4B, et *vice versa*. Une résistance extrêmement faible a été obtenue pour le mélange des toxines (Cry4A, Cry4B, cry11A et Cyt1Aa) mais les niveaux modérés de résistance croisée ont été détectés envers les toxines Cry individuelles ou combinées (Georghiou, G. P., et al., 1997).

Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse reposait sur 3 objectifs décrits ci-dessous. Chacun de ces objectifs constitue un chapitre de la thèse.

***Objectif 1 :** Bacterial diversity of needle and broadleaf soils from two different geographical areas, Lebanon and Austria.

***Objectif 2 :** Identification and characterization of a new Lebanese *Bacillus thuringiensis* strain, highly toxic against Diptera

***Objectif 3 :** Identification and characterization of a new non cytolytic *Bacillus thuringiensis* strain, H3, from Lebanese soil with insecticidal activity against different mosquito larvae.

Afin de répondre à ces objectifs, j'ai criblé différentes souches de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol Libanais en adoptant tout au long de ces travaux la souche de référence mondiale *Bti* : La souche *Bti* (*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strain 1884 (Singer et Margalit) identifiée par Huguette de Barjac de l'Institut Pasteur en 1979. La souche a le code initial 1884 et le n° de la collection des Bactéries entomopathogènes T14 0007.

Chapitre 1

Etude de la diversité bactérienne des sols de chênes et de pins Libanais et Autrichiens

Chapitre 1: Etude de la diversité bactérienne des sols de chênes et de pins Libanais et Autrichiens

I. Présentation de l'étude

La microflore du sol, remplit des fonctions essentielles comme la décomposition de la matière organique, le recyclage du carbone et des nutriments minéraux (azote, phosphore, potassium) dans le sol, la décontamination des sols pollués et la lutte biologique. Le nombre et l'abondance des espèces varient en fonction du milieu, des caractéristiques du sol et de son usage, de la géomorphologie et du climat (Buckley, D. H., et al., 2002 et Castro, H. F., et al., 2010). La variété des habitats écologiques va dépendre du type de sol notamment à cause de son pouvoir tampon et de ses propriétés chimiques. La richesse bactérienne peut être modifiée par les perturbations naturelles ou anthropiques et par le niveau de ces perturbations auxquelles sont soumis les écosystèmes (Daniel, R. 2005). Etudier la diversité des sols est un enjeu essentiel puisque le sol est considéré un des systèmes le plus complexe étudié. Le sol se compose de substances organiques et inorganiques, de composés solides, liquides et gazeux. Il renferme de grandes quantités d'organismes vivants et constitue le milieu soutenant la vie dans son acception la plus large. Mon choix s'est porté d'une part sur deux végétations différentes : forêts de chênes et de pins car ce sont les deux types de végétation les plus répandus au Liban et constituent un réservoir abondant de microorganismes d'intérêt écologique et d'autre part comparer cette diversité dans deux zones géographiques différentes (Liban et Autriche).

Nous débuterons la première partie résultats de ce manuscrit par une caractérisation de la diversité bactérienne des sols de chênes et de pins Libanais par comparaison aux mêmes types de sols Autrichiens. L'étude de leur diversité,

leur richesse et leur abondance en communautés bactériennes est étudiée en utilisant l'indice de Shannon et les paramètres de diversité alpha et bêta (Saeki, Y., et al., 2014). Les principaux phyla bactériens colonisant les sols sont également déterminés et se révèlent spécifiques à chaque type de végétation et à chaque climat. Le phylum des *Firmicutes* a été plus particulièrement étudié : il a été retrouvé de façon plus abondante dans les sols de chênes par rapport aux sols de pins et ceci dans les deux pays. De plus, la répartition des classes et des genres de ce phylum ont été aussi déterminés pour chaque type de sols. Le genre *Bacillus* de la classe des *Bacilli* a été trouvé comme prédominant dans ces sols. Dans le phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli* comprend les bactéries que l'on retrouve dans de nombreux domaines comme l'agriculture, l'horticulture, l'industrie et médical. A titre d'exemple, la bactérie *Bacillus thuringiensis* est connue pour son activité insecticide contre les larves de différents ordres d'insectes. Une étude plus approfondie de ces sols est nécessaire en menant une analyse combinée de l'ADN et de l'ARN permettant ainsi d'étudier l'expression des protéines dans le sol. Ainsi, les liens entre la diversité bactérienne et les fonctionnalités des sols seront mieux définis.

II. Contribution scientifique sous forme d'article

Article 1: Bacterial diversity of needle and broadleaf soils from two different geographical areas, Lebanon and Austria.

Article 1: Bacterial diversity of needle and broadleaf soils from two different geographical areas, Lebanon and Austria

Abstract

Studies of microbial ecology, diversity, and evolution are essential in order to understand the soils functioning and the interactions of micro-organism in soils under different climate and vegetation. Particularly, bacterial communities interact with each other and with their associated plants to suppress soil-borne plant diseases, to promote plant growth... and play vitals roles in many ecological processes (e.g. soil structure formation, recycling...). We were interested in examining the bacterial diversity of two different forest soils broadleaf and needle from two different geographical areas: Lebanon and Austria. Using molecular methods based on the 16S rRNA gene and biodiversity indices, we studied the bacterial communities' composition of these soils. Among the characterized phylum, the *Firmicutes* was more investigated due to its richness in bacteria involved in bio control. Our results showed that the needle soils are more diverse than the broadleaf soils in Lebanon contrary to the observed data in Austrian soils. Each soil was well characterized for its bacterial community composition. Even though, the *Firmicutes* phylum was identified at a low percentage in the different soils, its abundance was studied and showed to be associated to the vegetation types independently of geographical areas. In addition, the bacterial diversity of *Firmicutes* phylum was more explored at class and genus levels.

Keywords: diversity, bacterial communities, broadleaf, needle, Lebanon, Austria, climate, *Firmicutes*, 16S rRNA gene.

1. Introduction

Microorganisms represent a large unexplored reservoir of genetic diversity. Searching and understanding this unexplored biomass diversity is a high important issue in microbial ecology. The biodiversity of soil come first from its origin, its conservation and its involvements in the ecosystems functioning in time and space (Tarlera, S., et al., 2008). In 2009, Singh et al. demonstrated that the soils' microorganisms are highly diverse and constitute about 60 % of the Earth's biomass (Singh, B. K., et al., 2009). In 1996, Torsvik et al. estimated that soils and sediments gather approximately 10,000 different bacterial species (Torsvik, V., et al., 1996). They play vital roles in many ecological processes (soil structure formation, decomposition of organic matter and xenobiotics, and recycling of essential elements (e.g., carbon, nitrogen, phosphorous, and sulfur)). They are crucial in suppressing soil-borne plant diseases, promoting plant growth, in affecting vegetation and regulation of plant communities (Garbeva, P., et al., 2004). Microbial ecologists have generally centered their studies on two goals: (i) microbial diversity, including the isolation, identification and quantification of micro-organisms in various habitats; and (ii) microbial activity (Amann, R.I., et al., 1995 and Banfield, J.F., et al., 2005). Another important point concerns the study of bacterial diversity: for instance, biological control is a phenomenon occurring naturally and resulting from ecological relationships among species. Due to human impact on biosphere equilibrium, the development of effective biological control agents is one of the major challenges of the 21st century to ensure a sustainable environment. In this framework, microorganisms from soil samples have shown great potential of involvement in the development of new strategies to support the environment equilibrium.

Ever-larger libraries of 16S rDNA clones have been created as a result of several studies conducted on bacterial diversity of soils (Dunbar, J., et al., 1999). Accordingly, suitable methods are required to define operational taxonomic units (OTUs), describe and compare the highly diverse soils communities. A range of diversity indices (for example, the Shannon index, the evenness indices and Simpson's dominance index) have been assigned to evaluate bacterial

communities and how they are affected by environmental changes and disturbances (Cho, J.-C., et al., 2000 and McCaig, A.E., et al., 1999). The interactions of microorganisms with biotic (plants, bacteria-fungi interactions...) and abiotic factors (quantity and quality of litter inputs, temperature, moisture, pH...) are also fundamental (Buckley, D. H., et al., 2002).

Studies on plant diversity showed that soil microbial communities and the ecosystem processes are affected by plant species richness (Zak, D. R., et al., 2003). In fact, greater plant diversity leads to a significant increase of microbial community biomass, respiration, and fungal abundance. Geographical localization and climate could interact and affect this diversity because they will impact both abiotic and biotic factors in ecosystems (Castro, H. F., et al., 2010; Green, J. L., et al., 2004; Fulthorpe, R. R., et al., 1998 and Cho, J. C., et al., 2000). The different climates affect plant growth (Norby, R. J., et al., 2001 and Norby, R. J., et al., 2004), plant community composition (Bakkenes, M., et al., 2002 and Lloret, F., et al., 2009), soil processes (Emmett, B. A., et al., 2004; Franklin, O., et al., 2009 and Janssen, P. H. 2006) and microbial biomass (Haase, S., et al., 2008; Kandeler, E., et al., 2006; Zak, D. R., et al., 2000 and Zak, D. R., et al., 1996).

Since the most abundant forests in Lebanon under Mediterranean climate are broad leaves and needle leaves: 31.2 % of coniferous forest (including needles) and 56.6 % of deciduous forests (including broadleaves). We were interested in studying how entire soil bacterial communities and particularly *Firmicutes*' communities are structured among broadleaf and needle soils from two different geographical areas (Lebanon and Austria) that are under two different climates zones. After sequencing the 16S rRNA gene using Illumina's MiSeq, the Shannon index, the OTUs and the rarefaction curve were explored. Afterwards, the taxonomic composition at phylum class and genus levels was conducted. The *Firmicutes* communities were further analyzed by SSCP fingerprinting and qRT-PCR.

2. Materials and Methods

Samples description

The Broadleaf (B) and the needle (N) soils were chosen from two different sites: Lebanon and Austria. Four samples were collected from each Lebanese soil and named: LBL for Lebanon Broadleaf LBL1, LBL2, LBL3, LBL4, and LNL for Lebanon needle LNL1, LNL2, LNL3 and LNL4. Four samples were collected from each Austrian soil and similarly named: ABL1, ABL2, ABL3, ABL4, ANL1, ANL2, ANL3 and ANL4. All the samples were taken during winter time in each country, at a depth of 10-15 cm for the Austrian samples (pH= 6) and 5 cm for the Lebanese samples (pH= 6.9) (Table 1).

Table 1: Names, origins, vegetation, types of soils, climate zone, types of plant community of samples used in this study (N/A: Not available).

Sample name	Origin	Vegetation	Type of soil	Climate zone	Types of plant community		
					Dominant species of plant	Companion species of plant (tree/shrub)	Herbal species
LBL	Lebanon	Broad-leafed	Limestone	SUPRAMEDITERRANEAN 1000-1500m	<i>Quercus calliprinos</i>	<i>Ostrya carpinifolia</i> ; <i>Fraxinus ornus</i> ; <i>Fraxinus syriacum</i> ; <i>Laurus nobilis</i> ; <i>Phillyrea latifolia</i> ; <i>Pistacia lentiscus</i> ; <i>Rhamnus alaternus</i> ; <i>Rhamnus punctata</i> ; <i>Styrax officinalis</i> ; <i>Juglans regia</i> ; <i>Populus nigra</i> ; <i>Calicotome villosa</i> ; <i>Origanum syriacum</i> ; <i>Teucrium divaricatum</i> ; <i>Stachys distans</i> ; <i>Capparis spinosa</i> .	<i>Brachypodium pinnatum</i> ; <i>Melica angustifolia</i> ; <i>Crepis syriaca</i>
LNL	Lebanon	Needle-leafed	Sandstone	EUMEDITERRANEAN 500-1000m	<i>Pinus pinea</i> ; <i>Pinus brutia</i> ; <i>Quercus infectoria</i>	<i>Juniperus oxycedrus</i> ; <i>Lavandula stoechas</i> ; <i>Cistus salvifolius</i> ; <i>Quercus ithaburensis</i> ; <i>Quercus brantii</i> .	<i>Briza maxima</i> ; <i>Phleum montanum</i> ; <i>Anthoxanthum odoratum</i> ; <i>Tuberaria guttata</i> ; <i>Aira elegans</i> ; <i>Trifolium medusaeum</i> ; <i>Ornithogalum neurostegium</i> ; <i>Ranunculus paludosus</i> ; <i>Anthemis tinctoria</i>
ABL	Austria	Broad-leafed	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ANL	Austria	Needle-leafed	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Sequencing and taxonomic study

→ DNA extraction and Illumina's MiSeq Sequencing

The total microorganism DNA was extracted following the protocol of the kit "FastDNA® SPIN Kit for Soil" and it was stored at -20 °C for PCR amplification analysis. To explore the bacterial communities' composition of soil samples, 16S rRNA gene amplicon sequencing using Illumina's MiSeq v2 platform was performed. The hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene was amplified according to the protocol described by Caporaso et al. in 2011 using the region specific primer pair 515f and 806r that included Illumina cell flow adaptors and sample-specific barcodes (Caporaso, J. G., et al., 2011). The PCR reaction mixture (30 µL) contained 1 × Taq&Go (MP Biomedicals, Illkirch, France), 0.2 mM of each primer, 1.5 µM PNA mix and 1 µL template DNA. PCR was carried out as follows: 96°C for 5 min, 30 cycles of 96°C for 1 min, 78°C for 5 sec PNA annealing, 54°C for 1 min primer annealing, 74°C for 1 min, and final elongation at 74°C for 10 min). PCR products were purified by employing the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). After spectrophotometric measurement of DNA concentrations (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) equimolar aliquots of all samples were combined for amplicon sequencing using Illumina MiSeq v2 (250 bp paired end) conducted by LGC Genomics, Berlin, Germany. Raw sequencing data preparation included demultiplexing (CASAVA data analysis software, Illumina), clipping of sequencing adapters (TruSeq, Illumina), joining read pairs (FLASH 1.2.4, Magoč and Salzberg 2011) with a minimum overlap of 10 bases and maximum mismatch density of 0.25, and sorting according to sample-specific barcodes (Magoč, T., et al., 2011). Resulting reads were quality (Phred score \geq 20) and length filtered (290 - 300 bp) using scripts provided by the open source software package QIIME 1.9.0 (<http://qiime.sourceforge.net>). Chimeric sequences were discarded after de novo detection based on USEARCH 6.1 (Edgar, R. C., et al., 2011). UCLUST de novo algorithm using default parameters was applied to cluster remaining reads to operational taxonomic units (OTUs) at 97 % similarity (Edgar, R. C. 2010) followed by taxonomic assignment of

representative sequences by The Ribosomal Database Project (RDP) naïve Bayesian rRNA classifier (Wang, Q., et al., 2007) based on the reference database Greengenes release gg_13_8_99 (DeSantis, T. Z., et al., 2006). Prior to further analysis all reads assigned to plant plastids (chloroplasts and mitochondria) were discarded from datasets. The number of sequences obtained for each sample was normalized to the lowest number of read counts by randomly selecting subsets of sequences by a custom Perl script (10-times random sampling followed by subset formation). Richness estimates and diversity indices were calculated for normalized data sets, using default settings provide by the software package QIIME. To compute the rarefaction curve, each rarefaction curve was calculated by bootstrapping the donors and the reads from the taxonomic distribution of each soil, based on the OTU-based taxonomic unit distributions for each soil samples. For analyzing bacterial diversity in a community, the larger the number of individuals was sampled and the more species will be found. Usually, rarefaction curves were created by randomly re-sampling the pool of N samples multiple times and then plotting the average number of species found in each sample (1,2, ... N). Therefore, rarefaction generate the expected number of species in a small collection of n individuals (or n samples) drawn at random from the large pool of N samples (Gotelli, N. J., et al., 2001). To compute the median and confidence intervals of species richness, Smax, each bootstrapped rarefaction curve was curve fit to estimate its saturation point. Thus, each rarefaction curve represented an alternative sequence ordering of samples being selected with replacement from the sample pool. In fact, the variability in each individual's sample habitat species richness could significantly control the shape of the rarefaction curve depending on the order of when each donor was encountered.

The Shannon index values increase as both the richness and the evenness of the community increase. It was calculated according to this formula:

In the Shannon index, p is the proportion (n/N) of individuals of one particular

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \ln p_i$$

species found (n) divided by the total number of individuals found (N), \ln is the neperien log, Σ is the sum of the calculations, and s is the number of species. Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed to assess the beta diversity based on the calculation of the unweighted normalized UniFrac distance matrix (Lozupone, C., et al., 2005).

Quantitative real time analysis by qRT-PCR of the *Firmicutes* abundance in soils

The qRT-PCR was performed on the DNA previously extracted using the following products: sterile water, Kapa SYBR Fast, primer BACr 833P (10 pmol/ μ L), primer BLS342f (10 pmol/ μ L) and DNA. The program of the Thermocycler Rotor-Gene 6000 Corbett Research®) was the following: 95°C during 5 min (denaturation), 95°C during 45 sec, 56°C during 30 sec, 72°C during 30 sec (acquisition of cycle A ([Green])(40 cycles) and fusion (72-95°C), 95°C few sec, 56°C during 5 sec, fusion at 72°C.

Single Strand Conformation Polmorphism-16S rDNA-*Firmicutes*

On the DNA extracted from soils, a first PCR reaction was conducted using the following universal primers which are known to recognize the sequence of the 16S gene (1500 bp) of all bacteria (27f 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492r 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). The master mix for this first PCR contained (5x Taq&Go, Qbiogene, 25 mM MgCl₂, 1.5 mM, primer 27f (5 pmol/ μ L), primer 1492r (5 pmol/ μ L) and sterile water). On the PCR products of this first PCR, a second PCR (Nested PCR) (same conditions as the first PCR) was performed using couple of primers known to recognize only one part of the 16S gene of the *Firmicutes* (491 bp) (BLS342f 5'-CAG CAG TAG GGA ATC TTC-3', BACr833P 5'-CTA ACA CTT AGC ACT CAT-3').

The products obtained after this second PCR were purified using the kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega) and digested by λ -exonuclease at 37°C during 60 min. The resulting products were migrated on a

MDE-Gel using TGGE MAXI, System Controller, Biometra® during 26 h at 26°C at 400 V. The gel was revealed by silver nitrate, scanned using Epson perfection 4990 Photo, Japan, and analyzed by Gel Compar II, version 5.1 (Applied Maths, Belgium). Profiles generated were analyzed by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with arithmetic Average).

3. Results and discussion

3.1. OTU analysis on broadleaf and needle soils samples

The measure of biodiversity combines richness and evenness across species. A high biodiversity reflect a healthy ecosystem (Breure, A. M. 2004). In general diverse communities are characterized by an increased stability, increased productivity, and resistance to many disturbances. The data gathered in table 2 results from the analysis that was performed using the alpha diversity knowing that it reflects richness and evenness of individuals within a habitat unit. Moreover, the Chao 1 estimator evaluates the estimated true species diversity of a sample (Chao, A. 1984 and Colwell, R. K., et al., 1994). In fact, if a community is being sampled, and rare species (singletons) are still being discovered, there is likely still more rare species not found. However, as soon as all species have been recovered at least twice (doubletons), there is likely no more species to be studied. In our study, four replicates were analyzed. The Shannon index value (12.2) reflects that LNL soils are more diverse, rich and even than the others.

Table 2. Alpha diversity measures of at the normalized depth of 3687 reads.
The values represent the average from four replicates each sample

Sample name	Sequence number (normalized)	Observed number of OTUs	Estimated number of OTUs (CHAOT1)	% coverage	Shannon index
LBL	3687	2058	5883	35.0	11.4
LNL	3687	2430	7385	32.9	12.2
ABL	3687	2190	6183	35.4	11.4
ANL	3687	2235	6167	36.2	11.2

In order to compare the richness observed in our different samples, we collected the number of OTUs, the average of the observed OTUs was calculated and the rarefaction curve was generated at 97 % similarity box plot. It showed that a number of reads were sampled (Fig 1) and consequently the number of occurrences of species reflects the sampling intensity. The rarefaction curves grew rapidly at first, where the most common species were found, the curve became flatter to the right which indicates that a reasonable number of individual samples have been taken that likely yield to an additional few species.

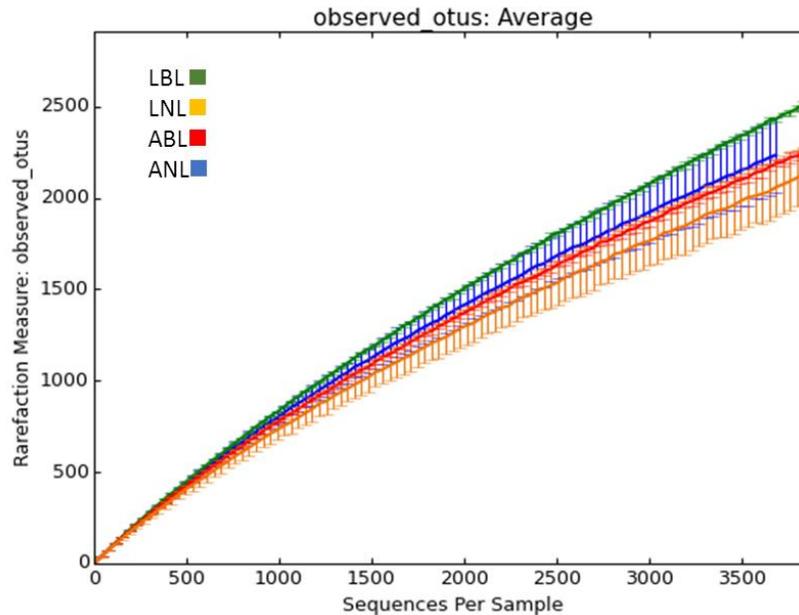


Fig 1. Rarefaction curves indicate the mean number of observed OTUs at the normalized depth of 3687 reads

3.2. Taxonomic composition at the phylum level

Early investigations of soil bacterial diversity focused on what could be promptly cultured from soils. To characterize bacterial communities of soils, the study must start by a general description of bacterial phyla existing in each soil. In fact, as we can see in figure 2, the LBL soil present two major phyla *Cyanobacteria* and *Crenarchaeota* particularly dominant in LBL soil in comparison to the other soil samples. In fact, dinitrogen fixation is a fundamental metabolic process of *Cyanobacteria* (WHO, 1999) and *Crenarchaeota* are *Archaea* and sulfur-dependent extremophiles. In LNL soil, the two phyla *Acidobacteria* and *Bacteroidetes* were the characteristics phylum of this soil because they didn't exist in the same abundance in the other samples. *Acidobacteria* phylum is known to be very abundant in soil (Dunbar, J., et al., 1999 and Chan, O. C., et al., 2006) and highly diverse (Jones, R. T., et al., 2009). Its metabolic capability is well investigated. Ward et al., suggested that bacteria belonging to this phylum may be oligotrophs, metabolize simple and

complex carbon sources (Ward, N. L., et al., 2009), tolerate fluctuations in soil moisture and able to reduce nitrite and nitrate without interfering in denitrification or nitrogen fixation processes. On another hand, *Bacteroidetes* are also involved in aerobic degradation of complex organic molecules such as starch, proteins, cellulose, and chitin. In fact, they may play a major role in the degradation of plant material in soil. It has been demonstrated that *Bacteroidetes* are copiotrophs, because their relative abundance in soil depends on the presence of carbon and may increase following the addition of carbon (Eilers, K. G., et al., 2010). Concerning the ABL soil, we found two particular characteristic phyla *Verrucomicrobia* and *Nitrospirae* whose abundances are notable. First of all, the *Verrucomicrobia* are ubiquitous in soil and may be oligotrophs, but their ecology is not well defined yet. *Nitrospirae* are ubiquitous in soil environments and are supposed to play a major role in the biological nitrogen cycle (Martínez-Alonso, M., et al., 2010). Finally in ANL soil, the phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria* are dominant. We know that *Proteobacteria* phylum is a metabolically diverse group of organisms, in which only four members α -, β -, γ -, and δ -*Proteobacteria*, are found in soil. In fact, it has been reported that the α , β , and γ members are considered to be copiotrophs, which means they are more prevalent in the localization where resource availability is high for example in rhizosphere soils (Fierer, N., et al., 2007). In fact, the relative abundances of β - and γ -*Proteobacteria* increased with an addition of low-molecular-weight carbon in soil (Goldfarb, K. C., et al., 2011). However, the relative abundance of α -, β -, and δ -*Proteobacteria* is improved with the addition of recalcitrant carbon, such as cellulose, lignin, or tannin-protein in soils (Goldfarb, K. C., et al. 2011). The *Actinobacteria* are abundant in soil and their relative abundance increased following addition of labile carbon sources and with an increasing of soil pH (Lauber, C. L., et al., 2009 and Goldfarb, K. C., et al., 2011). They are known to be metabolically diverse aerobic heterotrophs. Following the phyla distribution within the different soils, we were interested in investigating particularly in the *Firmicutes* phylum. Gram positive bacteria fall into two phylogenetic groups, *Actinobacteria* and *Firmicutes*. *Actinobacteria* phylum exists in all analyzed soils

but in different abundances while *Firmicutes* are mainly found in Lebanese broadleaf soil (LBL). The *Firmicutes* phylum includes the Gram positive endospore forming bacteria such as the genus *Bacillus* that is well known to have a promising industrial application especially in pest control. Thus, we further characterized this phylum (All percentage data are listed in “Annexe 1”).

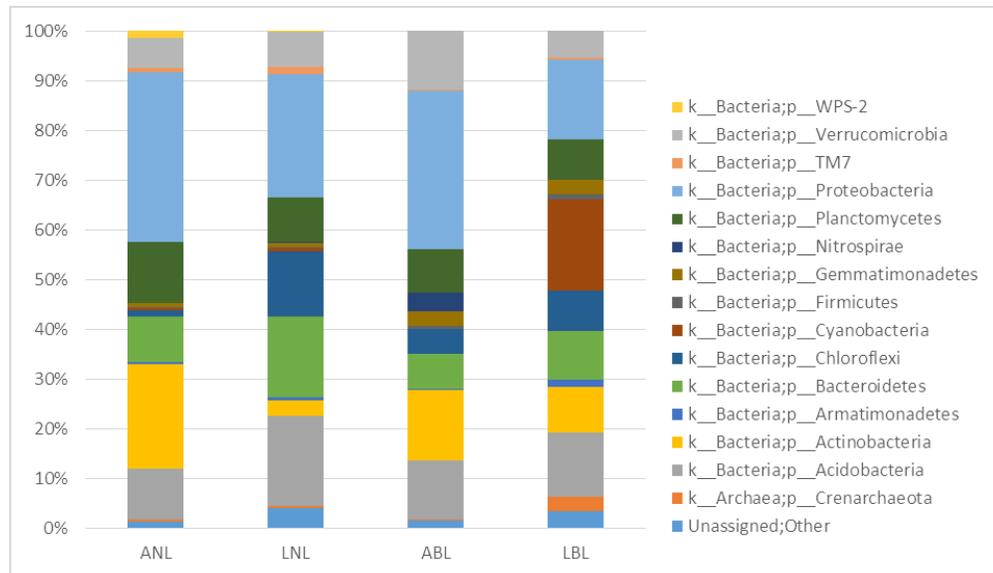


Fig 2. Average taxonomic composition at Phylum level. Only taxa >1 % were considered.

3.3. SSCP analysis of *Firmicutes* communities in soils

Bacterial diversity found in the four soils is broad and thus, different methods must be developed to study diversity at different levels. Microbial diversity can be measured using various approaches: phylogenetic diversity, species diversity, genotype diversity, and gene diversity. These techniques, quantitatively and qualitatively, expand our understanding of the biodiversity in soils. Moreover, above the species level, bacterial diversity is generally quantified using an evolutionary marker known as the common chronometer 16S ribosomal RNA subunit. Below the species level, population genetic parameters such as

gene diversity and genotype diversity are used to describe the microbial diversity (Xu, J. 2006).

The total DNA was directly extracted and isolated from cells in soil. Following the extraction of the DNA, 16S rDNA genes were amplified from total community DNA using the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. The primers used in this study selected different microbial groups at the *Firmicutes* phylum level. In order to compare the biodiversity of the *Firmicutes* communities in Lebanese and Austrian broadleaf and needle soils, a first approach was to analyze by SSCP the profiles of the bands obtained following amplification of a 16S rDNA gene region.

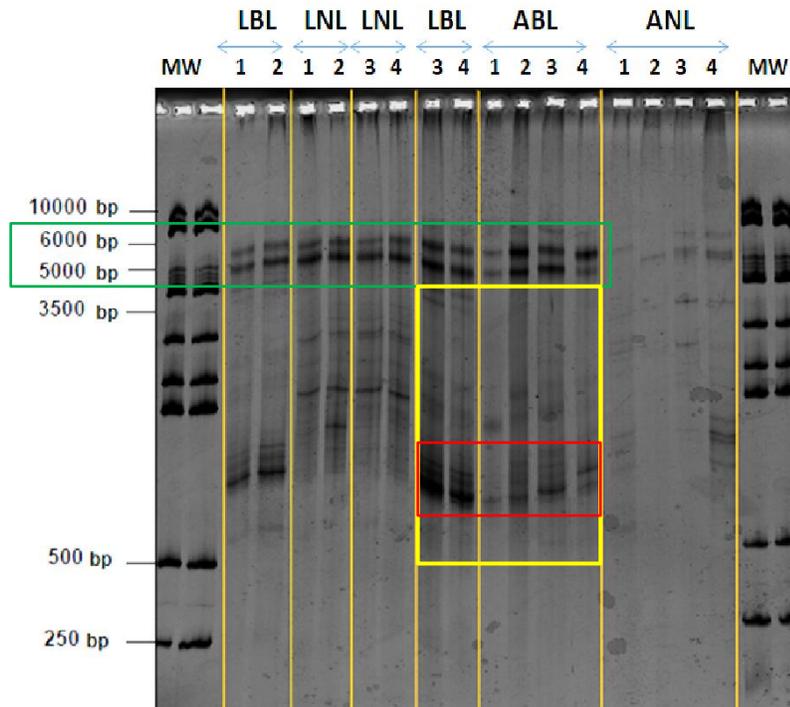


Fig 3. Profiles of SSCP *Firmicutes* communities of Lebanese and Austrian broadleaf and needle soils. **MW:** DNA Molecular weight (250 bp-10 kb), Four samples of Lebanese broadleaf soils (LBL 1,2,3,4), four samples of Lebanese needle soils (LNL 1,2,3,4), four samples of Austrian broadleaf soils (ABL 1,2,3,4) and four samples of Austrian needle soils (ANL 1,2,3,4) were studied.

In this SSCP study, the investigation of the 16S rDNA, included three regions (part of the V3 region, the V4 region and part of the V5 region) that were targeted by a pair of specific primers to *Firmicutes* (BLS342F / BACr833^P). This diversity is expressed by the variety of bands obtained on the gel; each band represents a bacterial species. In fact, the profiles obtained in figure 3 shared three dominant common bands of high molecular weight (5000-6000 bp), detected at the beginning of the gel (green square). This shows that despite the difference in vegetation and sampling, common microorganisms are present in the two types of soils under biotic and abiotic conditions. Moreover, comparing the two broadleaf soils profiles LBL and ABL (yellow square), based on the presence and the absence of bands, different patterns were obtained for LNL and ANL soils. Consequently, we suggest the presence of *Firmicutes* diversity which is specific to each type of vegetation. The four samples of Lebanese broadleaf have three bands that do not exist in 4 samples of Austrian broadleaf. Similarly, 4 samples of Lebanese needle soils have 4 bands which few of them appear at the same levels in ANL. This comparative approach shows that the biodiversity of *Firmicutes* associated with the same type of vegetation varies depending on sampling sites. However, if the comparison was adamant between the two vegetation types, regardless of the place, we note that all broadleaf samples share three bands with low molecular weight (around 800 bp) absent in the needle samples which conversely share some bands in common (red square). At this level, we can conclude that broadleaf samples are more diverse than needle samples and this in both countries.

Many authors highlighted the value of this fingerprint technique. In fact, the succession of bacterial communities was measured by this SSCP technique (Peters, S., et al., 2000) as well as the rhizosphere communities (Schmalenberger, A., et al., 2001)... In our case, we will only discuss the characterization of bacterial communities in soils using the SSCP fingerprint. Only the dominant populations are represented because a single band can hide multiple bands corresponding to more than one specie. Consequently, these results underestimate the bacterial diversity (Heuer, H., et al., 2001). The same

isolate can reveal different bands due to the presence of multiple copies of an operon in a single specie. Indeed, the fingerprinting methods depend on the primer used. Heuer et al. reported that 14 different regions (A, B, C, D, E, F, V1–V3 and V5–V9) of the 16S rDNA have been studied to produce fingerprints of bacterial communities; and V6 region was the best one for optimal analysis of soil bacterial communities (Heuer, H., et al., 2001).

From this molecular analysis of soils using the 16S rDNA technology, we found that each soil may contain different *Firmicutes* communities playing functional roles in soil specific processes. Moreover, this molecular tool allowed to access bacterial species that could be uncultivable *in vitro* and to study the ecology of soil, taking into consideration all contaminants: organic matter, humic acids, metals, aromatic compounds...

From community profiles of *Firmicutes* generated by SSCP, the UPGMA dendrogram below was obtained by GelCompar II software using the Pearson correlation coefficient. This dendrogram (Fig 4) shows correlations which confirm the relationship between Lebanese and Austrian broadleaf soils and between Lebanese and Austrian needle soils. These results show a clear specificity of *Firmicutes* communities regarding vegetation and a minimal divergence between the same vegetation according to the geography sites. There is also a correlation between the vegetation and the *Firmicutes* present in their soils. Indeed, bacterial communities are specific to vegetation that requires a specific soil; the vegetation influences their soil, which is in a continuous dynamic depending on its location and thus determining its microflora.

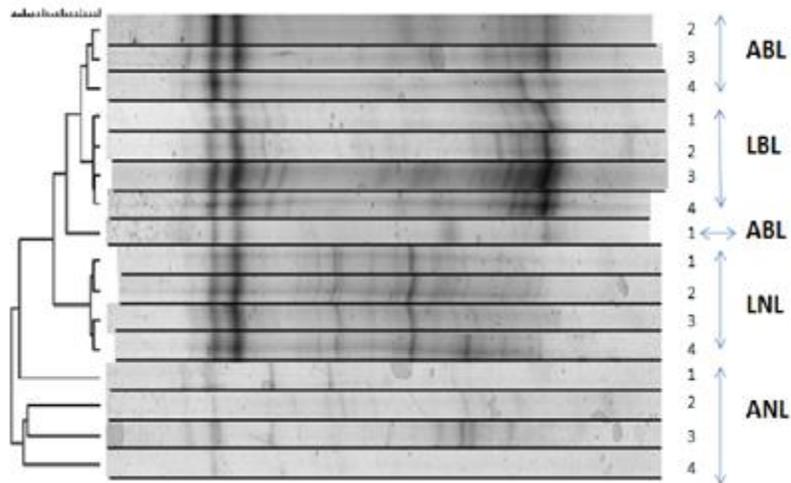


Fig 4. UPGMA dendrogram of Firmicutes communities in broadleaf and needle Lebanese and Austrian soils. Four samples of Lebanese broadleaf soils (LBL 1,2,3,4), four samples of Lebanese needle soils (LNL 1,2,3,4), four samples of Austrian broadleaf soils (ABL 1,2,3,4) and four samples of Austrian needle soils (ANL 1,2,3,4) were studied.

3.4. Quantitative analysis of the *Firmicutes* phylum in the different soils samples

In order to quantify the bacterial community in the soil samples, a quantitative real-time PCR, targeting the same regions of the 16S rDNA gene than SSCP was performed.

The following histograms (Fig 5) report the 16S gene copy number / g of soil for the four soil samples. The *Firmicutes* were more abundant in broadleaf soils compared to needle soils in both countries where communities of *Firmicutes* recorded just 6.48 gene copy number / g of soil in ABL soil, while needle ANL reach approximately 5.6 gene copy number / g of soil. The difference is about one log unit, thus 10 times more *Firmicutes* communities in ABL compared to ANL. Both soils encountered roughly the same difference within the Lebanese soil samples. Regardless the countries, *Firmicutes* are more abundant in broadleaf soils than in needle soils. This was also evidenced by SSCP patterns showing that broadleaf soils present the largest number of bands. Following this correlation between the qualitative and quantitative results, we suggest that

broadleaf soils contain more species than needle soils and consequently we will have more chance to find strains of ecological interest in broadleaf soils. In addition, a significant difference in terms of abundance was observed when comparing the same vegetation between the two countries: *Firmicutes* communities were more abundant in Lebanese needle soils compared to ANL (6 gene copy number / g of LNL soil against 5.6 gene copy number / g of ANL soil). Therefore, the Lebanese needle soil would be more interesting to be explored than the Austrian needle soil. However, concerning broadleaf soils LBL and ABL, no significant difference in terms of abundance was noticed.

These results could be interpreted according to different factors: 1) The nature of the vegetation which influences the microbial ecology of soils; 2) The physicochemical characteristics of the soil: pH (eg wealth of soils in *Acidobacteria* and *Streptomyces*)...; 3) The presence of several different habitats in the soil microenvironment; 4) The soil microclimate; 5) The plantations conditions; 6) Soil type; 7) Climate...

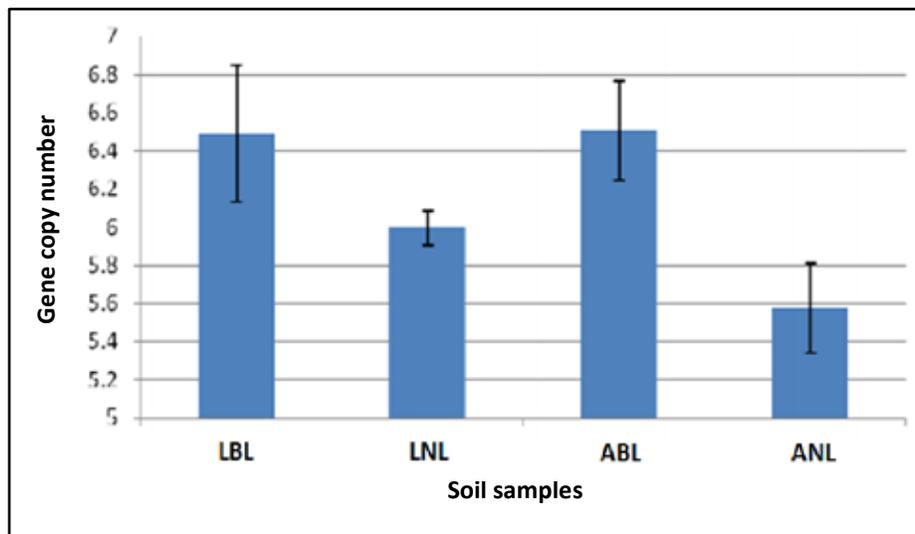


Fig 5. Histograms showing the gene copy number / g of soil for the specific region of the 16S rDNA *Firmicutes* gene amplified by qRT-PCR (Logarithmic scale). LBL: Lebanese broadleaf soils, LNL: Lebanese needle soils, ABL: Austrian broadleaf soils and ANL: Austrian needle soils.

Therefore, the determination of the microbial community in soil is of particular interest because it reflects the functions of soils. However, the molecular approach does not seem sufficient for a complete understanding of soil functioning. In this concern, it is central to understand the relationship between communities' structure and functions in microhabitats. In another word, we must study the spatial distribution of soils microbial species and their spatial and temporal links with the various microbes *in situ* (e.g. interactions between bacteria and fungi). For this reason, some high-resolution techniques must be applied to soil preparations. For example, ultracytochemical methods have been successfully useful to locate microbial cells in the soil matrix without giving any taxonomic characterization (Foster, R. C., et al., 1994 and Assmus, B., et al., 1995, 1997).

3.5. Taxonomic composition at class level

Further investigations were undertaken in analyzing soils samples at the class level in order to determine the class abundances in each soil within the *Firmicutes* phylum. According to the results of figure 6, the class of *Bacilli*, is more abundant in LBL than in ABL. These observations are in accordance with the results obtained from the quantitative real time PCR analysis. The abundance of a class is relative to the overall composition of each soil. *Bacilli* were found in LNL and ANL soils but they were less abundant compared to the other existing class of bacteria.

Firmicutes phylum is composed of four classes: *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli* and *Togobacteria*. *Clostrida* and *Bacilli* are endospore forming bacteria, which are of particular industrial interest in formulations of bio control agents. In these soils, only the *Bacilli* were found; they are known to include two orders, *Bacillales* and *Lactobacillales*, which comprised several well-known pathogens such as *Bacillus anthracis* (the cause of anthrax) and *Bacillus thuringiensis*. This last is a worldwide bio control agent, known to control pests such as mosquito

borne epidemic diseases (controlled by *Bacillus thuringiensis israelensis*) (Sekar, V., et al., 1990).

Moreover, besides the *Bacilli* founded in the LBL soil, the classes *Synechococcophycidae*, *Oscillatoriophycidae*, *Rubrobacteria*, *Chloracidobacteria*, *Thaumarchaeota* were the most abundant compared to the other soils. In the ABL soils, the classes of *Spartobacteria* and *Sphingobacteriia* were the most abundant. The major classes of bacteria founded in ANL soil are *Alphaproteobacteria* followed by *Actinobacteria*, *Thermoleophilia* and *Acidobacteriia*. Finally, the class of *Acidobacteria-6* and its abundance was characteristic of the LNL soil.

The same classes of bacteria are found in the soils in different abundance percentages; however, depending on the type of vegetation (broadleaf or needle) and on the geography climate, each soil is characterized by a particular bacterial class. For example, the *Spartobacteria* which exists in high abundance in ABL is known to be found in subsurface soil horizons at 10–50 cm depth (Bergmann, G. T., et al., 2011).

This divergence in microbial communities' compositions is affected by vegetation type and soil topographies (Su, Y., et al., 2006), weather conditions, humidity and sea level height (Davis, C. A., et al., 2006 and Kurcheva, G. F. 1972). In 2002 and 2012, a study explained that broadleaf forestation showed the more bacterial variety (Shannon-Wiener) and evenness (Simpson) and richness (Margalef) (Agusto, L., et al., 2002 and Chiti, T., et al., 2007) (All percentage data are listed in "Annexe 1").

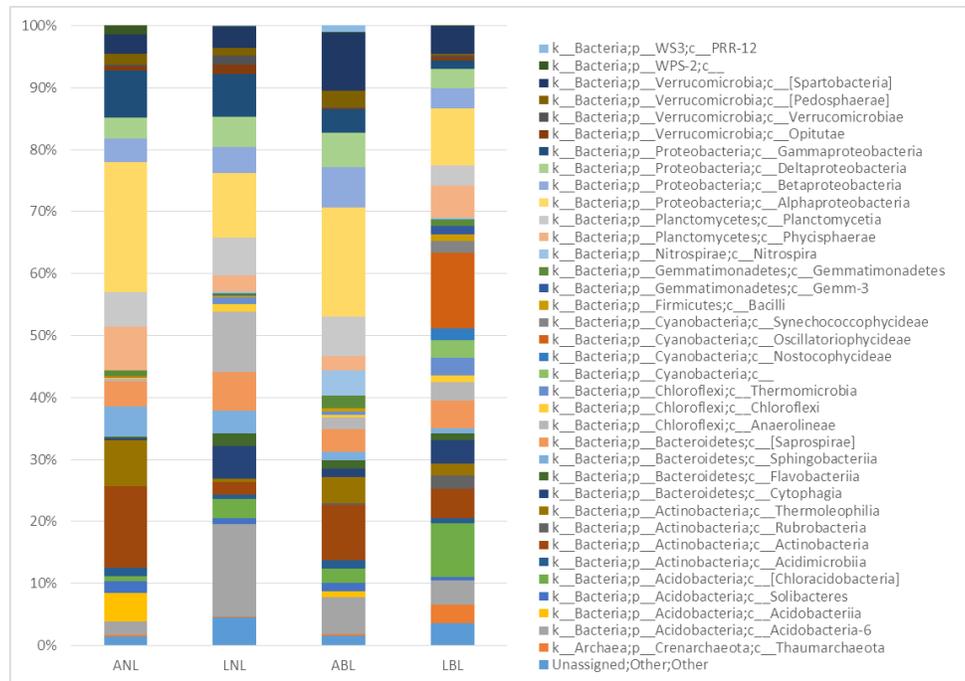


Fig 6. Average taxonomic composition at Class level. Only taxons >1% were considered.

3.6. Taxonomic composition at genus level

In this section, only the *Bacilli* class at genus level is explored (Fig 7). The analysis at the genus level revealed the existence of three orders: *Bacillales*, *Lactobacillales*, *Clostridiales* and the rare order *Turicibacterales*. The most dominant genus found in the LBL soils is *Bacillus* followed by *Paenibacillus*. However in the ABL soils, the most abundant was *Paenibacillus* genus followed by the genus *Bacillus*. In the LNL soils, the *Bacillus* genus was the most abundant. Concerning the ANL soils, the presence of three main abundant genera: *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Paenibacillus*, is reported. The entire abundant genus found belongs to the *Bacillales* which is an order of the *Bacilli* class. This class was the only class of the *Firmicutes* phylum revealed in the taxonomic study performed previously at the class level (Fig 6). In fact, several members of the *Bacillales* order play important roles in many agricultural, horticultural, industrial and medical applications due to their capacity to produce various extracellular enzymes. Besides these properties, they are well known in

industrial field by being the principal agents of the bio control formulations. Here we can cite, for instance, *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* which constitutes a very efficient agent to eradicate pathogenic mosquitoes such as malaria, dengue, yellow fever... (Olliario, P. L., et al., 1995) (All percentage data are listed in “Annexe 1”).

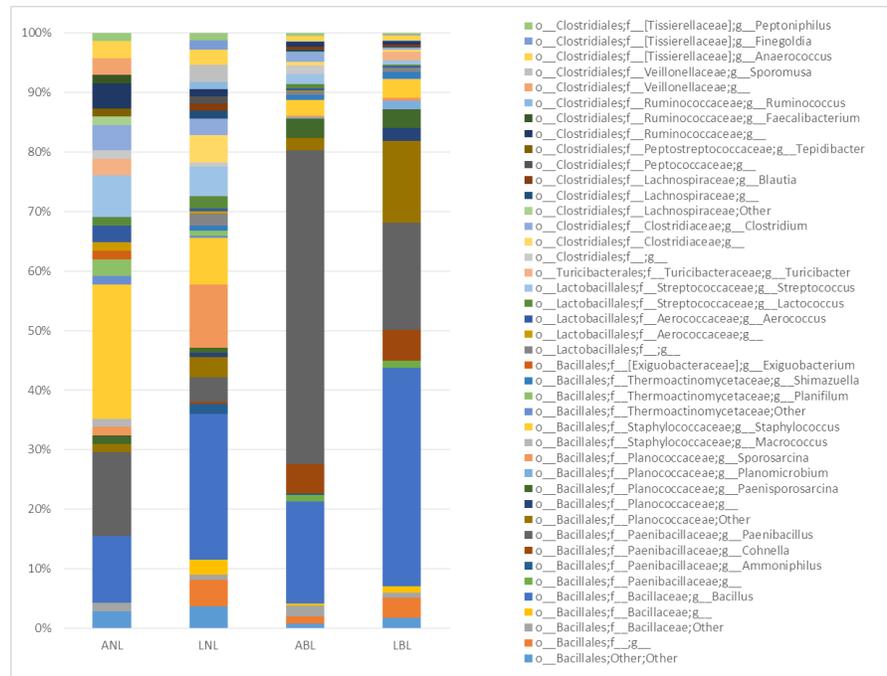


Fig 7. Average taxonomic composition of class *Firmicutes* at Genus level. Only taxons >1% were considered.

3.7. Beta diversity

From the OTUs values, the beta diversity, the distance metrics (unweighted distances) and the PCoA plots (Fig 8) were generated. Here, the samples we compared to each other using the presence and absence of OTUs and phylogeny (unweighted distances). Beta diversity provides a measure of the distance or dissimilarity between each sample pair. The higher similarity is reflected when few species are different between samples and this is attested by lower beta diversity values. However, lower similarity is seen when there are

more different species between samples which is reflected with the higher beta diversity values. In this PCoA plots, the first axis (usually called PC1) can be used to explain the maximum amount of variation present in the data set, followed by the second axis (PC2), and so on. According to this plot, it is shown that the samples are very divergent from each other. It is in accordance with the fact that each soil occupied a specific spot.

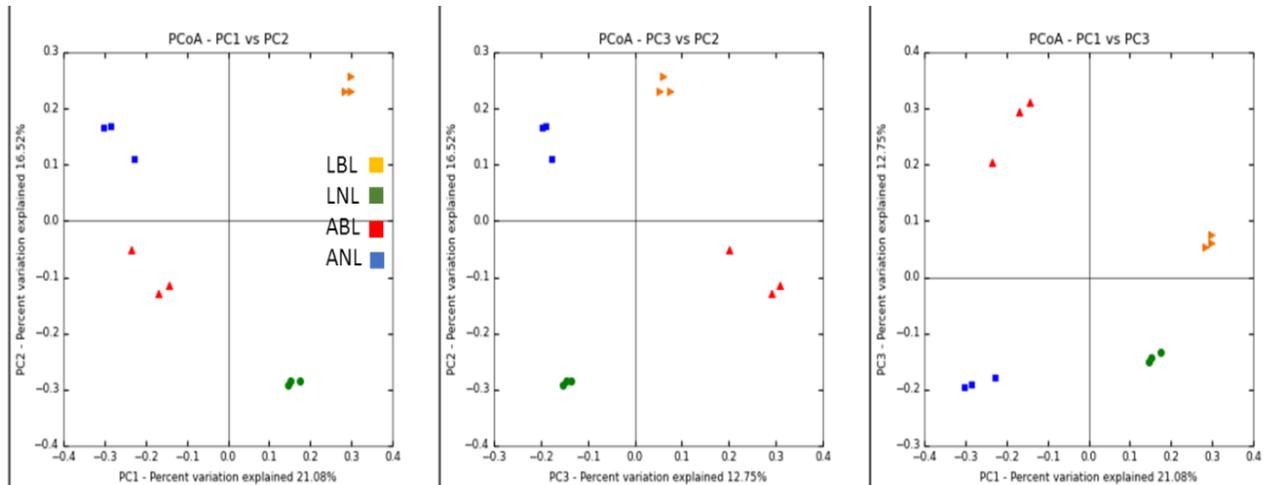


Fig 8. PCoA plot of normalized UniFrac unweighted distances

3. Conclusion

To study bacterial diversity in soils, many indices and molecular methods can be used in order to give clear information about the abundance of bacteria, the richness of these communities in soils... As we saw, this diversity varied with geography, climate and vegetation. Our results showed that *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* are the main phyla of all soils studied and are present at different percentages among the soils. Particularly, the biodiversity of *Firmicutes* phylum associated with the same type of vegetation varies depending on sampling sites and it is confirmed that the broadleaf soils

are more diverse than the needle soils both in Lebanon and Austria. The quantitative study of this biodiversity supported the idea that whatever the country is, the *Firmicutes* are more abundant in the broadleaf soils than in the needle soils. At the class level analysis, *Bacilli* are omnipresent in all soils but they were not the only dominant class. Additional classes are found such as *Synechococcophycideae*, *Oscillatoriohaptophycideae*, *Rubrobacteria*, *Chloracidobacteria*, *Thaumarchaeota*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Thermoleophilia* and *Acidobacteriia*. Analyzing particularly the class of *Bacilli*, the most abundant genera belonging to the *Bacillales* order is found in all soils.

A better determination of soil microbial diversity is needed as well as the relationships between microbial diversity and soil functionality which is still largely unclear. The analysis of DNA and mRNA should be combined with the proteomic approach in soil in order to measure the protein expression in soil. Consequently, this method could help for a better understanding of the existing links between microbial diversity and soil functionality. Overall comparative results showed that each soil is characterized by a variety of bacterial phyla, classes and genus. The present paper emphasizes the point that broadleaf soils are interesting ecological targets to be exploited due to its high micro flora diversity.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the tempus program of the Unchain network (University Chair on Innovation) 2012. I would like to thank Professor Magda Boudagher Kharrat (Head of the Science and Earth Department, Saint-Joseph University, Beirut), Rhea Kahale and Rami Sakr for their provided information about Lebanese soils.

References

Amann, R. I., W. Ludwig, et al. (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiological reviews **59**(1): 143-169.

Assmus, B., P. Hutzler, et al. (1995). "In Situ Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy." Applied and environmental microbiology **61**(3): 1013-1019.

Assmus, B., M. Schlöter, et al. (1997). "Improved in situ tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides." Microbial Ecology **33**(1): 32-40.

Augusto, L., J. Ranger, et al. (2002). "Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility." Annals of Forest Science **59**(3): 233-253.

Bakkenes, M., J. R. M. Alkemade, et al. (2002). "Assessing effects of forecasted climate change on the diversity and distribution of European higher plants for 2050." Global Change Biology **8**(4): 390-407.

Balser, T. C., J. W. Kirchner, et al. (2002). "Methodological variability in microbial community level physiological profiles." Soil Science Society of America Journal **66**(2): 519-523.

Banfield, J. F., N. C. Verberkmoes, et al. (2005). "Proteogenomic approaches for the molecular characterization of natural microbial communities." Omic: a journal of integrative biology **9**(4): 301-333.

Bergmann, G. T., S. T. Bates, et al. (2011). "The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities." Soil Biology and Biochemistry **43**(7): 1450-1455.

Breure, A. M. (2004). Soil biodiversity: Measurements, indicators, threats and soil functions. International Conference Soil and Compost Eco-biology. Spain.

Buckley, D. H. and T. M. Schmidt (2002). "Exploring the biodiversity of soil" a microbial rain forest." Biodiversity of Microbial Life. Wiley-Liss, Inc.

Caporaso, J. G., C. L. Lauber, et al. (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(Supplement 1): 4516-4522.

Castro, H. F., A. T. Classen, et al. (2010). "Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers." Applied and environmental microbiology **76**(4): 999-1007.

Chan, O. C., X. Yang, et al. (2006). "16S rRNA gene analyses of bacterial community structures in the soils of evergreen broad-leaved forests in south-west China." FEMS Microbiology Ecology **58**(2): 247-259.

Chao, A. (1984). "Nonparametric estimation of the number of classes in a population." Scandinavian Journal of statistics: 265-270.

Chiti, T., G. Certini, et al. (2007). "Effects of associating a N-fixer species to monotypic oak plantations on the quantity and quality of organic matter in minesoils." Geoderma **138**(1): 162-169.

Cho, J.-C. a. K., S.-J. (2000). "Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input." Appl. Environ. Microbiol. **66**: 956-965.

Colwell, R. K. and J. A. Coddington (1994). "Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **345**(1311): 101-118.

Davis, C. A., J. E. Austin, et al. (2006). "Factors influencing soil invertebrate communities in riparian grasslands of the central Platte River floodplain." Wetlands **26**(2): 438-454.

DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, et al. (2006). "Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB." Applied and environmental microbiology **72**(7): 5069-5072.

Dunbar, J., S. Takala, et al. (1999). "Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning." Applied and environmental microbiology **65**(4): 1662-1669.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A. and Kuske, C.R. (1999). "Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning." Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1662-1669.

Edgar, R. C. (2010). "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST." Bioinformatics **26**(19): 2460-2461.

Edgar, R. C., B. J. Haas, et al. (2011). "UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection." Bioinformatics **27**(16): 2194-2200.

Eilers, K. G., C. L. Lauber, et al. (2010). "Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil." Soil Biology and Biochemistry **42**(6): 896-903.

Emmett, B. A., C. Beier, et al. (2004). "The response of soil processes to climate change: results from manipulation studies of shrublands across an environmental gradient." Ecosystems **7**(6): 625-637.

Fierer, N., M. A. Bradford, et al. (2007). "Toward an ecological classification of soil bacteria." Ecology **88**(6): 1354-1364.

Foster, R. C., C. E. Pankhurst, et al. (1994). "Microorganisms and soil aggregates." Soil biota: management in sustainable farming systems.: 144-155.

Franklin, O., R. McMurtrie, et al. (2009). "Forest fine-root production and nitrogen use under elevated CO₂: contrasting responses in evergreen and deciduous trees explained by a common principle." Global Change Biology **15**(1): 132-144.

Fulthorpe, R. R., A. N. Rhodes, et al. (1998). "High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria." Applied and environmental microbiology **64**(5): 1620-1627.

Garbeva, P., J. A. Van Veen, et al. (2004). "Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness." Annu. Rev. Phytopathol. **42**: 243-270.

Goldfarb, K. C., U. Karaoz, et al. (2001). "Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance." Frontiers in microbiology **2**.

Gotelli, N. J. and R. K. Colwell (2001). "Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness." Ecology letters **4**(4): 379-391.

Green, J. L., A. J. Holmes, et al. (2004). "Spatial scaling of microbial eukaryote diversity." Nature **432**(7018): 747-750.

Haase, S., L. Philippot, et al. (2008). "Local response of bacterial densities and enzyme activities to elevated atmospheric CO₂ and different N supply in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L." Soil Biology and Biochemistry **40**(5): 1225-1234.

Heuer, H., G. Wieland, et al. (2001). "Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis." Environmental molecular microbiology: Protocols and applications **9**: 177-190.

Janssen, P. H. (2006). "Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes." Applied and environmental microbiology **72**(3): 1719-1728.

Jones, R. T., M. S. Robeson, et al. (2009). "A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses." The ISME journal **3**(4): 442-453.

Kandeler, E., A. R. Mosier, et al. (2006). "Response of soil microbial biomass and enzyme activities to the transient elevation of carbon dioxide in a semi-arid grassland." Soil Biology and Biochemistry **38**(8): 2448-2460.

Kurcheva, G. F. (1972). "Soil invertebrates of the Transcarpathian forests." Pedobiologia.

Lauber, C. L., M. Hamady, et al. (2009). "Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale." Applied and environmental microbiology **75**(15): 5111-5120.

Lloret, F., J. Peñuelas, et al. (2009). "Plant community changes induced by experimental climate change: seedling and adult species composition." Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics **11**(1): 53-63.

Lozupone, C. and R. Knight (2005). "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities." Applied and environmental microbiology **71**(12): 8228-8235.

Magoč, T. and S. L. Salzberg (2011). "FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies." Bioinformatics **27**(21): 2957-2963.

Martínez-Alonso, M., J. Escolano Sánchez, et al. (2010). "Diversity of the bacterial community in the surface soil of a pear orchard based on 16S rRNA gene analysis." International Microbiology, 2010, vol. 13, n.º 3, p. 123-134.

McCaig, A. E., Glover, L.A. and Prosser, J.I. (1999). "Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures." Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1721-1730.

Norby, R. J., M. F. Cotrufo, et al. (2001). "Elevated CO₂, litter chemistry, and decomposition: a synthesis." Oecologia **127**(2): 153-165.

Norby, R. J., J. Ledford, et al. (2004). "Fine-root production dominates response of a deciduous forest to atmospheric CO₂ enrichment." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(26): 9689-9693.

Olliaro, P. L. and P. I. Trigg (1995). "Status of antimalarial drugs under development." Bulletin of the World Health Organization **73**(5): 565.

Pace, N. R., D. A. Stahl, et al. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Advances in microbial ecology, Springer: 1-55.

Peters, S., S. Koschinsky, et al. (2000). "Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes." Applied and environmental microbiology **66**(3): 930-936.

Schimel, J. (1995). Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. Arctic and alpine biodiversity: patterns, causes and ecosystem consequences, Springer: 239-254.

Schmalenberger, A., F. Schwieger, et al. (2001). "Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling." Applied and environmental microbiology **67**(8): 3557-3563.

Sekar, V. (1990). "Genetics of *Bacillus thuringiensis israelensis*." In Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies; de Barjac, H., Sutherland, D.J., Eds. Rutgers University Press New Brunswick, NJ, USA: 66-77.

Singh, B. K., C. D. Campbell, et al. (2009). "Soil genomics." Nature Reviews Microbiology **7**(10): 756-756.

Su, Y., Y. Gou, et al. (2003). "Diversity of soil invertebrate communities at Yushan Hill, Changshu, Jiangsu Province." Chinese Biodiversity **12**(3): 333-338.

Su, Y., Y. Gou, et al. (2006). "Diversity of soil invertebrate communities at Yushan Hill, Changshu, Jiangsu Province." Chinese Biodiversity **12**(3): 333-338.

Tarlera, S., K. Jangid, et al. (2008). "Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77 000 years of ecosystem development." FEMS Microbiology Ecology **64**(1): 129-140.

Torsvik, V., SZrheim, R. and GoksZyr, J. (1996). "Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review." J. Ind. Microbiol. **17**: 170-178.

Wang, Q., G. M. Garrity, et al. (2007). "Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy." Applied and environmental microbiology **73**(16): 5261-5267.

Ward, N. L., J. F. Challacombe, et al. (2009). "Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils." Applied and environmental microbiology **75**(7): 2046-2056.

World Health, O. (1999). "Microbial pest control agent: *Bacillus thuringiensis*."

Xu, J. (2006). "Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances." Molecular ecology **15**(7): 1713-1731.

Zak, D. R., W. E. Holmes, et al. (2003). "Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?" Ecology **84**(8): 2042-2050.

Zak, D. R., K. S. Pregitzer, et al. (2000). "Atmospheric CO₂ and the composition and function of soil microbial communities." Ecological Applications **10**(1): 47-59.

Zak, D. R., D. B. Ringelberg, et al. (1996). "Soil microbial communities beneath *Populus grandidentata* grown under elevated atmospheric CO₂." Ecological Applications: 257-262.

Chapitre 2

Identification et caractérisation d'une souche Libanaise de *Bacillus thuringiensis* hautement toxique contre les diptères

Chapitre 2: Identification et caractérisation d'une souche Libanaise de *Bacillus thuringiensis* hautement toxique contre les diptères

I. Présentation de l'étude

Les épidémies causées par les moustiques vecteurs de maladies et les dommages provoqués par les diptères ravageurs au niveau des agricultures ne cessent de s'empirer (Reisen, W. K. 2010 et Khajuria, C., et al., 2013). Seul l'agent de bio contrôle à base de la bactérie *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) découverte en 1976 se propose comme agent de lutte biologique efficace puisqu'aucune preuve de résistance sur le champ n'a été signalée jusqu'à présent (Guillaume Tetreau, R. S., et al., 2013). L'information génétique responsable de l'activité insecticide contre les moustiques a été largement liée à l'un des plus grand plasmide pBtoxis de *Bti* de taille 128 kb (Carlton, B. C., et al., 1985 et Sekar, V., et al., 1985). Ce plasmide porte les gènes codant les toxines Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa et Cyt2Ba (Berry, C., et al., 2002).

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur l'identification d'une nouvelle souche de *Bt* plus toxique contre les diptères que la souche *Bti*. Cette souche, nommée A23, a été isolée du sol Libanais et sa toxicité *in vivo* a été testée contre trois différentes larves de diptères. Une étude statistique a été effectuée en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson au seuil de 5 % afin de calculer la concentration létale qui tue 50 % des larves (LC_{50}) après 2h30 sur *Culex pipiens*, 3h30 sur *Anopheles gambiae* et 5 h sur *Aedes albopictus* et ceci dans le but d'évaluer sa toxicité par rapport à *Bti*. Les valeurs de la LC_{50} ont montré une efficacité accrue de la toxicité de A23 contre chaque type de larves en comparaison à *Bti* (sur *Culex* : LC_{50} (A23) = 0,0068 µg/mL, LC_{50} (*Bti*) = 0,0073 µg/mL ; sur *Aedes* : LC_{50} (A23) = 0,0071 µg/mL, LC_{50} (*Bti*) = 0,0182 µg/mL et sur

Anopheles: LC_{50} (A23) = 0,0245 $\mu\text{g/mL}$, LC_{50} (*Bti*) = 0,0338 $\mu\text{g/mL}$). Afin d'expliquer cette différence de toxicité, je me suis intéressée à la caractérisation du contenu en gènes *cry* de la souche A23 ainsi que leur polymorphisme en comparaison aux séquences des gènes *cry* de *Bti* répertoriées dans la base de donnée de Neil Crickmore. Le profil protéique des deux souches a également été étudié en absence ou en présence d'activation par trypsination ou digestion par les protéases du jus de larves d'insecte. L'ensemble des résultats recueillis à ce jour suggère que la toxicité élevée de A23 serait liée à la présence d'une nouvelle protéine à activité insecticide non présente chez *Bti* et/ou à des taux de transcription et d'expression différents des gènes *cry* (*cry4A/4B*, *cry11A*, *cry10A*, *cyt1A* et *cyt2B*).

II. Contribution scientifique sous forme d'article

Article 2: Identification and characterization of a new Lebanese *Bacillus thuringiensis* strain, highly toxic against Diptera

Article 2 Identification and characterization of a new Lebanese *Bacillus thuringiensis* strain, highly toxic against Diptera

Abstract

Mosquito-borne epidemic diseases such as malaria, filariasis, and dipteran pests... are still affecting human health and agriculture. The applications of chemical insecticides have negative impacts on human health and the environment, consequently the development of bio control agent rises as an urgent requirement. The identification of the biological control agent *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) helped to eradicate these Diptera. The insecticidal crystal proteins of *Bti* strains contain two classes of toxins: the insecticidal δ -endotoxins, referred to as Cry and the cytolytic toxins named Cyt. In the aim of identifying new bio-agent pesticides, we screened the activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Lebanese soils using three different mosquito larvae *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* and *Anopheles gambiae*. One highly toxic *Bt* strain, called A23, which had a higher LC₅₀ comparing to *Bti*, was selected for further investigations. The characterization tests included morphological study, genotyping by BOX-PCR, and plasmid profiles analysis and, the investigation of *cry* and *cyt* genes contents, notably *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cry30Ga1*, *cry39A*, *cry40Aa*, *cry40Ba*, *cry40Da*, *cry54* and variety of *cyt*, by PCR. The molecular characterization was also performed at the protein level using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and *in vitro* activation processes of the δ -endotoxins using the different total larval extracts. BOX-PCR and plasmid profiles confirm the divergence between the A23 and *Bti* species although no differences could be identified in terms of the investigated *cry* genes content. However, the protoxin activation profiles *in vitro* differ between the two species. Additional experiments must be performed to clarify A23's high toxicity.

Keywords: Diptera, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *in vivo* toxicity, LC₅₀, *cry* genes, *cyt* genes, *in vitro* activation.

1. Introduction

The control of insect vectors represents a major concern of public health. Indeed, the application of chemical pesticides could not eradicate mosquito-borne epidemic diseases such as malaria, filariasis, yellow fever, dengue... that are still affecting over two billion people (WHO, 2014). Dengue, chikungunya virus and malaria are transmitted to humans through *Aedes spp.* and *Anopheles spp.* mosquitoes. Whereas, filariasis and the West Nile virus are transmitted by *Culex pipiens* and yellow fever is transmitted by *Aedes aegypti*. Moreover, massive use of pesticides led to the emergence and spread of many resistant vector strains. The use of chemical pesticides has many other drawbacks notably it is an important source of environmental pollutants and it imposes safety risks for humans and domestic animals. Therefore, vector control can no longer depend on the use of chemicals and major efforts are deployed to the development of environmental friendly pesticides (Margalith, Y., et al., 2000). Alternative methods of insect management can depend on the use of microbial insecticides that contain microorganisms and/or their by-products. In fact, bio control agents based on microbial formulations are especially valuable and take into account a number of issues: the ecological conservation of plant-microorganism interactions, the isolation of new strains and the investigation of novel mechanisms for insects' control.

A viable alternative for insect control emerges with the introduction of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as bio larvicides in the bio pesticides market (Regis, L., et al., 2001). The particularity of *B. thuringiensis* resides in its production of proteinaceous inclusions during sporulation that are toxic towards insect larvae upon ingestion. The parasporal body of *B. thuringiensis* is composed of one or more insecticidal delta-endotoxins (named Cry and Cyt) (<http://www.btnomenclature.info/>). In order to improve the bio control strategies, combinations of two or more toxins are applied. These toxins are highly specific, safe to humans, vertebrates, and plants, and are entirely biodegradable, consequently we won't find any residual toxic products gather in the environment (Schnepf, E., et al., 1998).

Between the large number of *B. thuringiensis* strains active on insects, *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (*Bti*) was described as the reference strain that is commonly used as a biopesticide against Diptera worldwide (Priest, F. G. 1992). *Bti* is characterized by eight circular plasmids, ranging from 5 to 210 kb (3,3 to 135 MDa) and a linear replicon of approximately 16 kb. The genetic information responsible of the mosquitocidal activity has been assigned to one of the largest plasmids (128 kb) (Carlton B. C., et al., 1985 and Sekar, V. 1990). This plasmid known as pBtoxis carries the genes encoding Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa and Cyt2Ba toxins (Berry, C., et al., 2002). The mosquitocidal activity of *Bti* is not only the additive effect of each toxin but a complex synergistic interaction among these toxins (Chang, C., et al., 1993 and Wu, D., et al., 1994). From nearly 20 years till now, *B. thuringiensis subsp. israelensis* has been used in the field with no development of insect resistance (Guillaume Tetreau, R. S., et al., 2013). Interestingly, this is mainly due to the presence of Cyt toxin which delays or prevents the development of resistance to Cry toxins (Wirth, M. C., et al., 1997).

The identification and characterization of new strains with activity against dipteran species could help in the formulations of new bio control agents against mosquitoes other than the worldwide bio pesticide *Bti*. Among Lebanese *Bt* collection library, we selected 25 strains in order to investigate their toxicity against dipteran larvae. We performed more advanced studies on the highest toxic strain A23. This concerns genetic analysis, *cry* and *cyt* genes content and *in vitro* delta-endotoxins processing. Our data showed that A23 had the same gene content known in *Bti* (genes described above). However, A23 had a protoxin activation process *in vitro* different from that of *Bti*. Supplement experiment must be done to understand its high toxicity *in vivo*.

2. Materials and Methods

Bacterial strains. Our reference *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Bti* (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis* strain 1884) (Singer and Margalit) is identified by Huguet de Barjac of “Institut Pasteur” in 1979. The strain has the original code 1884 and number T14 0007 of the collection of entomopathogenic bacteria. 25 other *Bt* strains were selected from the Lebanese *Bt* collection library. *B. thuringiensis* strains were grown on a solid T3 medium: Tryptose 0,2 %, Tryptone powder 0,3 %, Yeast extract 0,15 %, Manganese sulfate hydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,0002 %, Magnesium sulfate hydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,002 %, Sodium hydrogenophosphate (Na_2HPO_4) 0,14 %, Sodium Dihydrogenophosphate (NaH_2PO_4) 0,12 %, Agar Agar granulated 2 %; pH = 6,8 at 30°C during 72h until sporulation was complete.

Bioassays. *In vivo* assays were conducted against different mosquito larvae reared at 27°C, 80 % relative humidity, and a 12:12 dark/light photoperiod: *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* and *Anopheles gambiae* in the laboratory of Dr. Mike Osta and Dr. Zakaria Kambris at the Department of Biology, American University of Beirut, Lebanon. Early three and fourth-instar larvae were placed in 200 ml of dechlorinated water. First of all, the *in vivo* tests were performed at many concentrations and at different time in order to fix the most accurate range of concentrations and the perfect time to calculate the LC_{50} . After conducting the first *in vivo* tests covering different time and concentrations for each type of larvae, we settled up the more accurate conditions for each *in vivo* tests as follow: for *Culex* and *Aedes*, seven concentrations (0,004, 0,005, 0,0055, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009 $\mu\text{g/mL}$) of the spore-crystal suspensions of each strain were added (three biological and experimental replicates) and for *Anopheles*, seven concentrations (0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045 $\mu\text{g/mL}$) of the spore-crystal suspensions of each strain were added (three biological and experimental replicates). Larvae were incubated at 28°C and examined after 2h30 for *Culex*, 3h30 for *Anopheles* and 5 h for *Aedes*. The mean 50 % lethal concentration was

estimated by Probit analysis using statistical parameters (Ibarra, J. E., et al., 1987).

Plasmid DNA extraction and PCR. From a colony of Bt, a pre-culture is prepared in 2 mL of liquid Luria-Bertani (LB) medium (Anderson, I., et al., 2005) for 6 hours at 30°C with shaking at 225 rpm. Three hundred microliters of this pre-culture are used to inoculate 6 mL of liquid LB and incubated 16-18 h at 30°C with shaking at 225 rpm. After this incubation, the cells are recovered by centrifugation for 5 minutes at 10,000 g. The DNA extraction was performed using standard alkaline lysis method of Sambrook et al. (1989) including the step involving lysozyme treatment (4 mg/mL of lysozyme (Lysozyme from chicken egg white, Sigma-Aldrich)) (Sambrook, J., et al., 1989). The DNA pellet was finally suspended in TE buffer and dosed using NanoDrop™. The DNA should be diluted to a final concentration of 0,1 µg/µL to serve as a PCR template using Thermo Scientific Taq DNA Polymerase. PCR mixtures were prepared as follow: for a final volume of 25 µL, we added: 2,5 µL of 10x Taq Buffer; 2 µL of MgCl₂ 2,5 mM; 0,5 µL of 10 mM dNTP Mix, 2 mM each; Primers F and R at 0,1 µM; 1,25 U of Taq polymerase and the sterilized water was added to complete the master mix volume to 23 µL. 2 µL of 0,1 µg/µL DNA was added to the master mix. PCR was carried out in a BioRad Thermal cycler as follows: 3 min at 95°C; 35 cycles of 95°C for 30 sec, annealing (Table 1) for 30 sec, and 72°C for 1 min/kb; and 5 min at 72°C. The PCR amplification was then checked on a 1 % agarose gel.

The sets of primers used in this study are listed in table 1.

Sequencing of PCR products. DNA was amplified using Thermo Scientific Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase. PCR mixtures were prepared as follow: for a final volume of 20 µL, we added: 4 µL of 5 x Phusion Green HF Buffer; 0,4 µL of 10 mM dNTPs; 1 µL of 10 µM Primers F and R; 0,2 µL of Phusion Taq and 13 µL sterilized water. 0,4 µL of 10 ng/µL DNA was added to the master mix. PCR was carried out in a BioRad Thermal cycler as follows: 30 sec at 98°C; 35 cycles of 98°C for 10 sec, annealing (Table 1) for 30 sec, and 72°C for 15-30 s/kb; and 10 min at 72°C. The PCR amplification was then loaded

on a 1 % agarose gel. PCR products needed to be sequenced were purified with a QIAquick PCR Purification Kit as described by the manufacturer (Qiagen). Purified fragments were sequenced at “l’unité de génétique médicale” at la Faculté de Médecine, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon, by using the same primers used for PCR amplification. The sequences were analyzed using ChromasPro version 1.22 (Technelysium, Queensland, Australia), Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Spore and delta-endotoxin production. The *B. thuringiensis* strains were grown in solid T3 medium at the optimal conditions for delta-endotoxin production. After 72 h, the cultures were examined under a light microscope. They were only composed of a mixture of spores, crystals and minor cell debris. The massive bacteria was collected and suspended in sterile water, mixed and centrifuged for 10 min at 6000 x g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet washed two times with 1 M sodium chloride buffer NaCl. After 5 min of centrifugation at 6000 x g at 4°C, the pellet was washed three times with room temperature sterile water. Then one aliquot of the spore-crystal mixtures was solubilized in 50 mM sodium hydroxide buffer NaOH (pH= 13,4) at 30°C for 2 h with constant shaking. After centrifugation for 10 min at 13 000 x g, solubilized delta-endotoxins were recovered within the supernatant. The concentrations of the different solubilized toxins were determined according to the method of Bradford (Bradford, M. M., et al., 1976).

Purification of the delta-endotoxins. From the massive 72 h culture of the different strains, the spore-crystal mixtures were collected and suspended in sterile water and centrifuged for 10 min at 6000 x g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet washed two times with 1 M NaCl treated with 0,01 % Triton X100. After every centrifugation, the supernatant was discarded. The pellet was then washed four times with room temperature sterile water supplemented with few milliliters of hexane. The suspension was shaken by hand until foam is formed and then centrifuged 5 min at 6000 x g at 44 °C. The upper phase and

the supernatant (rich in spores) were discarded. This procedure was repeated four times. Afterward, the pellet was washed by adding 5 mL of sterile water in order to remove cellular debris (Mounsef, J. R., et al., 2014). Finally, the pellet was re-suspended in 1 mL of sterile water and the concentrations of the purified delta-endotoxins were determined according to the method of Bradford (Bradford, M. M. 1976).

Protein activation with larval juice. Third instar larvae were chilled on ice for 30 min. Then, the dissection is carried out using sterile scalpel and forceps. Head of the larvae is cut with a scalpel and then the tail of the larvae is fixed with a clamp and intestine is removed. The whole larvae guts were collected in cold 1x MET buffer (Mannitol 300 mM; EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 5 mM; Tris, 20 mM; pH = 7,2) (Rouis, S., et al., 2007) and were mechanically disrupted using a blender and then centrifuged for 10 min at 13000 × g. The supernatants corresponding to larvae protease extract were recovered and the protein content concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford, M. M. 1976) using Bio-Rad reagent (Bio-Rad Protein assay, Cat. 500-0006). In order to activate the toxins by the larval juice, extracted delta endotoxins were solubilized in 50 mM Carbonate buffer Na₂CO₃ (pH = 10,5) overnight at 37°C with shaking. The day after, the dissolved proteins were assayed by the Bradford method, and the digestion was carried out with the different larval juice (*Aedes*, *Anopheles* and *Culex*) at the ratio of 1:20 (w/w) at 37°C for different time: 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 4 h and overnight. The reaction was stopped by adding the Laemmli sample buffer and boiling for 5 min. The activated proteins of each sample were separated on SDS-PAGE (10 %) (Laemmli, U. K. 1970 and Schagger, H., et al., 1987). Gels were stained with Coomassie blue dye to visualize the activation profile.

Genomic DNA extraction and Box-PCR. One colony from each strain was used for a 4 h pre-culture at 30°C in order to prepare the genomic DNA extraction. After 4 h, 500 µL of this pre-culture were taken for the inoculation of 10 mL LB medium and incubated for 16-18 h at 30°C with stirring. The isolation of genomic bacterial

DNA is described according to the protocol of Marmur (1961) (Marmur, J. 1961). In this protocol, bacterial cells are disrupted by initial treatment with lysis buffer containing the enzyme, egg-white lysozyme, which hydrolyzes the peptidoglycan of the bacterial cell wall. The resultant cell walls are unable to survive osmotic shock consequently the bacteria lyse in the hypotonic environment. Then, the detergent, sodium dodecyl sulfate, (SDS, sodium dodecyl sulfate) was added to complete lysis by disrupting residual bacterial membranes and it reduces harmful enzymatic activities (nucleases). Other chelating agents, citrate and EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), also inhibit nucleases by removing divalent cations. This protocol employs a variety of methods described in what follows to purify the bacterial DNA extracted. Perchlorate ion is used to dissociate proteins from DNA. Chloroform/Isoamyl/Alcohol denatures and precipitates proteins by lowering the dielectric constant of the aqueous medium. A centrifugation is needed to remove the precipitated material. DNA is then precipitate by absolute ethanol. The resultant DNA is dissolved and precipitated again with isopropanol and dissolved, after last centrifugation, in TER buffer ((1M Tris, pH = 8; 0,5 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) and 5 mg/mL RNase A) with incubation 1 h à 37°C. The genomic profile was observed on a 0,8 % agarose gel.

The box-PCR was performed on genomic DNA using BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') known to amplify the box A subunit proved to be highly conserved with the evolution of Gram-positive bacteria (Versalovic J., et al., 1994). The master mix is composed of the following components: for a final volume of 23 µL, 15,375 µL of sterile water; 2,5 µL of 10x Reaction Buffer; 2 µL of MgCl₂, 0,5 µL of 10 mM dNTPs, 2,5 µL BOX A1R primer (10 µM) and 1,25 U of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific Taq DNA Polymerase). 2,0 µL of DNA template was added to the master mix. PCR was carried out in a BioRad Thermal cycler as follows: 6 min at 95°C; 35 cycles of 94°C for 1 min, annealing 53°C for 1 min, and 72°C for 8 min; and 16 min at 72°C. The PCR amplification was then loaded on a 1 % agarose gel.

3. Results and Discussion

3.1. Selection of the A23 strain of *Bt*

Twenty five *Bacillus thuringiensis* strains were selected from the Lebanese *Bt* collection library of our laboratory. These *Bt* strains (*Bti*, D15, D1, D3, D12, D23, H3, A5, D10, D5, D21, A23, DOT, D16, D27, NAR2, D11, NV1, D29, R3, M16, D4, D22, SLK1 and D25) were tested for their *in vivo* toxicity against the L3-L4 instars of three different mosquito larvae *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* and *Anopheles gambiae* in order to select the highest toxic one. The tests were performed according to two different approaches: 1. analyzing in a time scale the survival curve of larvae infected with different bacterial concentrations in order to determine the toxicity of each strain; 2. evaluating the level of surviving larvae at a specific time upon their infection with different bacterial concentrations (*Culex* and *Aedes* ($\mu\text{g/mL}$): 0,004, 0,005, 0,0055, 0,006, 0,007, 0,008 and 0,009. *Anopheles* ($\mu\text{g/mL}$): 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04 and 0,045) in order to determine the LC_{50} of the high toxic strains. The first approach led to the classification of the 25 strains of *Bt* within three categories: strains with high toxicity to dipteran larvae (*Bti*, D21, A23, D15, D5 (only against *Culex*)), strains with low toxicity (H3, D12, DOT, SLK1, R3, D29, M16) and strains with no toxicity (D23, A5, D10, D1, D3, D17, D4, D25, NAR2, D11, NV1, D22, D27) (Annex 2 Fig 1A.1). Among the highly toxic strains, *Bti*, D21, A23, D15 and D5 (Annex 2 Fig 1A.2), A23 showed the highest toxicity, according to the second approach, and therefore was selected for further characterization. In order to calculate the LC_{50} , different times were used: for *Culex*, we collected the survivor *Culex* larvae at 1 h, 2 h, 2h30 and 3 h post- infection (pi); for *Aedes*, at 3 h and 5 h pi and for *Anopheles*, at 3 h, 3h30, 4 h and 4h30 pi. The toxicity tests were conducted in experimental and biological triplicates. By analyzing the percentage of survivors for each experiment, we calculated the LC_{50} values after 2h30 for *Culex*, 5 h for *Aedes* and 3h30 for *Anopheles*. The range of concentrations selected were: 0,004, 0,005, 0,0055, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009 $\mu\text{g/mL}$ for *Culex* and *Aedes* whereas *Anopheles* larvae needed higher

concentrations, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045 µg/mL, to reach the LC₅₀. Fig 1A, represents the survival curves of A23 and *Bti* on different concentrations at the selected times 2h30 for *Culex*, 3h30 for *Anopheles* and 5h for *Aedes* larvae. In these conditions, *Culex* showed to be the most susceptible to *Bt* strains followed by *Anopheles* and *Aedes*. In all cases we found that A23 is more toxic than *Bti*. A concentration of approximately 0,006 µg/mL of A23 was necessary to kill 50 % of *Culex* larvae whereas 0,007 µg/mL of *Bti* were required. 50 % of *Aedes* surviving larvae were reported at a concentration of 0,007 µg/mL of A23 and 0,008 µg/mL of *Bti*. As for *Anopheles* higher concentrations of bacteria were required for the killing and the LC₅₀ reported were 0,022 µg/mL for A23 and 0,034 µg/mL for *Bti*. These observations were also confirmed by the statistic calculations of the LC₅₀ using Pearson correlation at the significance level of 5 % (Fig 1B) which shows that, A23 is 1.1 fold more toxic than *Bti* on *Culex*, (LC₅₀ (A23) = 0,0068 µg/mL and LC₅₀ (*Bti*) = 0,0073 µg/mL), 2.6 fold on *Aedes* (LC₅₀ (A23) = 0,0071 µg/mL and LC₅₀ (*Bti*) = 0,0182 µg/mL), 1.4 fold on *Anopheles*, (LC₅₀ (A23) = 0,0245 µg/mL and LC₅₀ (*Bti*) = 0,0338 µg/mL). These results can be explained by: the feeding behavior of *Anopheles* that could differ from *Culex* and *Aedes* (eg. *Anopheles* larvae feed on the surface and *Aedes* ingested 11.5 times more crystals-spores suspensions than *Anopheles*) (Mahmood, F. 1998); the physiology of the midgut of each insect: the intestinal pH and its protease pool; the intestinal toxin receptors and their corresponding toxin binding affinity.

In order to exclude the spore effects on the observed toxicity in each test, the survival experiments were performed using purified crystals of each bacterial strain. The survival curves confirmed the same range of toxicity against the same dipteran larvae (data not shown) (Tang, J. D., et al., 1996).

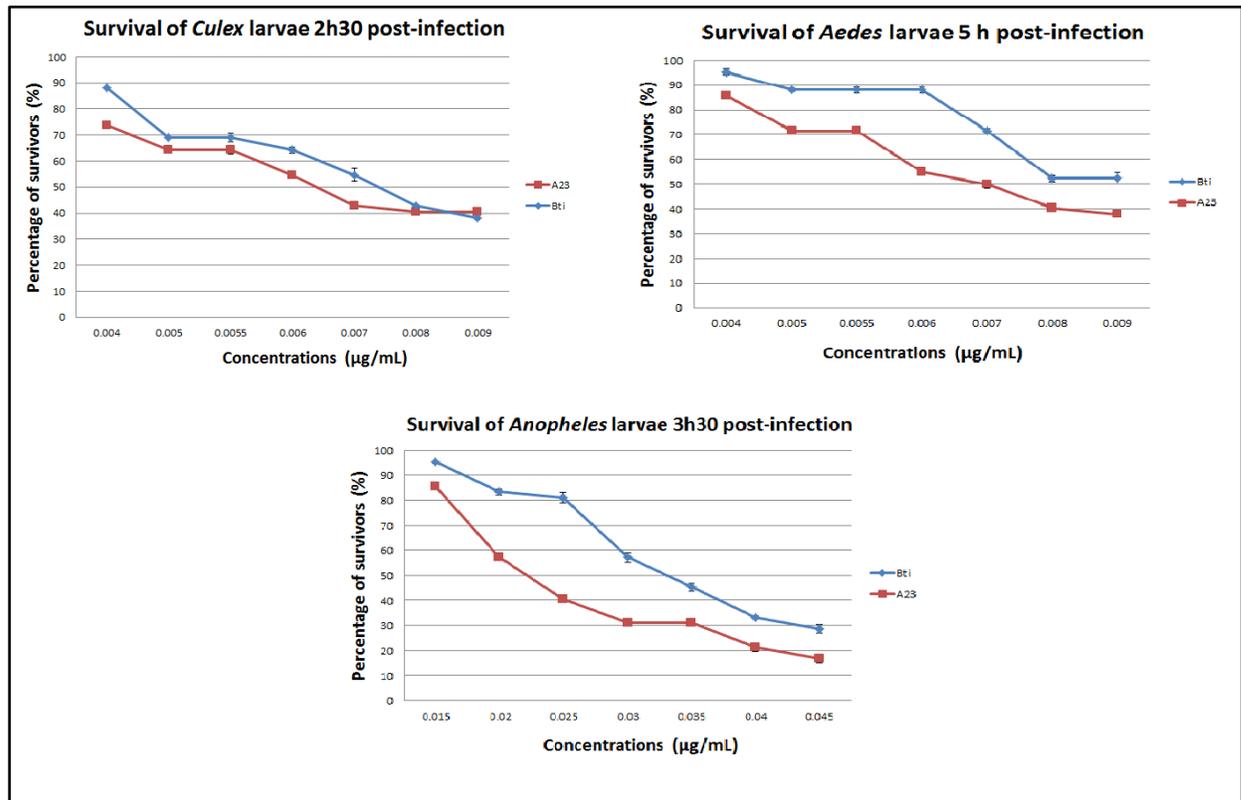


Fig 1A. Comparative toxicity analysis of the selected Lebanese *Bt* strains A23 and the international reference *Bti*. The graphs represent the percentage of survivors (%) of dipteran larvae through different concentrations of the spore-crystal mixtures of the *Bt* strains using a fixed time for each mosquito: the survivors count was performed after 5h of incubation with spore-crystal mixtures for *Aedes*, after 3h30 for *Anopheles* and 2h30 for *Culex*. In all the graphs, the red curve is the toxicity of A23, and the blue one for *Bti*, respectively.

Strains	Larvae	LC50 (µg/mL)	s(LC50)	CV% (LC50)	LC50min	LC50max
A23	<i>Aedes</i>	0.0071	0.0006	7.8	0.0059	0.0088
	<i>Anopheles</i>	0.0245	0.003	12.2	0.0177	0.033
	<i>Culex</i>	0.0068	0.0006	9	0.0055	0.0086
<i>Bti</i>	<i>Aedes</i>	0.0182	0.0095	52.2	0.0113	0.06
	<i>Anopheles</i>	0.0338	0.0024	7.1	0.0284	0.0406
	<i>Culex</i>	0.0073	0.0005	7.4	0.0062	0.009

Fig 1B. Insecticidal activity of *B. thuringiensis israelensis* and A23 isolates against third instar larvae of *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens* and *An. gambiae*. The mean 50 % lethal concentration was estimated by Probit analysis using statistical parameters at the significance level of 5 %. s(LC50) is the standard error, CV % (LC50) is the coefficient of variation and LC50min and LC50max delimitate the confidence limits.

3.2. Genetic characterization of A23 and *Bti* strains

The A23 and *Bti* strains were first characterized morphologically. The corresponding colonies were off-white and opaque with irregular outline. Both bacteria produced round shape crystals. The discrimination of closely related strains by morphological methods is limited; therefore, we used the genotyping methods in order to check whether A23 is genetically different than *Bti* (Cai, H. Y., et al., 2003). Throughout the bacterial genomes, there are a series of repetitive DNA sequences dispersed in multiple copies such as the 154 bp BOX elements. The consensus sequences of these elements were used in this study to amplify the DNA fragments located between the BOX elements in the *Bt* genome using the BOX-A1R primer (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (van Belkum, A., et al., 2001) that is conserved in many microbial genomes and was a singular concern in many previous studies (Lee, A., et al., 2009). The bands pattern obtained is shown in fig 2A. In fact, the genomic fingerprints of BOX-PCR consisted of 10 to 22 bands. As we can see in our pattern, *Bti* and A23 do not have the same number of bands: *Bti* has 10 bands whereas A23 has approximately 13 (3 bands at different levels compared to those of *Bti*). The BOX-PCR approach provides great intra-species discrimination but still can sometimes incorrectly identify some strains to the species level (Nayak, B. S., et al., 2011). Therefore, in order to confirm our results, we have compared the profile of extracted plasmid DNA of the two species. Although the plasmid patterns could be underestimated due to the unreliability of the plasmid extraction techniques, this technique combined to the BOX-PCR can be applied as a tool for *B. thuringiensis* discrimination below the serotype level (Reyes-Ramírez, A., et al., 2008). As shown in fig 2B, the plasmid profile of A23 is quite different of that of *Bti*. Hence, the BOX-PCR technic and the comparison of the plasmid profiles of A23 and *Bti* suggest that the two strains are genetically different.

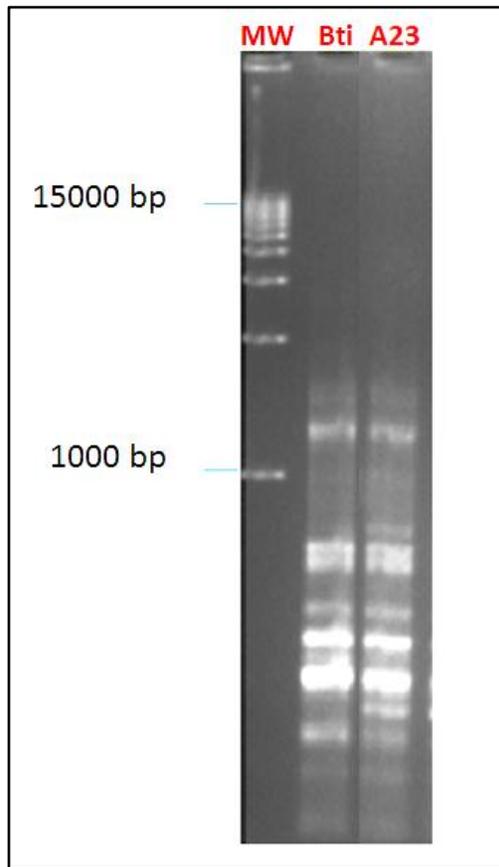


Fig 2A. Agarose gel electrophoresis of BOX-PCR fingerprintings patterns from genomic DNA of *Bti* and A23 strains. The reference strain *Bti* is provided from “Collection des Bactéries entomopathogènes T14 0007” (Institut Pasteur, France) and A23 is isolated from Lebanese soils. The molecular size marker MW is a 1 kb ladder (BioRad EZ loadTM). This result is representative of 3 independent experiments.

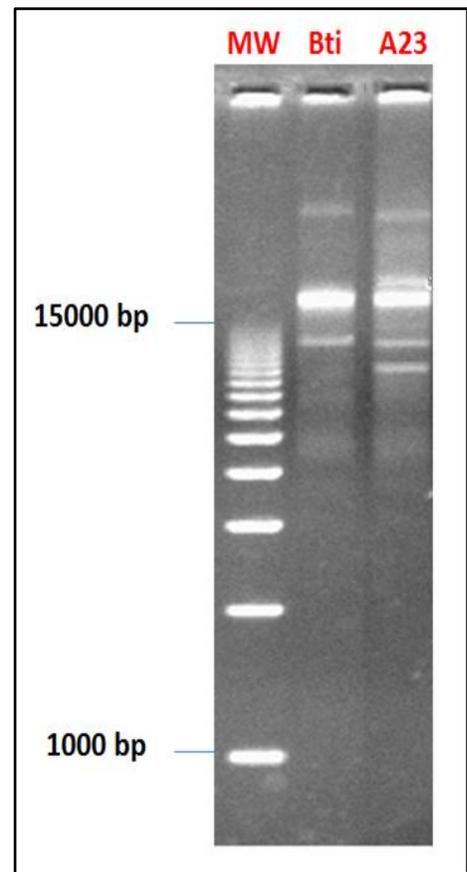


Fig 2B. Plasmid patterns of strains (*Bti* and A23) of *Bacillus thuringiensis* in 0.8 % agarose gel. The molecular size marker MW is a 1 kb ladder (BioRad EZ loadTM). This result is representative of 3 independent experiments.

We then investigated the *cry* and *cyt* gene contents of the two strains. Several genes encoding Cry and Cyt toxins active against dipteran larvae have been characterized. Among these, *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry40*, *cry30* and *cry54* and a variety of *cyt* genes (Table 1) (Ben-Dov, E. 2014 and Jihen Elleuch, et al., 2014) were targeted by PCR reactions. The results shown in Fig 2C indicate that A23 and *Bti* share the same gene composition. In order to enlarge the profile of characterized genes we used the S5un4/S3un4 and UP30-5/UP30-3 primers pairs which allow the amplification of additional *cry* genes (Table 1) (Song, F. P., et al., 1998 and Zhang, W., et al., 2012). However, no differences could be deduced (data not shown). Based on these results, we first suspected that differential toxicity of A23, based on the survival experiments, would probably be related to polymorphisms in the amplified *cry* genes. Indeed, that was the case in our previous work which identified a new toxic *Bt* strain, Lip, active against Lepidoptera (El Khoury, M., et al., 2014). Therefore, we conducted the sequencing of the *cry4A*, *cry4B*, *cry11A* and *cry10A* genes which encode the toxins known for their insecticidal activity in *Bti*. However, complete homology was retrieved for all the cited genes between the *Bti* and A23 strains. The higher toxicity of A23 could therefore be linked to a polymorphism in a gene which sequence has not been investigated in this analysis (such as *cyt* genes). Alternatively, the A23 phenotype could be related to the presence of a new delta-endotoxin encoding gene or to a differential expression level or to a differential quantity of Cry toxins between A23 and *Bti*. Indeed, the toxicity of *B. thuringiensis* strains to mosquito larvae may be affected by any insecticidal crystal proteins changes (Sarrafzadeh, M. H., et al., 2005).

Table 1. List of primers designed and used in this study, their annealing temperature (°C), their sequences, the genes they recognized and the size of their expected PCR products (bp).

Primers	Annealing Temp (°C)	Sequence	Gene (s) recognized	Expected Products size (bp)	References
cry4A Start F	50.4	5'- ATGAATCCTTATCAAAATAA-3'	<i>cry4A</i>	3542	This study
cry4A R4	62.1	5'-TCACTCGTTCATGCAAATTAATT-3'			
cry4B F	54.1	5'-CAGGCTATCCGTAGCGA-3'	<i>cry4B</i>	3410	This study
cry4B R	47.4	5'-TCTTGATTCTCCTCACAA-3'			
P11 F	54.4	5'-TTTAAAATAAAAAAATTCAATAAAA-3'	<i>cry11A</i>	862	This study
cry11 R4	65.1	5'-TAGTAACGGATTAATTTGCGTCGA-3'			
P10 F	45.9	5'-AGAAAAGAGTTGTGTCTA-3'	<i>cry10A</i>	1450	This study
cry10 R3	49.9	5'-TTAATTAACAAATAAATCATTTC-3'			
UP30 F	60	5'-TTGGCTCAATATGTGTCAAAC-3'	<i>cry30Ga1</i>	1388, 1463, 1464, 1461	Zhang et al. (2012)
UP30 R	59	5'- GCTTTAACAGCAGGAATTTG-3'			
Up39.40-5	64	5'-TAAGAGGGTTTGTGGGAAGTAG-3'	<i>cry40Ba, cry40Aa, cry39A, cry40Da</i>	1005, 1001, 886, 890	Zhang et al. (2012)
Up39.40-3	64	5'-ACTTCTGGGAATACCTCTACTG-3'			
cry40 F1	57.1	5'- GTATGTCAGATGAACATTCTCC-3'	<i>cry40 partial cds</i>	1381, 1403, 1725	This study
cry40 R867	59.8	5'- GGGAAATCGACTGTACCAGT-3'			
S5UN4	60.1	5'-GTGTCAAGAGAACCAACAGTAG-3'	<i>cry54, cry4A, cry4B, cry10</i>	1548,1551, 1449,1467	Song et al. (1998)
S3UN4	57.1	5'-ACTAAGTCTCCTCTGTATGACCAG-3'			
cyt1Aa F	63	5'-CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT-3'	<i>cyt1Aa1, cyt1Aa2, cyt1Aa3, cyt1Aa4</i>	477	This study
cyt1Ab R	63	5'-TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT-3'			
cyt1Ba1 F	57	5'-GACAACCTCAATCCACAGCA-3'	<i>cyt1Ba1</i>	248	This study
cyt1Ba1 R	57	5'-GTAAGCAACAACAGCACCT-3'			
cyt1Aa6 F	45	5'-GCAAGCAATTATGTTAGC-3'	<i>cyt1Aa6, cyt1Aa-like</i>	231	This study
cyt1Aa6 R	45	5'-GCAACTCCTAATACAGTT-3'			
cyt1 Ab1 F	60	5'-ACCCTTGGAAAACCCCTCAA-3'	<i>cyt1Ab1</i>	535	This study
gral Cyt R	60	5'-GGTACACAATACATAACGCCACC-3'			
cyt2 F	43	5'-AATACATTTCAAGGAGCTA-3'	<i>cyt2Ba6, cyr2Ba7, cyt2Ba8, cyt2Ba10,</i>	471	This study
cyt2 R	43	5'-TTTCATTTAACTTCATATC-3'			
cyt2 Ca1 F	57	5'-GCAGCAAGGTACAGTCCAAG-3'	<i>cyt2Ca1</i>	227	This study
cyt2 Ca1 R	57	5'-CCCACCTGTTTCTCATCCT-3'			
cyt1 Ba5 F	58.8	5'-CGCCAACAATCCAATTTTC-3'	<i>cyt2Ba5</i>	225	This study
cyt1 Ba5 R	58.8	5'-TGCAAATGGTCTTCTAATGC-3'			
cyt2 Ba-like F	59	5'-TGCAAATGGTATTCTAATGCAGG-3'	<i>cyt2Ba-like</i>	131	This study
cyt2 Ba-like R	59	5'-TGATAACGAGCCATAGCACAC-3'			
cyt2 Ab1 F	60	5'-CAGGTGCATTTATGGCCGTA-3'	<i>cyt2Bb1</i>	217	This study
Cyt2 Ab1 R	60	5'-TGGTTCGGATGATTGGATTGA-3'			
cyt2 Aa1 F	55	5'-GGCACTCCAATTTGCAAAT-3'	<i>cyt2Aa1, cyt2Aa2, cyt2Aa3, cyt2Aa4</i>	222	This study
cyt2Aa1 R	55	5'-GCTTCATCTATTTGAGTGTC-3'			
cyt2 F	46	5'-AATACATTTCAAGGAGCTA-3'	<i>cyt2Ba1, cyt2Ba2, cyt2Ba3, cyt2Ba4,</i>	193	This study
cyt2 Ba1 R	46	5'-TAACGAGCCCTAGCACACTTC-3'			

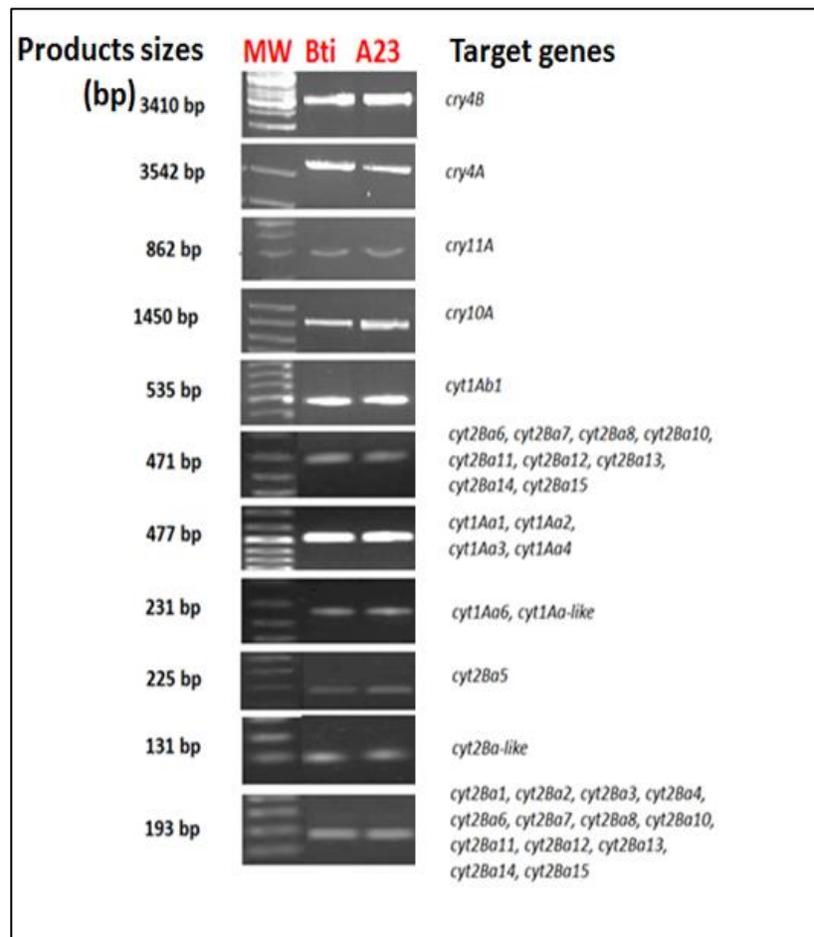


Fig 2C. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR amplification of *cry4A*, *cry4B*, *cry11A*, *cry10A*, *cyt1Aa* and *cyt2Ba*, genes using specific primers (Table 1). The PCR reaction was performed on plasmid DNA extracted from *Bti* and A23 *Bt* strains. The molecular size marker MW is a 100 bp ladder (Fermentas).

3.3. SDS PAGE profile analysis

In parallel to the genetic characterization and in order to check if any differences could be observed through the comparison of the protein-profiles of the A23 and *Bti* strains, we performed a polyacrylamide gel electrophoresis of the solubilized spore-crystal suspensions of each bacterium. The results shown in Fig 3 indicate that A23 had the major proteins of 130-135 (Cry4A/4B), 72 (Cry11A), 58 (Cry10A) and 27 kDa (Cyt1A) that are found in *B. thuringiensis*

subsp. israelensis (Ibarra, J., et al., 1986). However, this highly toxic strain, A23, had four additional protein bands of 100, 40 and 35 kDa. The 130-135 kDa and the 100, 40, 35 kDa bands were sequenced using a ThermoScientific LTQ Orbitrap XL™ Hybrid FT Mass Spectrometer LC-MS/MS to check whether new proteins can be detected. However, all the bands sequenced retrieved the major *Bti* proteins, Cry4A/4B, Cry11A, Cry10A and Cyt1A, and no new protein was detected.

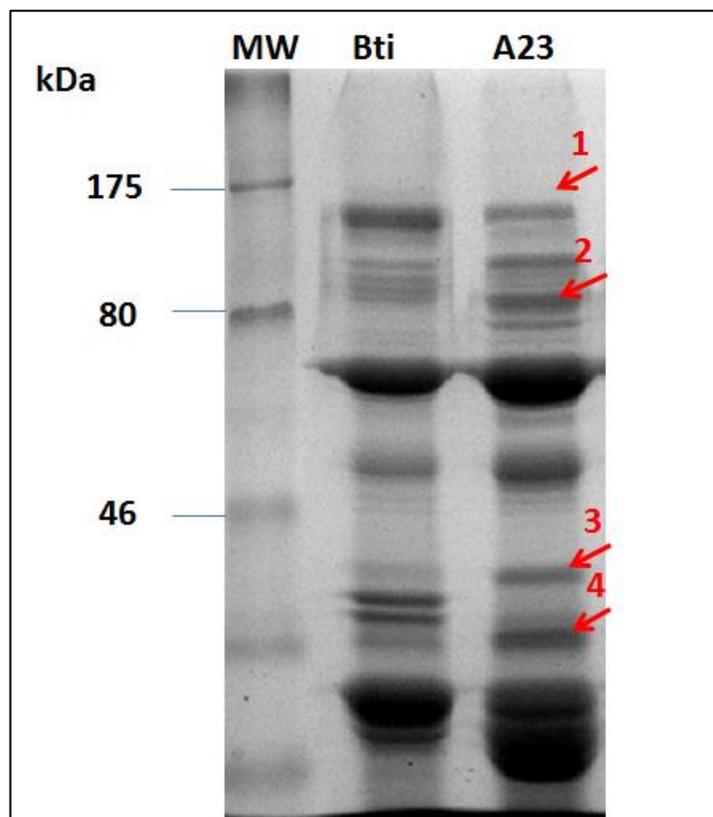


Fig 3. SDS-PAGE (10 % gel) of the spore-crystals mixtures of *Bti* and A23 *Bt* strains. The molecular weight is a BioLabs Prestained Marker Broad range #7708S from 7- 175 kDa. The arrows in red with numbers indicate the sequenced proteins.

3.4. Parasporal proteins activation with larval extracts *in vitro*

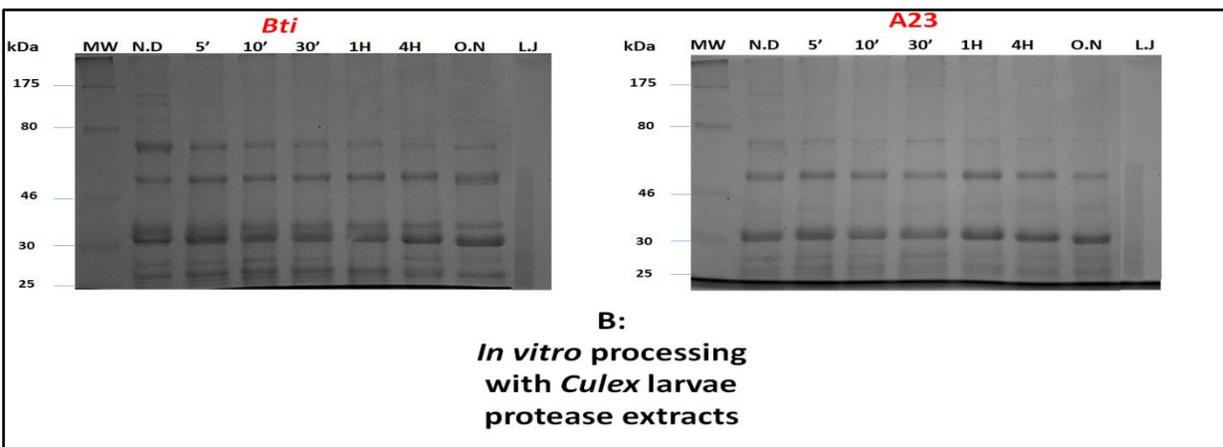
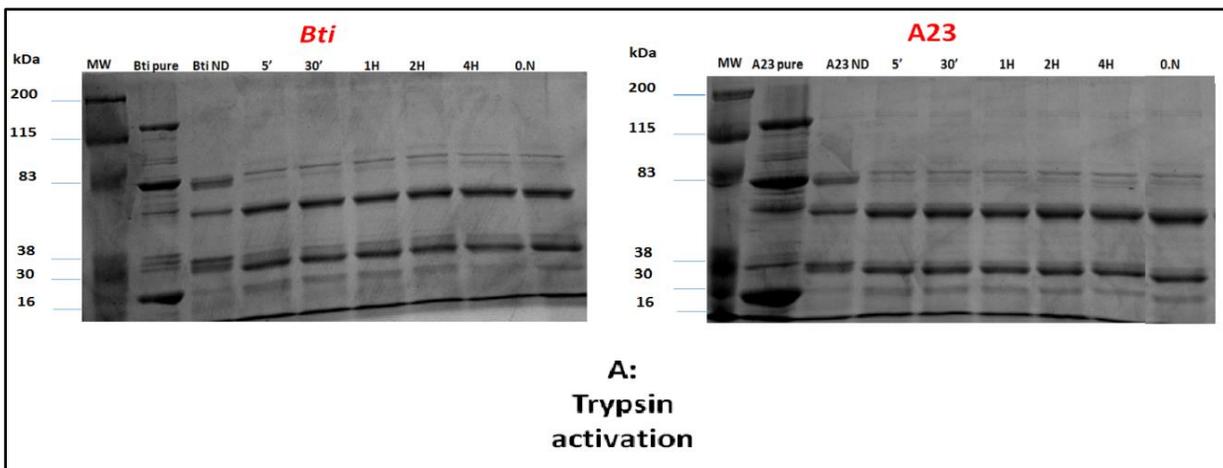
In order to study the stability of each bacterial strain toxins facing the protease mix of the insects' midguts and to check whether the digestion profiles could reflect the presence of an activated form of a new protein not detected by LC-MS/MS analysis, we conducted the activation of the solubilized crystal protein of A23 and *Bti* using larval extracts of the three dipteran species *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* (Fig 4). The trypsin activation pattern does not show any significant differences between the strains; *however* it reflects the stability of toxins through different time points: no over processed forms are revealed through times even after overnight activation and the profile of each strain stayed the same through the different time points (Fig 4. A). Conversely, the digestion with *Culex* larvae extract (Fig 4. B) reveals a faster activation kinetic of A23 comparing to *Bti*. Notably, the 72 kDa band corresponding to Cry11A decreases 30 min following digestion of A23 proteins whereas it persists longer in *Bti* treated proteins sample. This indicates that A23's Cry11A may be activated faster than *Bti*'s. Moreover, only in *Bti* profile, over processed forms were revealed around 30-35 kDa.

Concerning the activation patterns obtained with *Aedes* extracts (Fig 4. C), we found that the protein patterns of A23 and *Bti* are stable till overnight incubation. The protein patterns of the two species are quite similar; however some supplement bands of 35-46 kDa are observed in *Bti* profile. The activation kinetic of A23 seems to be faster than *Bti*.

Finally in the process of bacterial toxins using *Anopheles* larvae extracts (Fig 4. D), the band of 72 kDa of A23 is more stable than *Bti*, and it corresponds to Cry11A protoxins. The activation of Cry11A seems faster in *Bti* than A23. Some supplement bands of 35 and 28 kDa are observed in *Bti* and A23 profiles.

Based on the parasporal proteins digestion with larval extract, A23 protoxins seem to be more rapidly activated and more stable than those of *Bti*. However, these observations and the higher toxicity retrieved for the A23 strain by the *in vivo* tests could not be explained by the genetic and protein

sequencing analysis. Additional investigations are required to understand the A23 strain toxicity. For example, differential *cry* gene expression levels could explain this discrepancy between the A23 and *Bti* biological activity. This could be investigated using quantitative PCR to determine the copy number of each protoxins encoding genes (*cry4A/4B*, *cry11A*, *cry10A*, *cyt1A* and *cyt2B*), or comparison of their promoters activity or transcript expression levels by RT-qPCR between A23 and *Bti* (D'haene, B., et al., 2010). We are currently working on the sequence analysis of *cyt* genes in the A23 strain and we are aiming to analyze the low molecular weight peptides observed in the protein extract of A23 (Fig 3). Finally, the A23 genome will be sequenced in order to find if potential new *cry* genes could also explain its enhanced toxicity.



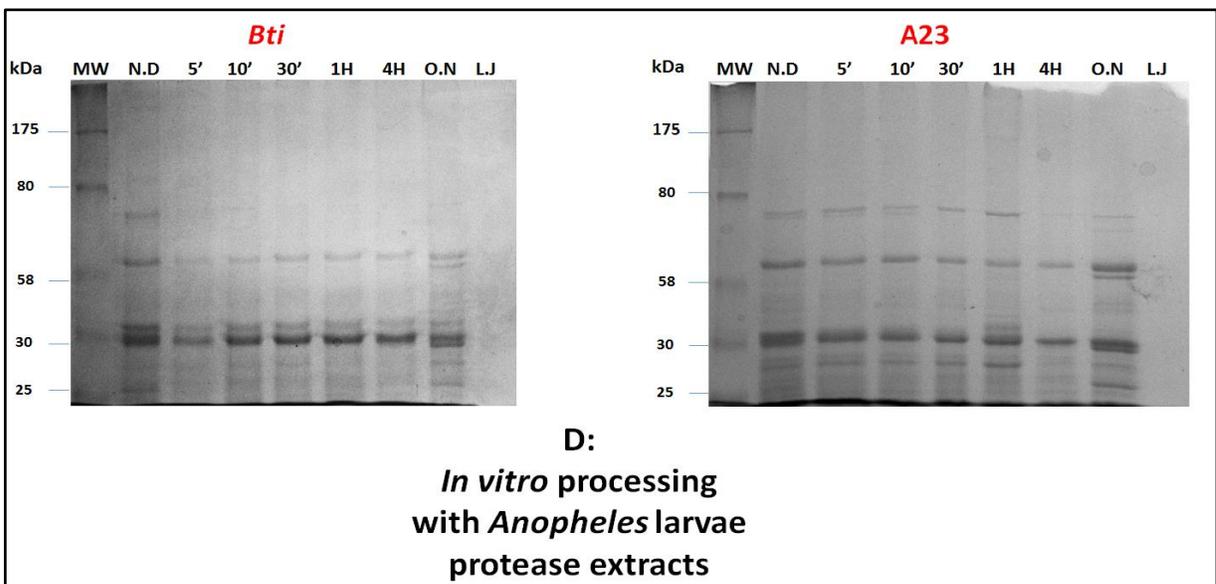
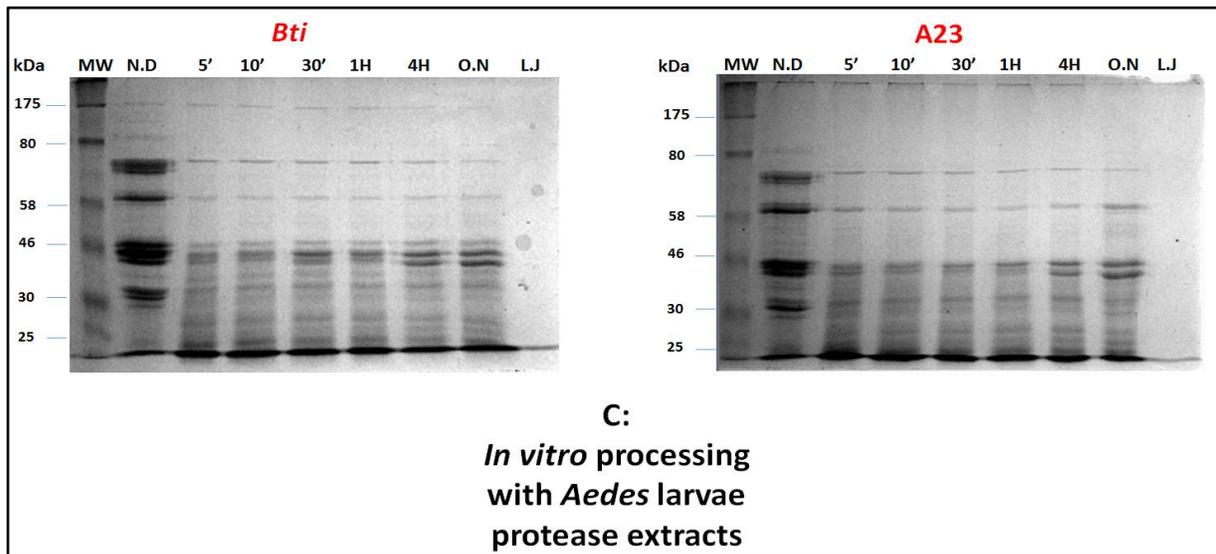


Fig 4. *In vitro* processing of *Bti* and A23 with trypsin (Trypsin from bovine pancreas, Sigma-Aldrich®) (A), *Cx. pipiens* larvae protease extracts (B), *A. albopictus* larvae protease extracts (C) and *An. gambiae* larvae protease extracts (D) after different incubation periods: 5 min (5'), 10 min (10'), 30 min (30'), 1H, 4H and O.N (overnight). N.D: Non digested protoxins; MW: Molecular weight BioRad Kaleidoscope™ Prestained Standards (6-196 kDa) in A and BioLabs Prestained Marker Broad range #7708S from 7- 175 kDa in B, C and D.

4. Conclusion

The present study allowed the identification of a new strain of *B. thuringiensis*, A23, from Lebanese soils which produces spherical crystals with high insecticidal activity against three dipteran larvae *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* and *Anopheles gambiae*. The genetic characterization and the protein profiles of A23 protoxins could not give an explanation for its enhanced toxicity comparing to the reference *Bti*. We hope that, A23 genome sequencing would allow a better understanding of its phenotype.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS L), Université Montpellier 2 (UM2-France) and Saint-Joseph University Research Council FS59. I would like to thank Mr. Benoit Queffelec for his help in the LC₅₀ calculations.

References

Anderson, I., et al., (2005). "Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis* ." FEMS Microbiol Lett. **250**(2): 175-84.

Ben-Dov, E. (2014). "*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins." Toxins **6**(4): 1222-1243.

Berry, C., S. O'Neil, et al. (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Applied and environmental microbiology **68**(10): 5082-5095.

Boonserm, P., M. Mo, et al. (2006). "Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution." Journal of bacteriology **188**(9): 3391-3401.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248–254.

Cai, H. Y., M. Archambault, et al. (2003). "Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications." Animal Health Research Reviews **4**(02): 73-94.

Carlton, B. C. and J. M. Gonzalez Jr (1985). "Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*." Molecular biology of microbial differentiation: 246-252.

Chang, C., Y. M. Yu, S. M. Dai, S. K. Law, and S. S. Gill. (1993). "High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. ." Appl. Environ. Microbiol. **59**: 815–821.

Clarridge, J. E., III. (2004). "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases." Clin. Microbiol. Rev. **17**: 840–862.

D'haene, B., J. Vandesompele, et al. (2010). "Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR." Methods **50**(4): 262-270.

Du, L., Xie, Y., Wang, J., Wang, R., Cao, W., Song, J. and Feng, S. (2008). "*cry22A* gene from *Bacillus thuringiensis*." Institute of Plant Protection, Hebei, Academy of Agricultural and Forestry Sciences, 437 Dongguan Street, Baoding, Hebei 071000, China.

El Khoury, M., H. Azzouz, et al. (2014). "Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new *cry1Aa* gene highly toxic to *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae." Archives of microbiology **196**(6): 435-444.

FP, S. (1998). "Identification of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* isolates by PCR-RFLP system." Master Thesis, Northeast Agricultural University, Harbin.

Guillaume Tetreau, R. S., Jean-Philippe David and Laurence Després. (2013). "Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately." Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **108**(7): 894-900.

Ibarra, J., and B. A. Federici. (1986). "Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* are similar in protein composition and toxicity. ." FEMS Microbiol Lett **34**: 79–84.

Ibarra, J. E., and B. A. Federici. (1987). "An alternative bioassay for determining the toxicity of suspended particles to mosquito larvae." J. Am. Mosq. Control Assoc. **3**: 187–192.

Jackson GW, m. R., Fox GE, Wilson RC. (2006). "Bacterial genotyping by 16S rRNA mass cataloging. ." BMC Bioinformatics **7**: 321.

Jihen Elleuch, S. T., Najeh Belguith Ben Hassen, Marie Noël Lacoix, Fabrice Chandre, Samir Jaoua, Raida Zribi Zghal (2014). "Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae)." Journal of Invertebrate Pathology: 8 pages.

Koeuth, T., J. Versalovic, et al. (1995). "Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria." Genome Research **5**(4): 408-418.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature **227**(5259): 680-685.

Lee, A., and E. Wong. (2009). "Optimization and robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using Trout Lake E. coli isolates. ." J. Exp. Microbiol. Immunol. **13**: 104-113.

Li W, R. D., Fournier P. (2009). "Bacterial strain typing in the genomic era." FEMS Microbiol Rev(33): 892-916.

Mahmood, F. (1998). "Laboratory bioassay to compare susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as affected by their feeding rates." Journal of the American Mosquito Control Association **14**(1): 69-71.

Margalith, Y. and E. Ben-Dov (2000). "Biological control by *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Insect pest management: techniques for environmental protection **200**: 243-301.

María Teresa Fernández-Luna, B. E. T., Humberto Lanz-Mendoza, Alejandra Bravo, Mario Soberón, Juan Miranda-Ríos, (2010). "Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*." Journal of Invertebrate Pathology **104**: 231–233.

Marmur, J. (1961). "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms." Journal of molecular biology **3**(2): 208-IN1.

Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, and R. Hakenbeck. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucleic Acids Res. **20**: 3479–3483.

Masashi Y, R. O., Kohki Y, Hisako N, Kikuo S, Hiroshi S. (2002). "Active form of dipteranspecific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Biosci Biotechnol Biochem. **66**: 516–22.

Miranda R, F. Z., Bravo A. (2001). "Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation. ." Insect Biochem Mol Biol. **31**: 1155–63.

Mounsef, J. R., D. Salameh, et al. (2014). "A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals." Journal of microbiological methods **107**: 147-149.

Nayak, B. S., B. Badgley, et al. (2011). "Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing." Applied and environmental microbiology **77**(14): 5050-5055.

Priest, F. G. (1992). "Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*." Journal of applied bacteriology **72**(5): 357-369.

Regis, L., M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, and J.-F., Charles. (2001). "Bacterial larvicides of dipteran disease vectors." Trends Parasitol. **17**: 377–380.

Reisen, W. K. (2010). "Landscape epidemiology of vector-borne diseases." Annual review of entomology **55**: 461-483.

Reyes-Ramírez, A., Ibarra, J.E., (2008). " Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. ." Appl. Environ. Microbiol. **74**: 125–129.

Rouis, S., M. Chakroun, et al. (2007). "Proteolysis, histopathological effects, and immunohistopathological localization of delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the midgut of lepidopteran olive tree pathogenic insect *Prays oleae*." Molecular biotechnology **35**(2): 141-148.

Sambrook, J. and W. Russell David (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 3, Cold spring harbor laboratory press.

Sarrafzadeh MH, G. J., Lagneau C, Gaven B, Carron A, Navarro JM. (2006). "Growth, sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14." Curr Microbiol **51**: 75–81.

Schagger, H., and G. von Jagow. (1987). "Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. ." Anal. Biochem. **166**: 368–379.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, L. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." Microbiol. Mol. Biol. Rev **62**: 775–806.

Sekar, V. (1990). "Genetics of *Bacillus thuringiensis israelensis*." In Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies; de Barjac, H., Sutherland, D.J., Eds. Rutgers University Press New Brunswick, NJ, USA: 66-77.

Song, F. P., J. Zhang, et al. (1998). "Establishment of PCR-RFLP identification system of cry genes from *Bacillus thuringiensis*." Scientia Agricultura Sinica **31**(3): 1-4.

Tang, J. D., A. M. Shelton, et al. (1996). "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*)." Applied and environmental microbiology **62**(2): 564-569.

van Belkum, A. and P. W. M. Hermans (2001). BOX PCR fingerprinting for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. Antibiotic Resistance, Springer: 159-168.

Versalovic J., S. M., de Bruijn F.J., Lupski J.R., (1994). "Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction." Methods. Mol. Cell. Biol. **5**: 25–40.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. ." J. Bacteriol. **173**: 697–703.

Who (2014). World malaria report 2013, World Health Organization.

Wirth, M. C., G. P. Georghiou, et al. (1997). "CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(20): 10536-10540.

Wu, D., J. J. Johnson, and B. A. Federeci. (1994). "Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIV proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* ." Mol. Microbiol. **13**: 965–972.

Yen, A. Y. a. C. (2012). "PCR Optimization of BOX-A1R PCR for Microbial Source Tracking of *Escherichia coli* in Waterways." Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI). **16**: 85 – 89.

Zhang, W., Crickmore, N., George, Z., Xie, L., He, Y.Q., Li, Y., Tang, J.L., Tian, L., Wang, X., Fang, X., (2012). "Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*-an alternative to *Bt*?" J. Invertebr. Pathol. **109**: 217–222.

Chapitre 3

Identification et caractérisation d'une nouvelle souche de *Bacillus thuringiensis* H3 non cytolytique isolée du sol Libanais et active sur les diptères.

Chapitre 3 : Identification et caractérisation d'une nouvelle souche de *Bacillus thuringiensis* H3 non cytolytique isolée du sol Libanais et active sur les diptères.

I. Présentation de l'étude

La toxicité contre les diptères a été associée à l'utilisation de *Bacillus thuringiensis israelensis* comme agent de lutte biologique. Cette bactérie est caractérisée par ses différentes toxines Cry qui agissent différemment selon l'insecte cible et sont connues pour leur activité synergique qu'elles effectuent lorsqu'elles sont associées (Chilcott, C.N., et al., 1988 ; Angsuthanasombat, C., et al., 1992 and Crickmore, N., et al., 1995). Cette protéine Cyt joue un rôle essentiel puisqu'elle aide l'activité des toxines Cry de *Bti*. En effet, les interactions synergiques les plus importantes impliquent la toxine Cyt1A qui permet d'augmenter plus de 20 fois la toxicité des mélanges de toxines Cry (Wu, D., et al., 1994). De plus, la protéine Cyt peut agir comme récepteur de certaines toxines Cry leur facilitant ainsi leur activité au niveau de l'intestin moyen des larves. Tel est le cas de la fixation de Cry11Aa à Cyt1Aa qui déclenche l'oligomérisation de la toxine Cry11Aa formant une structure de 250 kDa. Cyt1Aa imite le rôle d'un récepteur de type cadhérine en ce qui concerne la formation d'oligomères (Perez, C., et al., 2007). Malgré le fait que Cyt joue un rôle essentiel dans l'absence de résistance à *Bti* sur le champ, Cyt a été décrite aussi toxique contre les cellules eucaryotes (Corrêa, R. F. T., et al., 2012).

L'objectif de ce chapitre réside dans l'identification d'une souche H3 de *Bacillus thuringiensis* toxique contre les diptères mais non cytolytique. La toxicité *in vivo* de cette souche a été effectuée sur trois types de larves de diptères. H3

présente une toxicité réduite par rapport à celle de *Bti*. Les études génétiques et moléculaires de cette souche n'ont pas révélé de similitudes avec la souche *Bti*. Cependant, des études de séquençage ont montré que la souche H3 pourrait contenir un nouveau variant du gène *cry4B* ou la protéine Cry4B tronquée ce qui pourra justifier cette diminution de toxicité. De plus, le gène *cry40*, connu pour son activité insecticide non découverte chez *Bti*, a été identifié chez H3. Des analyses poussées de ces deux gènes doivent être effectuées. Toutefois, cette souche présente un bon modèle pour l'étude de l'effet de la protéine Cyt sur l'activité des toxines Cry. Nous suggérons de manipuler génétiquement la souche H3 en lui incorporant le gène *cyt* pour étudier de près l'influence de Cyt sur la toxicité totale de H3.

II. Contribution scientifique sous forme d'article

Article 3: Identification and characterization of a new non cytolytic *Bacillus thuringiensis* strain, H3, from Lebanese soil with insecticidal activity against different mosquito larvae.

Article 3 Identification and characterization of a new non cytolytic *Bacillus thuringiensis* strain, H3, from Lebanese soil with insecticidal activity against different mosquito larvae

Abstract

The insecticidal activity against Diptera has been associated with the use of *Bacillus thuringiensis israelensis* as an efficient biological control agent spread rapidly worldwide. This bacterium is characterized by its various Cry toxins which act differently according to the target insect and are known for their synergistic activity when combined with each other. The cytolytic protein Cyt of *Bti*, toxic *in vitro* to mammalian cells, plays an essential role in *Bti* toxicity as it helps the activity of Cry toxins in the larval midgut by synergistic interactions and/or can act as a receptor of some Cry toxins. In this study, we characterized new *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Lebanese soils for their toxicity against three mosquito larvae *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* and *Anopheles gambiae* and for their hemolytic activity *in vitro*. One toxic *Bt* strain H3, which has non hemolytic activity, was selected for further investigations. Characterization was based on its *in vivo* toxicity assays, morphological study, genotyping analysis by BOX-PCR and plasmid profiles, identification of *cry* and *cyt* genes contents by PCR using general and specific primers for (*cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, variety of *cyt*, *cry39A*, *cry40Aa*, *cry40Ba*, *cry40Da* and *cry54*) genes, SDS-PAGE profile analysis of protein extracts as well as *in vitro* activation processes of their δ -endotoxins using the different larval extracts. Our results showed that H3 has lower toxicity than *Bti*. Its activity is dose dependent and differs among the three mosquitoes larvae. BOX-PCR and, plasmid profiles revealed significant differences between H3 and *Bti*. Interestingly, H3 showed a fragment of new variant *cry4B* gene and new variant of *cry40* gene known to encode a mosquitocidal activity. Accordingly, protoxin activation processes *in vitro* also indicate differences between H3 and *Bti*.

Keywords: Diptera, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *in vivo* toxicity, Cyt protein, *cry* genes, *cyt* genes, *cry4B* gene, *cry40* gene, *in vitro* activation.

1. Introduction

Microbial formulations emerge with the introduction of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as bio larvicides in the bio pesticides market (Regis, L., et al., 2001). Between the large number of *B. thuringiensis* strains active on insects, *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (*Bti*) was described as the reference strain that is commonly used as a biopesticide against diptera worldwide and known to be safe for human (Priest, F. G. 1992). *Bti* is characterized by eight circular plasmids, ranging from 5 to 210 kb (3,3 to 135 MDa) and a linear replicon of approximately 16 kb. The genetic information responsible of the mosquitocidal activity has been largely linked to a large conjugative plasmid: pBtoxis which is a mega plasmid of 128 kb containing several insertion sequences and co-integrative transposons that are commonly associated with insecticidal crystal protein encoding genes (Berry, C., et al., 2002; Carlton, B. C., et al., 1985 and Sekar, V. 1990). This plasmid carries the genes encoding Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa and Cyt2Ba toxins (Berry, C., et al., 2002). Cyt proteins have been characterized for their cytolytic activity *in vitro* to erythrocytes and other mammalian cells (Thomas, W. E., et al., 1983 and Corrêa, R. F. T., et al., 2012). In 2005, Wirth et al. have shown that the lack of resistance in *Bti* is due to the presence of the Cyt1Aa protein in the crystal (Wirth, M. C., et al., 1997 and 2005). *B. thuringiensis subsp. israelensis* has been used in the field with no development of insect resistance (Guillaume Tetreau, R. S., et al., 2013). In addition, Cyt A can potentiate the activity of the toxins by functioning as a receptor and participate in synergistic interactions that improve the high toxicity of *Bti* (Delécluse, A., et al., 1993). The mosquitocidal activity of a *Bti* is not only dependent on the additive effect of each toxin but a complex synergistic interaction between these toxins (Chang, C., et al., 1993 and Wu, D., et al., 1994).

The identification and characterization of non cytolytic *Bt* strain with toxic activity against dipteran larvae was the main objective of our study. 25 *Bt* strains, selected from our laboratory collection, were screened for their toxicity against dipteran larvae. The strains showing high or mild toxicity were subjected to a

screening of their hemolytic activity. One strain H3 was non-hemolytic but had an insecticidal activity much lower than *Bti*. This strain was characterized at genetic and protein level. H3 did not contain any of the previously described *cry* genes specific to *Bti* except a fragment of new variant *cry4B* and *cry40* genes known to encode a protein of mosquitocidal activity. H3 showed a dose dependent toxicity that differs among *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* and *Anopheles gambiae*. This non cytolytic strain showed a new potential mechanism involved in bio control.

2. Materials and Methods

Bacterial strains. Our reference *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Bti* (*Bacillus thuringiensis serovar israelensis* strain 1884) (Singer and Margalit) is identified by Huguet de Barjac of “Institut Pasteur” in 1979. The strain has the original code 1884 and number T14 0007 of the collection of entomopathogenic bacteria. 25 other *Bt* strains were selected from the Lebanese *Bt* collection library. *B. thuringiensis* strains were grown on a solid T3 medium: Tryptose 0,2 %, Tryptone powder 0,3 %, Yeast extract 0,15 %, Manganese sulfate hydrate ($\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) 0,0002 %, Magnesium sulfate hydrate ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) 0,002 %, Sodium hydrogenophosphate (Na_2HPO_4) 0,14 %, Sodium Dihydrogenophosphate (NaH_2PO_4) 0,12 %, Agar Agar granulated 2 %; pH = 6,8 at 30°C during 72h until sporulation was complete.

Bioassays. *In vivo* assays were conducted against different mosquito larvae reared at 27°C, 80 % relative humidity, and a 12:12 dark/light photoperiod: *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* and *Anopheles gambiae* in the laboratory of Dr. Mike Osta and Dr. Zakaria Kambris at the Department of Biology, American University of Beirut, Lebanon. Early three and fourth-instar larvae were placed in 200 ml of dechlorinated water. First of all, the *in vivo* tests were performed at many concentrations and at different time in order to fix the most accurate range of concentrations and the perfect time. After conducting the first *in vivo* tests covering different time and concentrations for each type of larvae, we settled up the more accurate conditions for each *in vivo* test as follow: six concentrations (5, 10, 20, 30, 40, and 50 µg/mL) of the spore-crystal complex of each mosquito strain were used (three biological and experimental replicates). Larvae were incubated at 27°C and examined after 4 h, 6 h, 24 h and 48 h.

Plasmid DNA extraction and PCR. From a colony of *Bt*, a pre-culture is prepared in 2 mL of liquid Luria-Bertani (LB) medium (Anderson, I., et al., 2005) for 6 hours at 30°C with shaking at 225 rpm. Three hundred microliters of this pre-culture are used to inoculate 6 mL of liquid LB and incubated 16-18 h at 30°C with shaking at 225 rpm. After this incubation, the cells are recovered by centrifugation for 5

minutes at 10,000 g. The DNA extraction was performed using standard alkaline lysis method of Sambrook et al. (1989) including the step involving lysozyme treatment (4 mg/mL of lysozyme (Lysozyme from chicken egg white, Sigma-Aldrich)) (Sambrook, J., et al., 1989). The DNA pellet was finally suspended in TE buffer and dosed using NanoDrop™. The DNA should be diluted to a final concentration of 0,1 µg/µL to serve as a PCR template using Thermo Scientific Taq DNA Polymerase. PCR mixtures were prepared as follow: for a final volume of 25 µL, we added: 2,5 µL of 10x Taq Buffer; 2 µL of MgCl₂ 2,5 mM; 0,5 µL of 10 mM dNTP Mix, 2 mM each; Primers F and R at 0,1 µM; 1,25 U of Taq polymerase and the sterilized water was added to complete the master mix volume to 23 µL. 2 µL of 0,1 µg/µL DNA was added to the master mix. PCR was carried out in a BioRad Thermal cycler as follows: 3 min at 95°C; 35 cycles of 95°C for 30 sec, annealing (Table 1) for 30 sec, and 72°C for 1 min/kb; and 5 min at 72°C. The PCR amplification was then checked on a 1 % agarose gel.

The sets of primers used in this study are listed in table 1.

Sequencing of PCR products. DNA was amplified using Thermo Scientific Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase. PCR mixtures were prepared as follow: for a final volume of 20 µL, we added: 4 µL of 5 x Phusion Green HF Buffer; 0,4 µL of 10 mM dNTPs; 1 µL of 10 µM Primers F and R; 0,2 µL of Phusion Taq and 13 µL sterilized water. 0,4 µL of 10 ng/µL DNA was added to the master mix. PCR was carried out in a BioRad Thermal cycler as follows: 30 sec at 98°C; 35 cycles of 98°C for 10 sec, annealing (Table 1) for 30 sec, and 72°C for 15-30 s/kb; and 10 min at 72°C. The PCR amplification was then loaded on a 1 % agarose gel. PCR products needed to be sequenced were purified with a QIAquick PCR Purification Kit as described by the manufacturer (Qiagen). Purified fragments were sequenced at “l’unité de génétique médicale” at la Faculté de Médecine, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Lebanon, by using the same primers used for PCR amplification. The sequences were analyzed using ChromasPro version 1.22 (Technelysium, Queensland, Australia), Blast

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Spore and delta-endotoxin production. The *B. thuringiensis* strains were grown in solid T3 medium at the optimal conditions for delta-endotoxin production. After 72 h, the cultures were examined under a light microscope. They were only composed of a mixture of spores, crystals and minor cell debris. The massive bacteria was collected and suspended in sterile water, mixed and centrifuged for 10 min at 6000 x g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet washed two times with 1 M sodium chloride buffer NaCl. After 5 min of centrifugation at 6000 x g at 4°C, the pellet was washed three times with room temperature sterile water. Then one aliquot of the spore-crystal mixtures was solubilized in 50 mM sodium hydroxide buffer NaOH (pH= 13,4) at 30°C for 2 h with constant shaking. After centrifugation for 10 min at 13 000 x g, solubilized delta-endotoxins were recovered within the supernatant. The concentrations of the different solubilized toxins were determined according to the method of Bradford (Bradford, M. M., et al., 1976).

Purification of the delta-endotoxins. From the massive 72 h culture of the different strains, the spore-crystal mixtures were collected and suspended in sterile water and centrifuged for 10 min at 6000 x g at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet washed two times with 1 M NaCl treated with 0,01 % Triton X100. After every centrifugation, the supernatant was discarded. The pellet was then washed four times with room temperature sterile water supplemented with few milliliters of hexane. The suspension was shaken by hand until foam is formed and then centrifuged 5 min at 6000 x g at 44 °C. The upper phase and the supernatant (rich in spores) were discarded. This procedure was repeated four times. Afterward, the pellet was washed by adding 5 mL of sterile water in order to remove cellular debris (Mounsef, J. R., et al., 2014). Finally, the pellet was re-suspended in 1 mL of sterile water and the concentrations of the purified delta-endotoxins were determined according to the method of Bradford (Bradford, M. M. 1976).

Protein activation with larval juice. Third instar larvae were chilled on ice for 30 min. Then, the dissection is carried out using sterile scalpel and forceps. Head of the larvae is cut with a scalpel and then the tail of the larvae is fixed with a clamp and intestine is removed. The whole larvae guts were collected in cold 1x MET buffer (Mannitol 300 mM; EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 5 mM; Tris, 20 mM; pH = 7,2) (Rouis, S., et al., 2007) and were mechanically disrupted using a blender and then centrifuged for 10 min at 13000 × g. The supernatants corresponding to larvae protease extract were recovered and the protein content concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford, M. M. 1976) using Bio-Rad reagent (Bio-Rad Protein assay, Cat. 500-0006). In order to activate the toxins by the larval juice, extracted delta endotoxins were solubilized in 50 mM Carbonate buffer Na₂CO₃ (pH = 10,5) overnight at 37°C with shaking. The day after, the dissolved proteins were assayed by the Bradford method, and the digestion was carried out with the different larval juice (*Aedes*, *Anopheles* and *Culex*) at the ratio of 1:20 (w/w) at 37°C for different time: 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 4 h, 24 h and 48 h. The reaction was stopped by adding the Laemmli sample buffer and boiling for 5 min. The activated proteins of each sample were separated on SDS-PAGE (10 %) (Laemmli, U. K. 1970 and Schagger, H., et al., 1987). Gels were stained with Coomassie blue dye to visualize the activation profile.

Genomic DNA extraction and Box-PCR. One colony from each strain was used for a 4 h pre-culture at 30°C in order to prepare the genomic DNA extraction. After 4 h, 500 µL of this pre-culture were taken for the inoculation of 10 mL LB medium and incubated for 16-18 h at 30°C with stirring. The isolation of genomic bacterial DNA is described according to the protocol of Marmur (1961) (Marmur, J. 1961). In this protocol, bacterial cells are disrupted by initial treatment with lysis buffer containing the enzyme, egg-white lysozyme, which hydrolyzes the peptidoglycan of the bacterial cell wall. The resultant cell walls are unable to survive osmotic shock consequently the bacteria lyse in the hypotonic environment. Then, the detergent, sodium dodecyl sulfate, (SDS, sodium dodecyl sulfate) was added to complete lysis by disrupting residual bacterial membranes and it reduces harmful

enzymatic activities (nucleases). Other chelating agents, citrate and EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), also inhibit nucleases by removing divalent cations. This protocol employs a variety of methods described in what follows to purify the bacterial DNA extracted. Perchlorate ion is used to dissociate proteins from DNA. Chloroform/Isoamyl/Alcohol denatures and precipitates proteins by lowering the dielectric constant of the aqueous medium. A centrifugation is needed to remove the precipitated material. DNA is then precipitate by absolute ethanol. The resultant DNA is dissolved and precipitated again with isopropanol and dissolved, after last centrifugation, in TER buffer ((1M Tris, pH = 8; 0,5 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) and 5 mg/mL RNase A) with incubation 1 h à 37°C. The genomic profile was observed on a 0,8 % agarose gel.

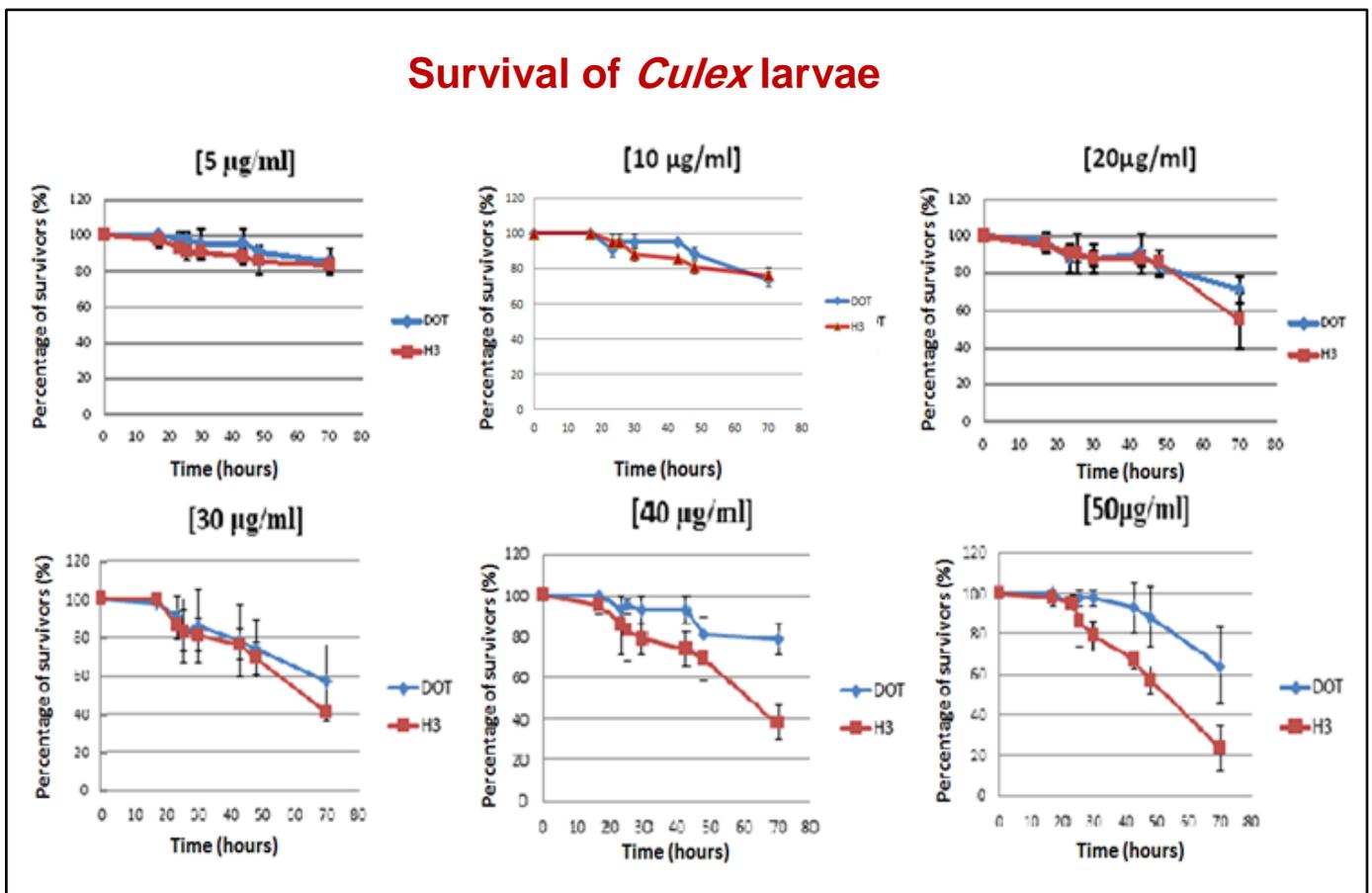
The box-PCR was performed on genomic DNA using BOX A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') known to amplify the box A subunit proved to be highly conserved with the evolution of Gram-positive bacteria (Versalovic J., et al., 1994). The master mix is composed of the following components: for a final volume of 23 μ L, 15,375 μ L of sterile water; 2,5 μ L of 10x Reaction Buffer; 2 μ L of $MgCl_2$, 0,5 μ L of 10 mM dNTPs, 2,5 μ L BOX A1R primer (10 μ M) and 1,25 U of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific Taq DNA Polymerase). 2,0 μ L of DNA template was added to the master mix. PCR was carried out in a BioRad Thermal cycler as follows: 6 min at 95°C; 35 cycles of 94°C for 1 min, annealing 53°C for 1 min, and 72°C for 8 min; and 16 min at 72°C. The PCR amplification was then loaded on a 1 % agarose gel.

3. Results and Discussion

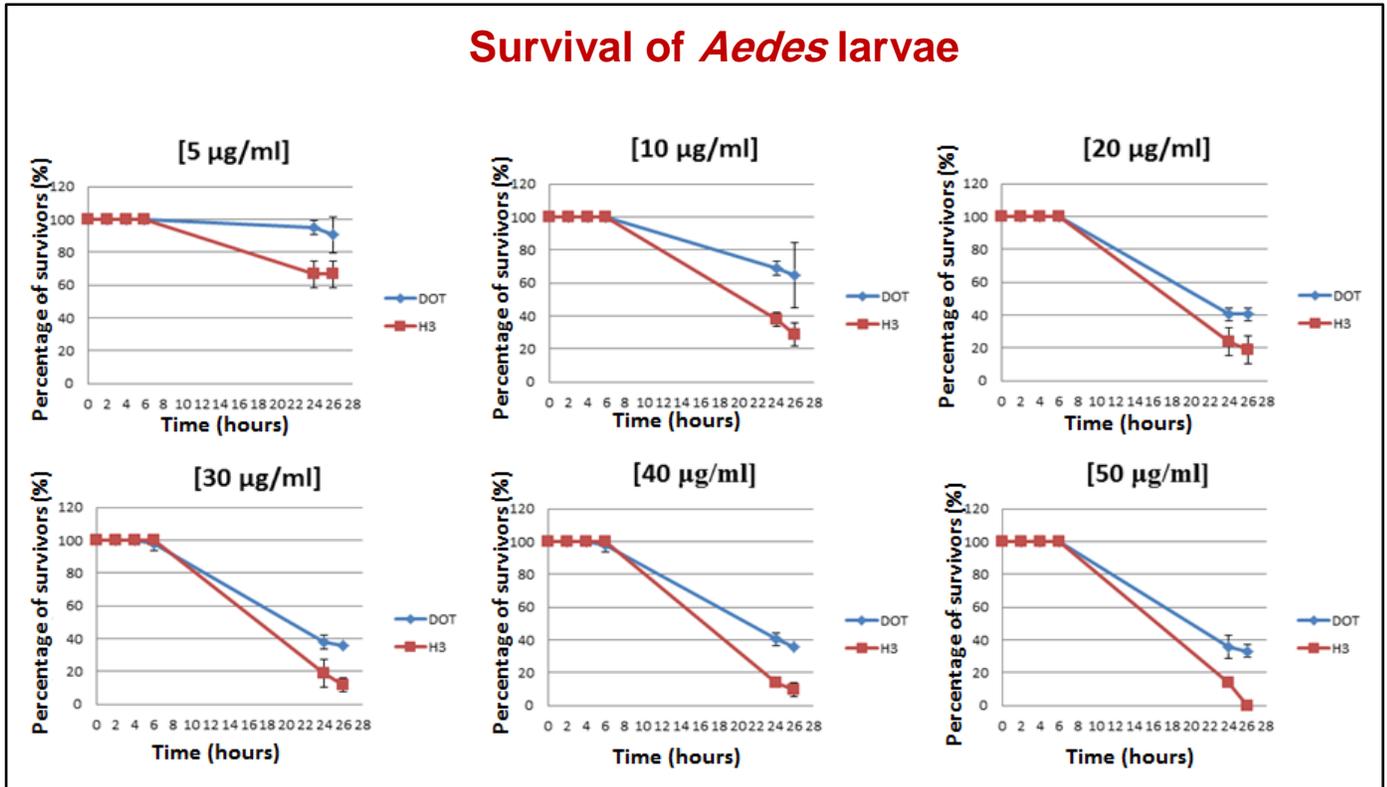
3.1. Isolation of the *Bt* strain H3

Twenty five *Bacillus thuringiensis* strains were selected from the Lebanese *Bt* collection library of our laboratory. These *Bt* strains (*Bti*, D15, D1, D3, D12, D23, H3, A5, D10, D5, D21, A23, DOT, D16, D27, NAR2, D11, NV1, D29, R3, M16, D4, D22, SLK1 and D25) were tested for their toxicity against the L3-L4 instars of three different mosquito larvae *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* and *Anopheles gambiae* (Annex 3 Fig 1A.1). Following the toxicity test, the hemolytic activity of each strain was investigated on blood agar plates. 2 strains, DOT and H3, were selected as non-hemolytic but toxic strains against Diptera for further investigations. In order to get an in-depth characterization of the killing potential of the selected strains, additional survival tests were performed using six bacterial concentrations (5, 10, 20, 30, 40, and 50 µg/mL) at different time points (Fig 1A). For all three tested larvae, H3 exhibited increasing toxicity effect with spore-crystal concentrations and time exposure. Starting from the concentration of 40 µg/mL, H3 is clearly more toxic than DOT to *Culex pipiens*. 70 hours post-infection, only 40 % of the larvae survived the H3 treatment whereas 80 % survived to DOT. In the case of *Aedes albopictus*, both strains are toxic 6 hours after infection with any of the used concentrations. However, H3 is more efficient than DOT as revealed by the survival curves. For example, at a concentration of 40 µg/mL, and after 26 h, DOT killed 60 % whereas H3 killed 90 % of the infected larvae. On *Anopheles gambiae*, we note that DOT has no toxicity even with an increase in the concentration through 25 h. Interestingly, H3 strain is toxic on these larvae with a concentration of 5 µg/mL. The lethality is noted as early as 4 h after the infection, and the rate of dead insects increases gradually with the augmentation of the spore-crystal concentrations. As an example, for a concentration of 5 µg/mL to 20 µg/mL, approximately 100 % of the larvae survive 4 h after the infection. However, for a concentration of 30 µg/mL, the survival rate drops to 85 %, then becomes 76 % for a concentration of 40 µg/mL and finally ends at 58 % for a concentration of 50 µg/mL. Altogether, these results indicate

that H3 has differential toxicity efficiency on the different insects used in this study. Notably it is more toxic to *Anopheles gambiae* than to *Aedes albopictus* and finally to *Culex pipiens* larvae. Even though high concentrations of H3 delta-endotoxins were needed to kill dipteran larvae compared to the dose needed to kill *Bti*, its toxicity behavior was different. In fact, *Culex* and *Aedes* are known to be more sensitive to the crystals of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* than *Anopheles* (Achille, G. N., et al., 2010).



Survival of *Aedes* larvae



Survival of *Anopheles* larvae

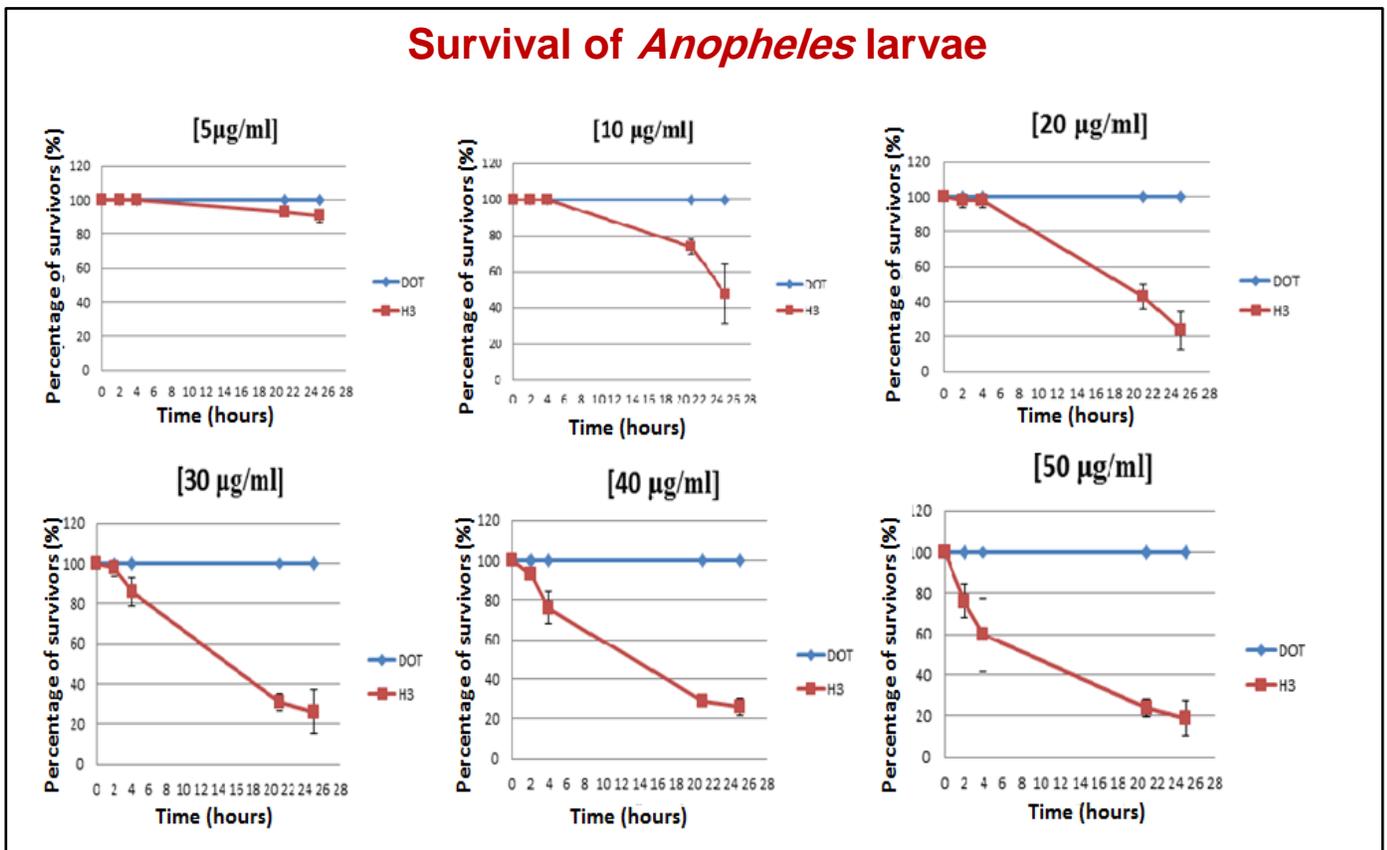


Fig 1A. Toxicity analysis of the H3 and DOT strains. The graphs represent the percentage of survivors (%) of dipteran larvae (*Aedes albopictus*, *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens*) through different concentrations (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL and 50 µg/mL) of the spore-crystal mixtures of the *Bt* strains and through different time.

3.2. Genetic characterization of H3 and *Bti* strains

Bacterial strains H3 and *Bti* isolated from soils and selected for further investigations are, at the beginning, only characterized morphologically. The corresponding colonies were off-white, opaque, with irregular outline and slightly raised elevation. H3 produced round shape crystals like *Bti*. The discrimination of closely related strains by morphological methods is limited; therefore, we used the genotyping methods in order to check whether H3 is genetically different than *Bti* (Cai, H. Y., et al., 2003). Throughout the bacterial genomes, there are a series of repetitive DNA sequences dispersed in multiple copies such as the 154 bp BOX elements. The consensus sequences of these elements were used in this study to amplify the DNA fragments located between the BOX elements in the *Bt* genome using the BOX-A1R primer (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (van Belkum, A., et al., 2001) that is conserved in many microbial genomes and was a singular concern in many previous studies (Lee, A., et al., 2009). The bands pattern obtained is shown in fig 2A. In fact, the genomic fingerprints of BOX-PCR consisted of 10 to 22 bands. *Bti* and H3 had only one band in common (Fig 2A, green arrow) and H3 and DOT had three bands in common (Fig 2A, red arrows). This BOX-PCR approach provided greater intra-species discrimination but sometimes it identified incorrectly some strains to the species level (Nayak, B. S., et al., 2011).

This diversity of *Bt* strains can also be pointed out through the study of their plasmid DNA profile. As we can notice in fig 2B, the plasmid profile of H3 is

completely different than that of *Bti*. Concerning this bacterial diversity approach, it is crucial to mention that plasmid patterns were always underestimated mostly because of the unreliability of the plasmid extraction techniques (Reyes-Ramírez, A., et al., 2008). According to the BOX-PCR and the plasmid DNA profiles, our results suggest that the H3 strain is genetically different from *Bti*.

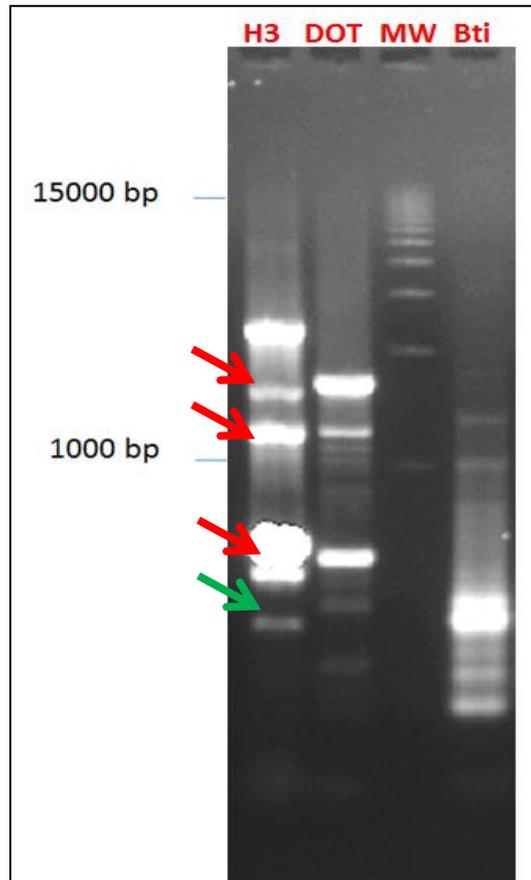


Fig 2A. Agarose gel electrophoresis of BOX-PCR fingerprintings patterns from genomic DNA of the strains *Bti*, H3 and DOT belonging to *Bacillus thuringiensis*. The reference strain *Bti* is provided from “Collection des Bactéries entomopathogènes T14 0007” (Institut Pasteur, France) and H3 and DOT are isolated from Lebanese soils. The molecular size marker MW is a 1 kb ladder (BioRad EZ loadTM). The red arrows represent the common bands between H3 and DOT; the green arrow shows the common band between H3 and *Bti*. This result is representative of 3 independent experiments.

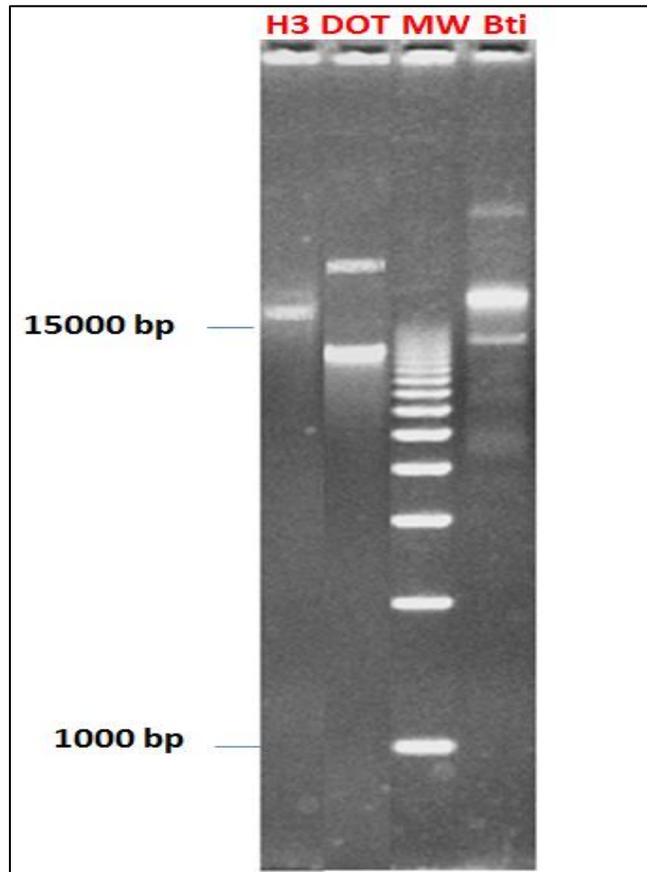


Fig 2B. Plasmid patterns of strains (*Bti*, H3 and DOT) of *Bacillus thuringiensis* in 0,8 % agarose gel. The molecular size marker MW is a 1 kb ladder (BioRad EZ load™). This result is representative of 3 independent experiments.

Because H3 strain showed a particular toxicity profile on the tested larvae, in the following analysis we investigated in details its *cry* and *cyt* gene content. PCRs were conducted using first specific primers targeting *Bti* *cry* and *cyt* genes (Table 1) (*cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* and variety of *cyt* genes) (Ben-Dov, E. 2014). Only a PCR product was detected with the set of primers Dip2A/Dip2B which targets the DNA fragment from 372 to 1664 nucleotides of the *cry4B* gene. This region encodes a part of domain I and the domain II of the corresponding protein. However, we could not amplify the DNA fragment within the 2182 to 2981 nucleotides of this gene by the specific primer pairs Dip1A/Dip1B. Other set of primers targeting other genes known to encode for

delta-endotoxin active against Diptera were used as well: S5un4/S3un4 which target *cry54* or *cry4A* or *cry4B* or *cry10A* genes, Up39.40-5/Up39.40-3 which target *cry40Ba*, *cry40Aa*, *cry39A*, *cry40Da* genes and UP30-5/UP30-3 which target *cry30Ga1* (Song, F. P., et al., 1998; Zhang, W., et al., 2012 and Elleuch, J., et al., 2014) (Table 1). H3 generated products of approximately 1000-1500 bp with the S5un4/S3un4 and Up39.40-5/Up39.40-3 primers (Fig 2C).

The PCR results suggest that different *cry* genes may exist within H3 strain. The amplified DNA fragments were therefore sequenced in order to verify their identity.

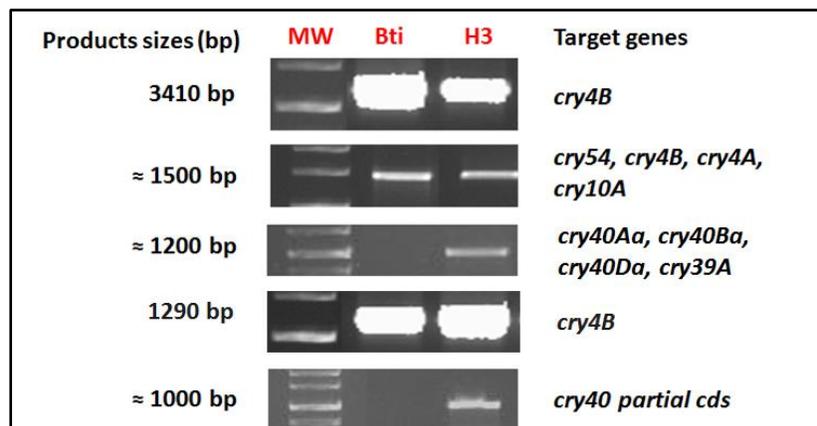


Fig 2C. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR amplification of *cry4B*, *cry4A*, *cry54*, *cry10A*, *cry40* and *cry39A* genes using specific primers (Table 1). The PCR reactions were performed on plasmid DNA extracted from *Bti*, H3 and DOT *Bt* strains. The molecular size marker MW is a 100 bp ladder (Fermentas). This result is representative of 3 independent experiments.

Table 1. List of primers designed and used in this study, their annealing temperature (°C), their sequences, the genes they recognized and the size of their expected PCR products (bp).

Primers	Annealing Temp (°C)	Sequence	Gene (s) recognized	Expected Products size (bp)	References
cry4A Start F	50.4	5'- ATGAATCCTTATCAAATAA-3'	<i>cry4A</i>	3542	This study
cry4A R4	62.1	5'-TCACTCGTTCATGCAAATTAAT-3'			
cry4B F	54.1	5'-CAGGCTATCCGTTAGCGA-3'	<i>cry4B</i>	3410	This study
cry4B R	47.4	5'-TCTTGATTCTCCTCACAA-3'			
P11 F	54.4	5'-TTTAAAATAAAAAAATCAATAAAA-3'	<i>cry11A</i>	862	This study
cry11 R4	65.1	5'-TAGTAACGGATTAATTTGCGTCGA-3'			
P10 F	45.9	5'-AGAAAAGAGTTGTGTCTA-3'	<i>cry10A</i>	1450	This study
cry10 R3	49.9	5'-TTAATTAACAAAATAATCATTC-3'			
Dip2A	52	5'-GGTGCTTCTATTCTTTGGC-3'	<i>cry4B</i>	1290	Carozzi et al. (1991)
Dip2B	50	5'-TGACCAGGTCCTTGATTAC-3'			
Dip1A	57	5'-CAAGCCGCAAATCTTGTGGA-3'	<i>cry4A, cry4B</i>	799	Carozzi et al. (1991)
Dip1B	51	5'-ATGGCTTGTTTCGCTACATC-3'			
UP30 F	60	5'-TTGGCTCAATATGTGTCAAAC-3'	<i>cry30Ga1</i>	1388, 1463, 1464, 1461	Zhang et al. (2012)
UP30 R	59	5'-GCTTAACAGCAGGAATTTG-3'			
Up39.40-5	64	5'-TAAGAGGTTTGTGGGAAGTAG-3'	<i>cry40Ba, cry40Aa, cry39A, cry40Da</i>	1005, 1001, 886, 890	Zhang et al. (2012)
Up39.40-3	64	5'-ACTTCTGGGAATACCTCTACTG-3'			
cry40 F1	57.1	5'-GTATGTCAGATGAACATCTCC-3'	<i>cry40 partial cds, cry39 like, cry40 like</i>	1381, 1403, 1725	This study
cry40 R867	59.8	5'-GGGAATCGACTGTACCAGT-3'			
SSUN4	60.1	5'-GTGTCAAGAGAACCAACAGTATG-3'	<i>cry54, cry4A, cry4B, cry10</i>	1548,1551, 1449,1467	Song et al. (1998)
S3UN4	57.1	5'-ACTAAGTCTCCTCTGTATGACCAG-3'			
cyt1Aa F	63	5'-CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT-3'	<i>cyt1Aa1, cyt1Aa2, cyt1Aa3, cyt1Aa4</i>	477	This study
cyt1Ab R	63	5'-TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT-3'			
cyt1Ba1 F	57	5'-GACAACCTCAATCCACAGCA-3'	<i>cyt1Ba1</i>	248	This study
cyt1Ba1 R	57	5'-GTAAGCAACAACAGCACCTT-3'			
cyt1Aa6 F	45	5'-GCAAGCAATTATGTTAGC-3'	<i>cyt1Aa6, cyt1Aa-like</i>	231	This study
cyt1Aa6 R	45	5'-GCAACTCTAATACAGTT-3'			
cyt1 Ab1 F	60	5'-ACCCTTGAAAAACCCCTCAA-3'	<i>cyt1Ab1</i>	535	This study
gral Cyt R	60	5'-GGTACACAATACATAACGCCACC-3'			
cyt2 F	43	5'-AATACATTTCAAGGAGCTA-3'	<i>cyt2Ba6, cyr2Ba7, cyt2Ba8, cyt2Ba10,</i>	471	This study
cyt2 R	43	5'-TTTCATTTAACTTCATATC-3'			
cyt2 Ca1 F	57	5'-GCAGCAAGGTACAGTCCAAG-3'	<i>cyt2Ca1</i>	227	This study
cyt2 Ca1 R	57	5'-CCCACCTGTTTCTCTACTCT-3'			
cyt1 Ba5 F	58.8	5'-CGCCAAACAATCCAATTTTC-3'	<i>cyt2Ba5</i>	225	This study
cyt1 Ba5 R	58.8	5'-TGCAAATGGTCTTCTCAATGC-3'			
cyt2 Ba-like F	59	5'-TGCAAATGGTATTCCTAATGCAGG-3'	<i>cyt2Ba-like</i>	131	This study
cyt2 Ba-like R	59	5'-TGATAACGAGCCCTAGCACAC-3'			
cyt2 Ab1 F	60	5'-CAGGTGCATTTATGGCCGTA-3'	<i>cyt2Bb1</i>	217	This study
Cyt2 Ab1 R	60	5'-TGGTTCGGATGATTGGATTGA-3'			
cyt2 Aa1 F	55	5'-GGCACTCCAATGCAAAAT-3'	<i>cyt2Aa1, cyt2Aa2, cyt2Aa3, cyt2Aa4</i>	222	This study
cyt2Aa1 R	55	5'-GCTTCATCTATTTGAGTGC-3'			
cyt2 F	46	5'-AATACATTTCAAGGAGCTA-3'	<i>cyt2Ba1, cyt2Ba2, cyt2Ba3, cyt2Ba4,</i>	193	This study
cyt2 Ba1 R	46	5'-TAACGAGCCCTAGCACACTTC-3'			

3.3. Consideration of genetic polymorphisms

The nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) of the sequence obtained with the Dip2A/Dip2B primers, showed 83 % identities with *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* delta-endotoxin (*cry4BLB*) gene, complete cds (Accession AY729887.1). Moreover, the blast of the sequence obtained with the primers S5un4/S3un4, known to target *cry54* or *cry4A* or *cry4B* or *cry10A* genes, showed 79 % identities with the same *cry4BLB* gene (Accession AY729887.1). The *cry4BLB* sequence and the sequence obtained with the Dip2A/Dip2B primers were both aligned to the sequences of all variant of *cry4B* gene (*cry4Ba1*, *cry4Ba2*, *cry4Ba3*, *cry4Ba4*, *cry4Ba5* and *cry4Ba-like*) retrieved from Neil Crickmore database (<http://www.btnomenclature.info/>). The sequence obtained with the Dip2A/Dip2B primers showed highly polymorphic region from 243 to 1040 nucleotides. The translation and the alignment of their corresponding protein sequences confirmed as well this high polymorphism (Fig 2D) found between the 98 and the 342 amino acid of the sequence. This sequence corresponds to domain I and II of Cry4Ba protein (domain I: Ile40 to Arg271 and domain II: Tyr272 to Val469 (Boonserm, P., et al., 2005)). These two domains are known to be responsible for the pore formation in the midgut membrane of the dipteran larvae and for the *Bt* toxins receptor binding (Boonserm, P., et al., 2005). Thus, we can conclude that H3 does not have the *cry4B* gene found in *Bti*, however, it had a new variant of this *cry4B* gene.

Moreover, the blast analysis of the sequence obtained from the PCR using the Up39.40-5/Up39.40-3 primers, hits the *Bacillus thuringiensis*, *cry40* gene partial cds with 73 % identity (Accession AY817148.1). Therefore, specific primers were designated to amplify this *cry40* gene partial cds (Accession AY817148.1). The PCR amplification yielded a product of approximately 1000 bp (Fig 2C). The sequencing of this product indicates that H3 has a new variant of that gene. In fact, the ncbi blast of the sequence obtained showed 88 % identities with *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawi* *cry40-like* and ORF2 genes for putative mosquitocidal toxins, hypothetical protein, complete cds (Accession AB112346.1).

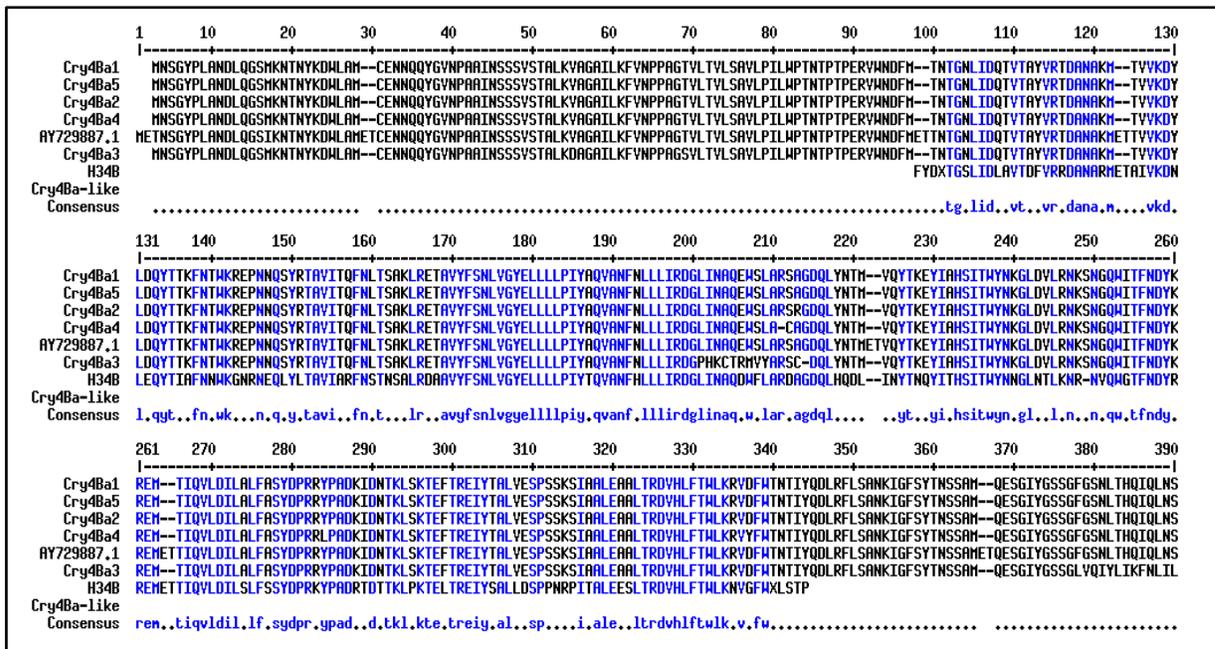


Fig 2D. Multiple alignments of protein sequences of H3 Dip2A/2B and Cry4B variant of Neil Crickmore database (Cry4Ba1, Cry4Ba2, Cry4Ba3, Cry4Ba4, Cry4Ba5 and Cry4Ba-like).

3.4. SDS PAGE profile analysis

The SDS-PAGE of spore-crystal suspensions of selected strains is shown in Fig 3. *Bti* had the major proteins of 130-135 (Cry4A/4B), 72 (Cry11A), 58 (Cry10A) and 27 kDa (Cyt1A) (Ibarra, J., et al., 1986). However, H3 and DOT are characterized by a very distinguished profile. H3 is characterized by two main proteins of 50 kDa and 70 kDa. Therefore, its bands could correspond to new types of Cry proteins with dipteran activity. Moreover, the *in vitro* activation processes of the strains' protoxins were conducted using trypsin and larval extract of *Aedes Albopictus*, *Culex pipiens* and *Anopheles gambiae* at different time points.

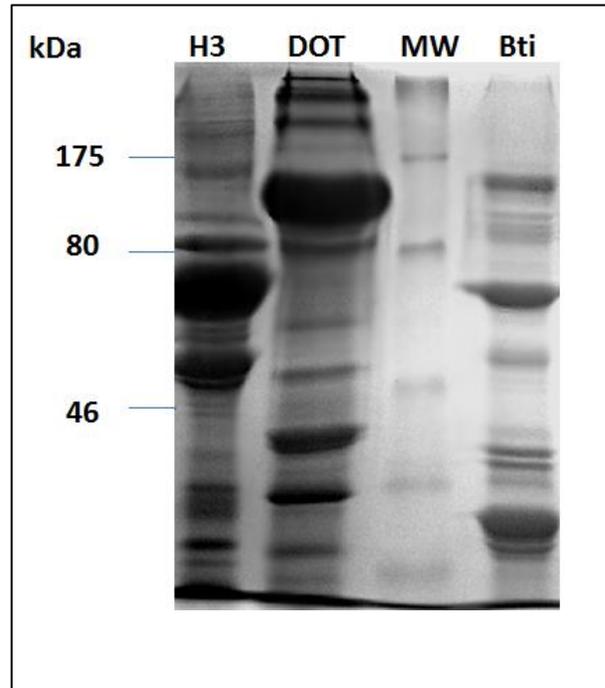
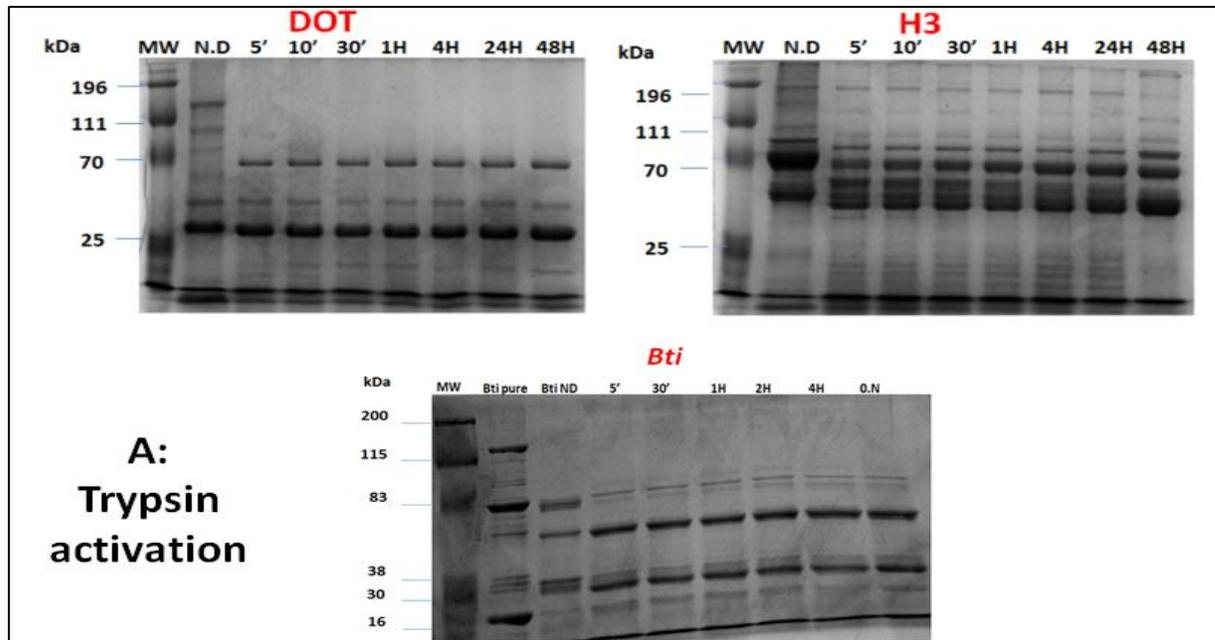


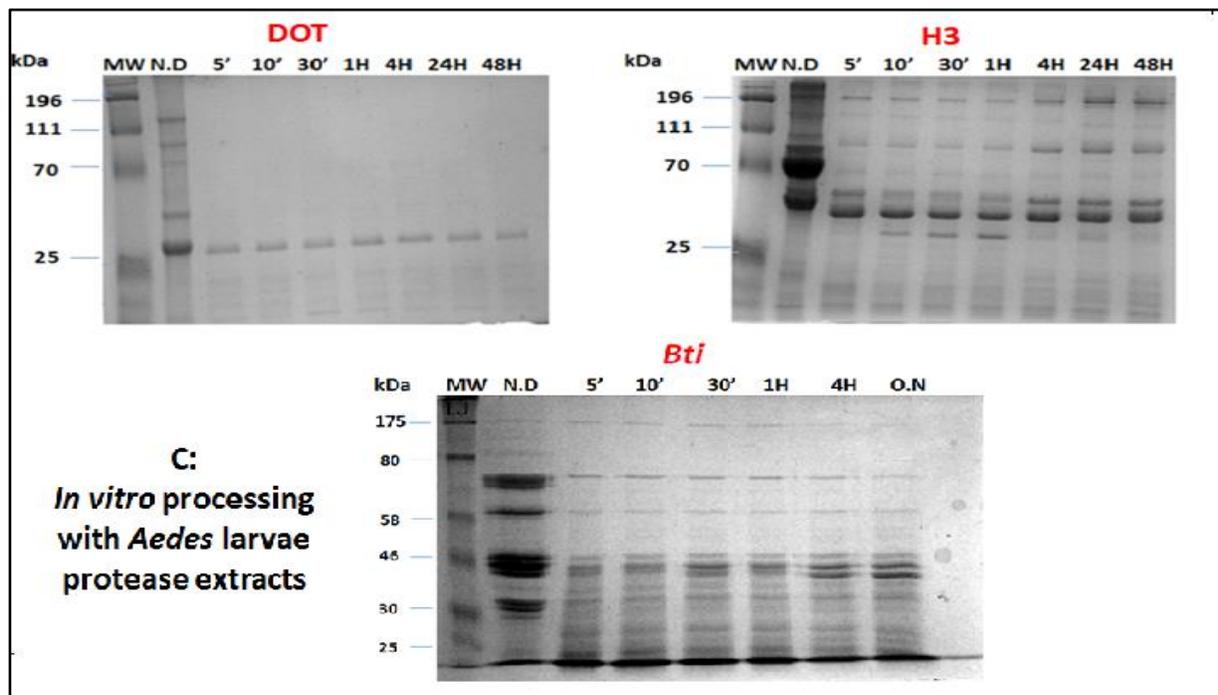
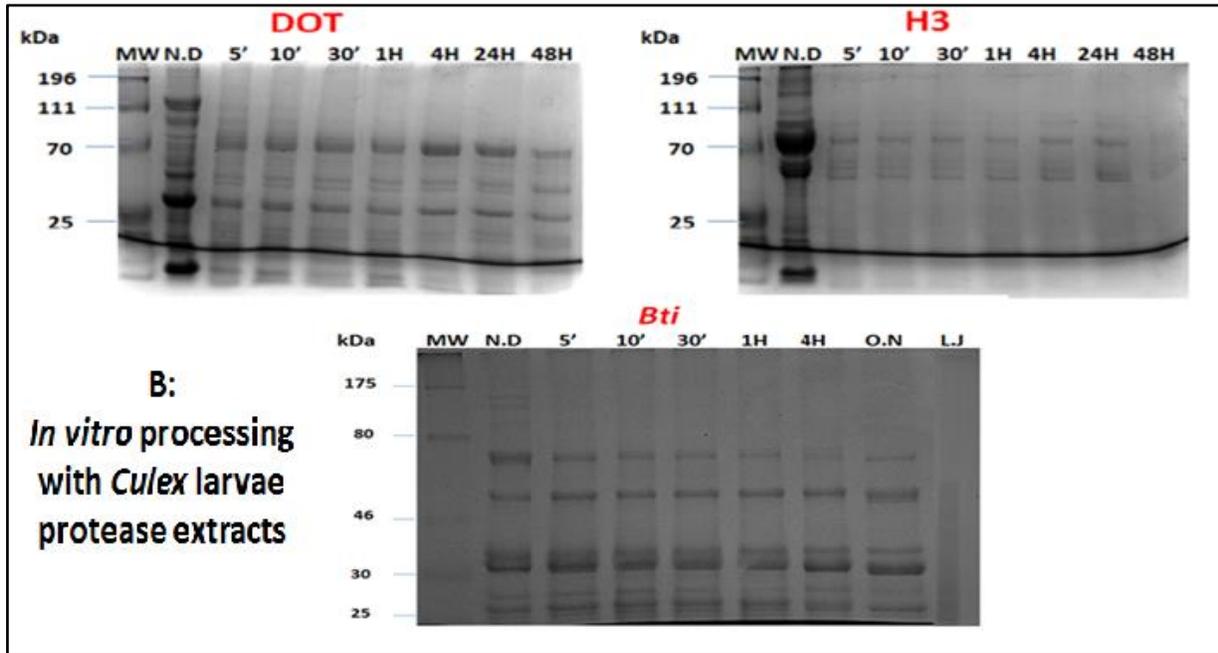
Fig 3. SDS-PAGE (10 % gel) of the spore-crystals mixtures of *Bti*, H3 and DOT *Bt* strains. The molecular weight (MW) is a BioLabs Prestained Marker Broad range #7708S from 7- 175 kDa. This result is representative of 3 independent experiments.

3.5. Parasporal protein activations with larval extracts *in vitro*

Active forms of H3 were detected quickly after 5 min of incubation with trypsin and stay stable till 48 h. However, trypsin didn't activate protoxins of DOT. With the different larval extracts, we can confirm that the digestion patterns of H3, DOT and *Bti* are very dissimilar (Fig 4A). In fact, in what follows, we will discuss only the *in vitro* processing of H3 which is our strain of interest. The profile obtained with *Culex* juice was comparable to that obtained with trypsin; nevertheless it was divergent from profiles obtained with *Anopheles* and *Aedes* larvae extracts. In the latest two profiles of H3, we noticed the presence of a 40 kDa protein band which didn't exist after *Culex* and trypsin treatment. This band appears in the entire wells equivalent to the activation kinetics by *Anopheles* larvae extract; though it only appeared after 10 min following the treatment with *Aedes* larvae extract and disappeared from 4 h of activation. We sequenced this

band to check for which active toxin she belongs and whether this protein is behind the toxicity against *Anopheles*. This 40 kDa band was sequenced by ThermoScientific LTQ Orbitrap XL™ Hybrid FT Mass Spectrometer LC-MS/MS. The two insecticidal proteins Cry4Aa and Cry11Aa were identified in the band but at a low score (Fig 4B); knowing that the PCR didn't reveal any of the genes which encode these proteins.





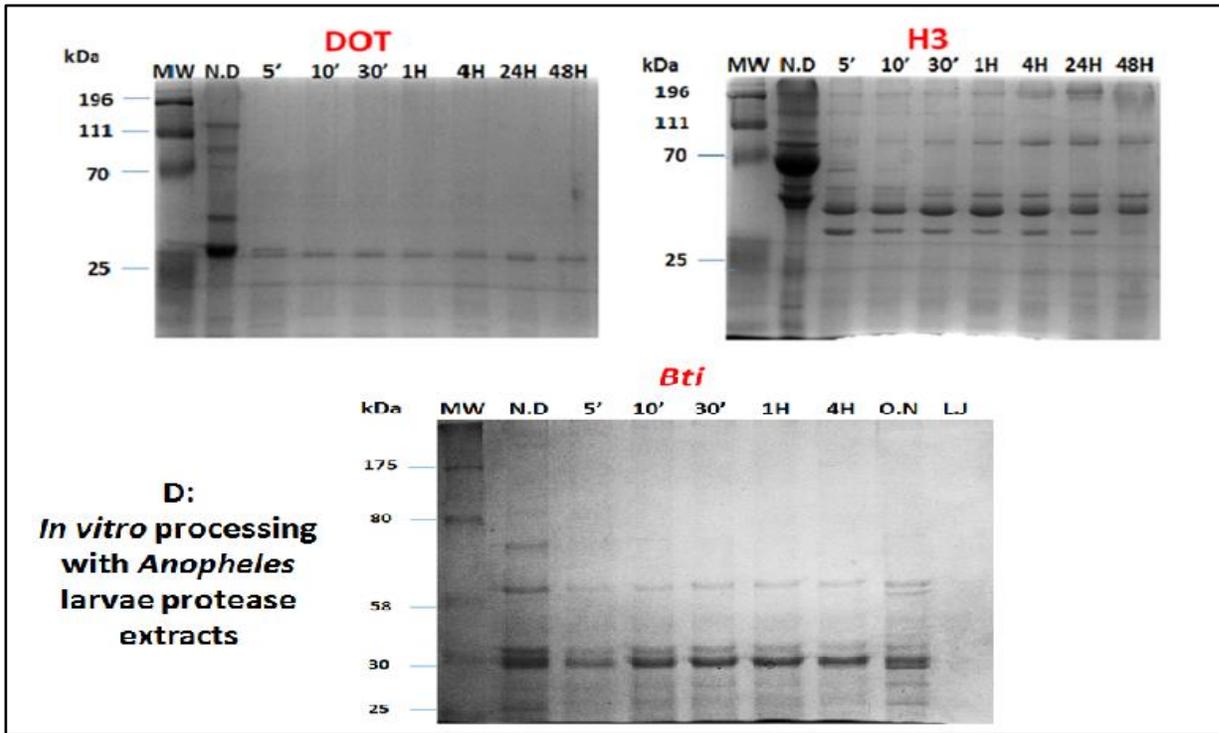


Fig 4A. *in vitro* processing of *Bti*, H3 and DOT with Trypsin (A), *Cx. pipiens* larvae protease extract (B), *Ae. albopictus* larvae protease extract (C) and *An. gambiae* larvae protease extract (D) after different incubation periods: 5 min (5'), 10 min (10'), 30 min (30'), 1H, 4H, 24H and 48H. N.D: Non digested protoxins; MW: Molecular weight BioRad Kaleidoscope™ Prestained Standards from 6-196 kDa for H3 and DOT patterns and BioLabs Prestained Marker Broad range #7708S from 7- 175 kDa for *Bti* patterns.

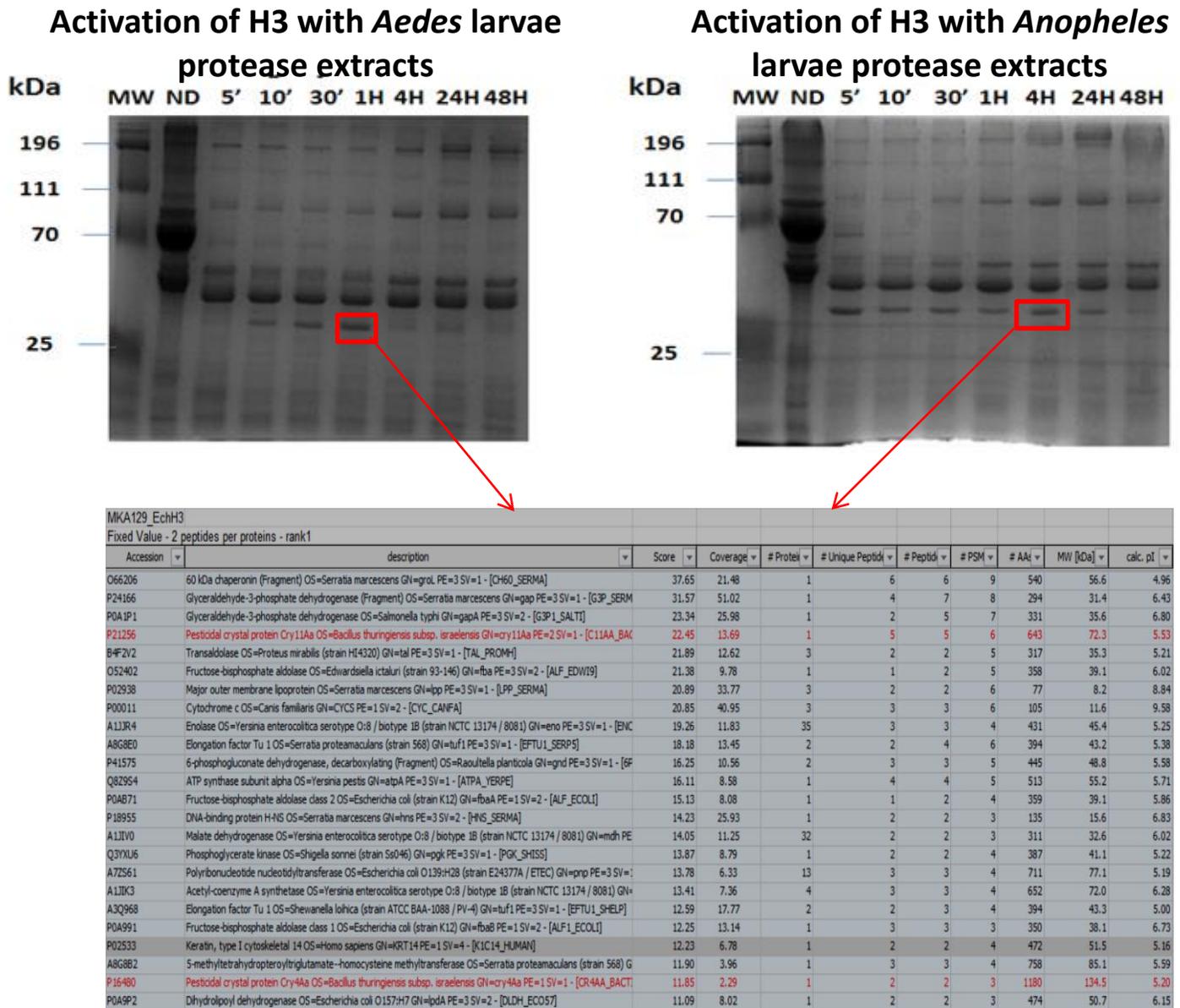


Fig 4B. Sequencing results of the 40 kDa band squared in red (ThermoScientific LTQ Orbitrap XL™ Hybrid FT Mass Spectrometer LC-MS/MS). The rows highlighted in the excel sheet are the two insecticidal proteins Cry4Aa and

4. Conclusion

The present study evidenced a new non cytolytic strain of *B. thuringiensis* H3 isolated from Lebanese soils and producing spherical crystals as *Bti*. Particularly, H3 showed, in the absence of Cyt, a dose dependent *in vivo* activity that differs depending on mosquitoes' species. In the absence of the synergistic activity due to Cyt, this toxicity could be explained first of all by the presence in H3 of a new variant of *cry4B* gene and secondly by the finding of a new variant of *cry40* gene in H3. Thus, future characterization of these *cry* gene and *in vivo* tests using H3 strain supplemented with Cyt will be our main focus in order to investigate in the new toxicity mechanism.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRS L) and from Université Montpellier 2 (UM2-France) and Saint-Joseph University Research Council FS59.

References

Achille, G. N., H. S. Christophe, et al. (2010). "Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) on Culex, Aedes and Anopheles larvae (Cotonou; Benin)." Stem Cell **1**(1): 60-8.

Anderson, I., et al., (2005). "Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis* ." FEMS Microbiol Lett **250**(2): 175-84.

Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, et al. C. (1992). "Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo." FEMS Microbiology Letters **94**(1): 63-68.

Berry, C., S. O'Neil, et al. (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Applied and environmental microbiology **68**(10): 5082-5095.

Boonserm, P., P. Davis, et al. (2005). "Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications." Journal of molecular biology **348**(2): 363-382.

Boonserm, P., M. Mo, et al. (2006). "Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution." Journal of bacteriology **188**(9): 3391-3401.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248–254.

Cai HY, A. M., Gyles CL, Prescott JF. (2003). "Molecular genetic methods in veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. ." Animal Health Res Rev. **4**: 73-93.

Carlton, B. C. and J. M. Gonzalez Jr (1985). "Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*." Molecular biology of microbial differentiation: 246-252.

Carozzi, N. B., V. C. Kramer, et al. (1991). "Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles." Applied and environmental microbiology **57**(11): 3057-3061.

Chang, C., Y. M. Yu, S. M. Dai, S. K. Law, and S. S. Gill. (1993). "High-level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. ." Appl. Environ. Microbiol. **59**: 815–821.

Chilcott CN and E. DJ. (1988). "Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro." J Gen Microbiol. **134**(9): 2551-8.

Clarridge, J. E. (2004). "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases." Clinical microbiology reviews **17**(4): 840-862.

Corrêa, R. F. T., D. M. P. Ardisson-Araújo, et al. (2012). "Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells." e46121.

Crickmore, N., E. J. Bone, et al. (1995). "Contribution of the individual components of the delta endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." FEMS Microbiology Letters. **131**(3): 249-254.

Delécluse, A., S. Poncet, et al. (1993). "Expression of *cryIVA* and *cryIVB* genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus*

thuringiensis subsp. *israelensis*." Applied and environmental microbiology. **59**(11): 3922-3927.

Du, L., Xie,Y., Wang,J., Wang,R., Cao,W., Song,J. and Feng,S. (2008). "*cry22A* gene from *Bacillus thuringiensis*." Institute of Plant Protection, Hebei, Academy of Agricultural and Forestry Sciences, 437 Dongguan Street, Baoding, Hebei 071000, China.

Elleuch, J., S. Tounsi, et al. (2014). "Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae)." Journal of invertebrate pathology. **124**: 90-97.

FP, S. (1998). "Identification of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* isolates by PCR-RFLP system." Master Thesis, Northeast Agricultural University, Harbin.

Guillaume Tetreau, R. S., Jean-Philippe David and Laurence Després. (2013). "Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately." Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **108**(7): 894-900.

Ibarra, J., and B. A. Federici. (1986). "Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity." FEMS Microbiol Lett **34**: 79–84.

Ibarra, J. E., and B. A. Federici. (1987). "An alternative bioassay for determining the toxicity of suspended particles to mosquito larvae." J. Am. Mosq. Control Assoc. **3**: 187–192.

Jackson, G. W., R. J. McNichols, et al. (2006). "Bacterial genotyping by 16S rRNA mass cataloging." BMC bioinformatics. **7**(1): 321.

Koeuth, T., J. Versalovic, et al. (1995). "Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria." Genome Research. **5**(4): 408-418.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature. **227**(5259): 680-685.

Lee, A., and E. Wong. (2009). "Optimization and robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using Trout Lake *E. coli* isolates." J. Exp. Microbiol. Immunol. **13**: 104-113.

Li, W., D. Raoult, et al. (2009). "Bacterial strain typing in the genomic era." FEMS microbiology reviews. **33**(5): 892-916.

Margalith, Y. and E. Ben-Dov (2000). "Biological control by *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Insect pest management: techniques for environmental protection. **200**: 243-301.

Marmur, J. (1961). "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms." Journal of molecular biology. **3**(2): 208-IN1.

Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, and R. Hakenbeck. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucleic Acids Res. **20**: 3479–3483.

Masashi Y, R. O., Kohki Y, Hisako N, Kikuo S, Hiroshi S. (2002). "Active form of dipteranspecific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Biosci Biotechnol Biochem. **66**: 516–22.

Miranda R, F. Z., Bravo A. (2001). "Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation. ." *Insect Biochem Mol Biol.* **31**: 1155–63.

Nayak, B. S., B. Badgley, et al. (2011). "Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental Enterococcus isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing." *Applied and environmental microbiology* **77**(14): 5050-5055.

Priest, F. G. (1992). "Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*." *Journal of applied bacteriology* **72**(5): 357-369.

Regis, L., M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, and J.-F., Charles. (2001). "Bacterial larvicides of dipteran disease vectors. ." *Trends Parasitol.* **17**: 377–380.

Reyes-Ramírez, A., Ibarra, J.E., (2008). " Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. ." *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 125–129.

Rouis, S., M. Chakroun, et al. (2007). "Proteolysis, histopathological effects, and immunohistopathological localization of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the midgut of lepidopteran olive tree pathogenic insect *Prays oleae*." *Molecular biotechnology* **35**(2): 141-148.

Sambrook, J. and W. Russell David (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Vol. 3, Cold spring harbor laboratory press.

Sarrafzadeh, M. H., J. P. Guiraud, et al. (2005). "Growth, sporulation, δ -endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14." *Current microbiology* **51**(2): 75-81.

Schagger, H., and G. von Jagow. (1987). "Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. ." Anal. Biochem. **166**: 368–379.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, L. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." Microbiol. Mol. Biol. Rev **62**: 775–806.

Sekar, V. (1990). "Genetics of *Bacillus thuringiensis israelensis*." In Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies; de Barjac, H., Sutherland, D.J., Eds. Rutgers University Press New Brunswick, NJ, USA: 66-77.

Song, F., Zhang, J., Huang, D., Xie, T., Yang, Z., Dai, L., Li, G., (1998). "Establishment of PCR-RFLP identification system of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis*." Sci. Agric. Sin. **31**: 19–24.

Tang, J. D., A. M. Shelton, et al. (1996). "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*)." Applied and environmental microbiology **62**(2): 564-569.

Thomas, W. E. and D. J. Ellar (1983). "*Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo." Journal of Cell Science **60**(1): 181-197.

van Belkum, A. and P. W. M. Hermans (2001). BOX PCR fingerprinting for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*. Antibiotic Resistance, Springer: 159-168.

Versalovic J., S. M., de Bruijn F.J., Lupski J.R., (1994). "Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction." Methods. Mol. Cell. Biol. **5**: 25–40.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, et al. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study." Journal of bacteriology **173**(2): 697-703.

Wirth, M. C., Georghiou, G. P., Federici, B. A. (1997). "CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(20): 10536-10540.

Wirth, M. C., H.-W. Park, et al. (2005). "Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*." Applied and environmental microbiology **71**(1): 185-189.

Wu, D., J. J. Johnson, et al. (1994). "Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*." Molecular microbiology. **13**(6): 965-972.

Yang, A. and C. Yen (2012). "PCR Optimization of BOX-A1R PCR for microbial source tracking of *Escherichia coli* in waterways." J Exp Microbiol Immunol. **16**: 85-89.

Zhang, W., Crickmore, N., George, Z., Xie, L., He, Y.Q., Li, Y., Tang, J.L., Tian, L., Wang, X., Fang, X., (2012). "Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*-an alternative to Bti? " J. Invertebr. Pathol. **109**: 217–222.

Discussions générales et perspectives

En vue de maintenir le développement durable, protéger l'Homme contre les moustiques vecteurs de maladies et l'environnement contre les phytoravageurs, la lutte biologique contre les diptères trouve son essor ces dernières décennies. Effectivement, sans lutte contre ces insectes, les maladies, les mauvaises herbes et les pertes de récoltes peuvent être très considérables. Au niveau mondial, selon une estimation d'Oerke et Dehne en 1997, elles seraient de l'ordre de 400 milliards de dollars (Oerke, E.-C., et al., 1997). Les maladies transmises par les moustiques présentent un problème majeur de la santé publique, et leur prévalence a augmenté d'une façon spectaculaire dans le monde entier (Baird, G. S., et al., 2000, Lebl, K., et al., 2015 ; Kampen, H., et al., 2014 et WHO, 2014). Pour y remédier, l'usage excessif des pesticides chimiques a été une solution néfaste puisqu'ils provoquent d'importants risques sur la santé de l'Homme et des animaux, des contaminations des eaux, des sols et des dommages aux niveaux des végétations (Igbodion, S. O. 1991 et Aktar, W., et al., 2009). Comme agent de bio contrôle efficace, les bio pesticides viennent remplacer les pesticides chimiques pour cette lutte biologique. Particulièrement, les bio pesticides à base de la bactérie *Bacillus thuringiensis israelensis* fut mise en valeur depuis 1976 et s'est montrée d'une efficacité majeure du fait de la présence sur son plasmide pBtoxis de gènes codants pour les protéines Cry (Cry4A/4B, Cry11A, Cry10A et Cyt1A) dont leurs activités insecticides ont été étudiées sur un spectre larve de diptères. *Bti* se caractérise par son potentiel d'adaptation efficace et rapide face à des perturbations très importantes de son environnement (rayons UV ou X, antibiotiques, résistance des insectes aux toxines de *Bti*...) (Ramirez-Peralta, A., et al., 2012 ; Leclerc, H., et al., 1975 et Millet, J., et al., 1960). Cette bactérie appartient au genre *Bacillus* qui appartient au phylum des *Firmicutes*.

350 souches de *Bacillus thuringiensis* sont déjà répertoriées dans notre laboratoire et elles ont été isolées des sols de chênes et de pins Libanais. Vu que les forêts de chênes et de pins constituent les deux types de végétation les plus répandues au Liban (Communication personnelle avec Pr. Magda Boudagher Kharrat), nous nous sommes fixés comme premier objectif d'étudier

la diversité bactérienne de ces deux sols et il s'est avéré intéressant de comparer cette diversité à celle des mêmes sols de géographie différente, l'Autriche. Dans ce cadre, une collaboration a été établie entre notre laboratoire et le laboratoire de biotechnologie de Graz afin de répondre à cet objectif. En effet, il s'agissait de deux sols de géographie, de climat, de végétation et de communautés bactériennes différents. Le sol est un répertoire de plusieurs microorganismes ayant des fonctions diverses dans les processus de fonctionnement des sols et la conservation de sa végétation (Daniel, R. 2005). Parmi les stratégies de bio contrôle, il est primordiale de caractériser la diversité bactérienne des sols des quels nous puisons nos souches bactériennes. Cette approche fait intervenir plusieurs paramètres et méthodes d'analyse. Il s'agit en fait d'utiliser des indices de mesure de la biodiversité des sols qui prennent en compte la complexité de chacune des communautés bactériennes, leur distribution géographique, leur évolution suite au changement de climat et évidemment toutes les différences possibles existantes. A ce niveau, l'indice de Shannon Wiener et les diversités alpha et bêta sont utilisées dans le chapitre 1 de ce manuscrit dans le but d'étudier les phyla bactériens constituant les sols de chênes et de pins étudiés, puis particulièrement la caractérisation et la distribution des communautés de *Firmicutes* et leur abondance au sein de ces sols-là (Saeki, Y., et al., 2014). Des méthodes moléculaires de génotypage (SSCP et qRT-PCR) et de séquençage à haut débit (IlluminaSeq) ont servi pour étudier cette diversité bactérienne. Les résultats de cette étude de diversité basée sur les régions hypervariables V3, V4 et V5 du gène 16S ARNr de ce premier chapitre ont montré que chaque sol selon sa localisation, son climat et son type de végétation, se caractérise par certains phyla bactériens qui sont spécifiques à son écosystème et certains phyla se trouvent communément dans les quatre sols mais en différentes abondances. Le phylum des *Firmicutes* a été particulièrement étudié puisqu'il renferme les bactéries sporulantes du genre *Bacillus* intéressantes en lutte biologique. Ce genre a été omniprésent et très abondant dans les sols de chênes et de pins Libanais et Autrichiens. Il a été démontré aussi que la biodiversité des *Firmicutes*, relative aux mêmes types de

sols, varie selon les sites géographiques. En effet, les sols de chênes dans les deux pays se sont révélés plus diversifiés en communautés de *Firmicutes* que les sols de pins. Les communautés bactériennes sont spécifiques à chaque type de végétation (chênes et pins) qui influencent le sol et son écosystème puisqu'ils sont en dynamique continue. En résumé, nous concluons de cette première étude que les sols de chênes sont plus abondant en *Firmicutes* que les sols de pins et ceci dans les deux pays. Une panoplie d'explications probables pour ces résultats se présente : des sols différents, caractérisés par des végétations différentes qui ensemble influencent la microflore ; les caractéristiques physicochimiques des sols ; le microclimat des sols... (Schimel, J. 1995 ; Balsler, T. C., et al., 2002 ; Buckley, D. H., et al., 2002 ; Haase, S., et al., 2008 et Kandeler, E., et al., 2006). Afin de mieux élucider la diversité bactérienne des sols, les méthodes d'analyse des ADNs et des ARNm doivent être combinées avec l'approche protéomique dans le but d'accéder à des mesures de l'expression des protéines dans le sol.

De ces deux types de végétation les plus répandues au Liban, 25 souches de *Bacillus thuringiensis* ont été criblées pour leur activité contre les diptères vecteurs de maladie. Trois modèles de diptères ont servi pour les tests *in vivo*: *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* et *Anopheles gambiae*. J'ai ensuite réussie à identifier parmi les bactéries criblées une souche A23 plus toxique que la souche mondialement connue *Bti* contre les trois modèles de diptères. D'un autre point de vue, une autre souche H3 non cytolytique a été aussi identifiée et possède une activité diptéricide *in vivo* même en absence de la protéine Cyt. Son activité s'est révélée inférieure à celle de *Bti* qui en revanche possède Cyt. Les caractéristiques génétiques et moléculaires des deux souches A23 et H3 ont été élucidées afin de comprendre leur particularité.

La souche A23 a été plus toxique contre les diptères que la souche mondialement connue *Bti*. Sa toxicité *in vivo* contre les larves de *Culex* a montré une LC_{50} de 0,0068 $\mu\text{g/mL}$ qui est inférieure à celle de *Bti* (LC_{50} (*Bti*) = 0,0073 $\mu\text{g/mL}$). Contre *Aedes*, A23 s'est montrée 2.6 fois plus toxique que *Bti* (LC_{50}

(A23) = 0,0071 µg/mL et LC_{50} (*Bti*) = 0,0182 µg/mL), et finalement contre *Anopheles*, A23 est 1.4 fois plus toxique que *Bti* (LC_{50} (A23) = 0,0245 µg/mL et LC_{50} (*Bti*) = 0,0338 µg/mL). Ces calculs statistiques de la LC_{50} ont été effectués à des temps précis selon la susceptibilité de chaque type de larves de diptères aux suspensions spores-cristaux des souches bactériennes (2h30 pour *Culex*, 3h30 pour *Anopheles* et 5 h pour *Aedes*). Toutefois, *Anopheles* a nécessité des doses de létalité plus importantes que *Culex* et *Aedes* et cela repose sur la façon et la rapidité de s'alimenter et de s'adapter durant leur cycle de croissance (Mahmood, F. 1998). Afin de comprendre cette toxicité *in vivo* élevée de A23, son contenu en gènes *cry* et *cyt* a été étudié révélant la même composition que la souche de référence *Bti*. Aucun polymorphisme de séquences n'a été trouvé au niveau de ces gènes-là chez A23 par comparaison aux gènes *cry* de la base de données de Neil Crickmore. De même, les profils protéiques SDS-PAGE reflètent un contenu protéique identique entre ces souches (*Cry4A/Cry4B*, *Cry11A*, *Cry10A* et *Cyt1A*). Cependant, seule l'activation *in vitro* des delta-endotoxines de la souche A23 s'est montrée différente de celle de *Bti* et ceci pour les trois types de larves. Par conséquent, nous proposons l'étude par qRT-PCR du niveau de transcription des gènes *cry4A*, *cry4B*, *cry11A*, *cry10A* et *cyt1A* et de l'activité de leur promoteur chez A23 comme explication probable de cette toxicité élevée (D'haene, B., et al., 2010). De plus, l'identification de nouvelles protéines à activité diptéricide non découvertes jusqu'à là chez *Bti* est également une piste à envisager. Le séquençage de la bande de 25 kDa obtenu dans le profile protéique de A23 est également nécessaire afin de déterminer son contenu protéique et d'identifier probablement une nouvelle protéine responsable de cette toxicité. En 2010, Zhu, J., et al. ont identifié chez une souche de *Bacillus thuringiensis* isolée en Chine (HS18-1) deux protéines *Cry4Cb1* et *Cry30Ga1* non présentes chez *Bti* et ayant des activités insecticides sur *Aedes aegypti* (pour *Cry4Cb1*) et *Aedes aegypti* et *Plutella xylostella* (pour *Cry30Ga1*) (Zhu, J., et al., 2010). Nous proposons aussi le séquençage entier du génome de la souche A23 dans le but de la caractériser entièrement (Li, Q., et al., 2015). Cette dernière perspective est en cours de traitement.

Dans un troisième chapitre, j'ai projeté d'étudier l'activité insecticide contre les mêmes diptères d'une souche non cytolytique H3 de *Bt*. Cette souche H3 ayant un cristal rond comme *Bti* a montré une toxicité faible *in vivo* contre les larves de diptères en utilisant des concentrations de suspensions spores-cristaux relativement élevée (de l'ordre de 5 à 50 µg/mL) par rapport à la dose utilisée avec *Bti*. H3 ne possède qu'une partie du gène *cry4B* amplifié par les amorces Dip2A/Dip2B et qui, après séquençage et alignement avec les variants *cry4B* de la base de données de Neil Crikmore, n'a montré aucune similarité en termes de bases nucléotidiques et en acides aminés. Cependant les amorces Dip1A/Dip1B qui sont censées reconnaître le gène *cry4B*, n'ont pas donné d'amplicon pour la souche H3. Une étude du gène entier de cette souche-là doit être effectuée afin de valider si cette souche possède un nouveau variant du gène *cry4B* ou si la protéine Cry4B de H3 a été tronquée ce qui explique alors sa faible toxicité *in vivo*. L'étude génique de cette souche a révélé la présence d'un variant du gène *cry40* qui est connu pour son activité diptéricide. De plus, le profil protéique de H3 ainsi que l'activation de ses delta-endotoxines *in vitro* par les différents jus larvaires montrent des profils différents de *Bti*. A ce niveau, en plus de l'étude plus approfondie du gène *cry4B* de H3 et *cry40*, nous prévoyons d'introduire le gène *cyt* chez H3 et de suivre sa toxicité *in vivo* dans le but d'étudier l'importance de la protéine Cyt dans le mécanisme de toxicité contre les larves de diptères ainsi que les synergismes qu'elle assure (Wu, D., et al., 1994 et Perez C., et al., 2005). Ceci a été fait en 2014 sur la souche *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BNS3) dans laquelle le gène Cyt1A a été introduit afin d'augmenter sa toxicité contre les larves de lépidoptères et d'empêcher la résistance (Elleuch, J., et al., 2014).

Conclusion générale

Explorer la diversité bactérienne des sols et en tirer profit est la base pour la formulation d'agent de bio contrôle efficace en lutte biologique. En 2006, Sarthou J.P. a dit qu'une loi en écologie nous apprend qu'en règle générale les écosystèmes sont d'autant plus stables et résistants à des perturbations extérieures qu'ils sont biodiversifiés. La diversité bactérienne des sols desquels nous isolons nos souches bactériennes devrait être étudiée en profondeur. La protection des agricultures contre les attaques des phytoravageurs ainsi que la protection de l'Homme contre les moustiques piqueurs constituent deux thématiques essentielles de nos jours afin d'assurer un environnement sain et durable. Ceci nous incite à développer des agents de bio contrôle bénéfiques pour l'environnement et efficaces dans le but d'éviter l'apparition de résistance sur le champ.

L'usage du bactério insecticide *Bti* représente aujourd'hui une très bonne alternative aux insecticides chimiques. Cela est dû à sa spécificité et son activité insecticide élevée envers les diptères et à l'absence d'une évolution rapide de la résistance. Toutefois, les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que des formulations d'agent de bio contrôle à base de la souche A23 peuvent être testées sur les champs puisqu'elle a montré une toxicité *in vivo* plus élevée que *Bti*. Davantage, dans certains cas, la souche H3 non cytolytique pourrait servir pour la lutte biologique mais à des doses supérieures que *Bti*. En effet, cette souche pourrait être utilisée pour lutter spécifiquement et rapidement contre les larves d'*Anophèles* qui sont connues d'être moins sensibles aux toxines de *Bti*.

Des identifications supplémentaires de nouvelles souches actives sur les diptères et plus efficaces que *Bti* doivent être développées afin d'élaborer continuellement de nouveaux moyens de lutte biologique. Plusieurs souches bactériennes combinées ensemble ayant des activités insecticides élevées et variées sur différents types d'insectes pourront aussi composer un bénéfique cocktail pour la lutte biologique.

Annexes

Annexe 1

1. Table representing the percentage of the different taxons analyzed at Phylum level

# Constructed from biom file				
Taxonomy	ANL	LNL	ABL	LBL
Unassigned;Other	1.39	4.12	1.49	3.36
k_Archaea;p_Crenarchaeota	0.42	0.29	0.29	2.87
k_Bacteria;p_Acidobacteria	10.06	17.91	11.63	12.76
k_Bacteria;p_Actinobacteria	20.78	3.02	13.84	9.09
k_Bacteria;p_Armatimonadetes	0.39	0.75	0.19	1.39
k_Bacteria;p_Bacteroidetes	9.05	16.02	7.11	9.62
k_Bacteria;p_Chloroflexi	1.34	12.98	4.76	8.06
k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0.28	0.52	0.08	18.06
k_Bacteria;p_Firmicutes	0.23	0.23	0.58	1.04
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes	1.00	0.85	2.81	2.68
k_Bacteria;p_Nitrospirae	0.00	0.18	3.73	0.14
k_Bacteria;p_Planctomycetes	11.99	8.81	8.67	7.90
k_Bacteria;p_Proteobacteria	33.89	24.40	31.14	15.87
k_Bacteria;p_TM7	0.73	1.44	0.23	0.40
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	6.13	7.15	11.66	5.22
k_Bacteria;p_WPS-2	1.32	0.08	0.03	0.05

2. Table representing the percentage of the different taxons analyzed at Class level

# Constructed from biom file				
Taxonomy	ANL	LNL	ABL	LBL
Unassigned;Other;Other	1.4	4.1	1.5	3.4
k_Archaea;p_Crenarchaeota;c_Thaumarchaeota	0.3	0.2	0.2	2.8
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Acidobacteria-6	2.0	13.7	5.6	3.7
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Acidobacteriia	4.3	0.0	0.9	0.0
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Solibacteres	1.8	0.8	1.3	0.5
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_[Chloracidobacteria]	0.7	2.9	2.1	8.1
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Acidimicrobiia	1.3	0.7	1.2	0.8
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria	12.4	1.8	8.3	4.3
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Rubrobacteria	0.0	0.0	0.3	2.1
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Thermoleophilia	7.1	0.5	3.9	1.8
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Cytophagia	0.2	4.8	1.1	3.5
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Flavobacteriia	0.3	1.9	1.3	1.0
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Sphingobacteriia	4.6	3.3	1.3	0.8
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_[Saprosirae]	3.9	5.8	3.4	4.1
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Anaerolineae	0.4	8.9	1.8	2.8
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Chloroflexi	0.0	1.1	0.4	1.0
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Thermomicrobia	0.1	1.0	0.4	2.7
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_	0.0	0.0	0.0	2.6
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Nostocophycideae	0.0	0.0	0.0	1.9
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Oscillatoriohycideae	0.0	0.0	0.0	11.3
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Synechococcophycideae	0.0	0.0	0.0	1.7
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli	0.2	0.2	0.5	1.0
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes;c_Gemm-3	0.0	0.2	0.0	1.2
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes;c_Gemmatimonadetes	0.8	0.3	1.9	1.1
k_Bacteria;p_Nitrospirae;c_Nitrospira	0.0	0.2	3.7	0.1
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Phycisphaerae	6.7	2.4	2.2	4.8
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia	5.2	5.6	5.8	3.0
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria	19.8	9.7	16.4	8.7
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria	3.6	3.9	6.1	3.0
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria	3.2	4.4	5.1	2.9
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria	7.2	6.4	3.5	1.3
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Opitutae	0.6	1.4	0.2	0.6
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Verrucomicrobiae	0.3	1.4	0.1	0.3
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Pedosphaerae]	1.6	1.1	2.5	0.2
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Spartobacteria]	3.0	3.2	8.7	4.2
k_Bacteria;p_WPS-2;c_	1.3	0.1	0.0	0.0
k_Bacteria;p_WS3;c_PRR-12	0.0	0.1	1.0	0.0

3. Table representing the percentage of the different taxons analyzed at Genus level

Taxonomy	ANL	LNL	ABL	LBL
o_Bacillales;Other;Other	2.82	3.32	0.79	1.62
o_Bacillales;f_;g_	0.00	4.06	1.11	3.25
o_Bacillales;f_Bacillaceae;Other	1.41	0.74	1.74	0.74
o_Bacillales;f_Bacillaceae;g_	0.00	2.21	0.32	1.01
o_Bacillales;f_Bacillaceae;g_Bacillus	11.27	22.14	16.30	34.75
o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_	0.00	0.00	1.11	1.08
o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Ammoniphilus	0.00	1.48	0.16	0.07
o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Cohnella	0.00	0.37	4.75	4.94
o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Paenibacillus	14.08	3.69	50.16	16.97
o_Bacillales;f_Planococcaceae;Other	1.41	2.95	2.06	12.98
o_Bacillales;f_Planococcaceae;g_	0.00	0.74	0.00	2.03
o_Bacillales;f_Planococcaceae;g_Paenisporosarcina	1.41	0.74	3.01	3.04
o_Bacillales;f_Planococcaceae;g_Planomicrobium	0.00	0.00	0.32	1.28
o_Bacillales;f_Planococcaceae;g_Sporosarcina	1.41	9.59	0.16	0.47
o_Bacillales;f_Staphylococcaceae;g_Macrococcus	1.41	0.00	0.00	0.00
o_Bacillales;f_Staphylococcaceae;g_Staphylococcus	22.54	7.01	2.53	3.04
o_Bacillales;f_Thermoactinomycetaceae;Other	1.41	0.37	0.00	0.07
o_Bacillales;f_Thermoactinomycetaceae;g_Planifilum	2.82	0.74	0.00	0.00
o_Bacillales;f_Thermoactinomycetaceae;g_Shimazuella	0.00	0.74	0.79	1.01
o_Bacillales;f_[Exiguobacteraceae];g_Exiguobacterium	1.41	0.00	0.00	0.00
o_Lactobacillales;f_;g_	0.00	1.85	0.63	0.68
o_Lactobacillales;f_Aerococcaceae;g_	1.41	0.37	0.16	0.00
o_Lactobacillales;f_Aerococcaceae;g_Aerococcus	2.82	0.37	0.32	0.27
o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae;g_Lactococcus	1.41	1.85	0.63	0.20
o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae;g_Streptococcus	7.04	4.43	1.58	0.74
o_Turicibacterales;f_Turicibacteraceae;g_Turicibacter	2.82	0.00	0.00	1.28
o_Clostridiales;f_;g_	1.41	0.74	1.42	0.07
o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_	0.00	4.06	0.63	0.27
o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Clostridium	4.23	2.58	1.42	0.41
o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;Other	1.41	0.00	0.16	0.00
o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_	0.00	1.11	0.32	0.14
o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blautia	0.00	1.11	0.47	0.27
o_Clostridiales;f_Peptococcaceae;g_	0.00	1.11	0.00	0.00
o_Clostridiales;f_Peptostreptococcaceae;g_Tepidibacter	1.41	0.00	0.00	0.00
o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_	4.23	1.11	0.79	0.54
o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium	1.41	0.00	0.00	0.07
o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Ruminococcus	0.00	1.11	0.16	0.14
o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_	2.82	0.00	0.00	0.00
o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_Sporomusa	0.00	2.58	0.00	0.00
o_Clostridiales;f_[Tissierellaceae];g_Anaerococcus	2.82	2.21	0.79	0.81
o_Clostridiales;f_[Tissierellaceae];g_Finegoldia	0.00	1.48	0.00	0.07
o_Clostridiales;f_[Tissierellaceae];g_Peptoniphilus	1.41	1.11	0.47	0.27

Annexe 2

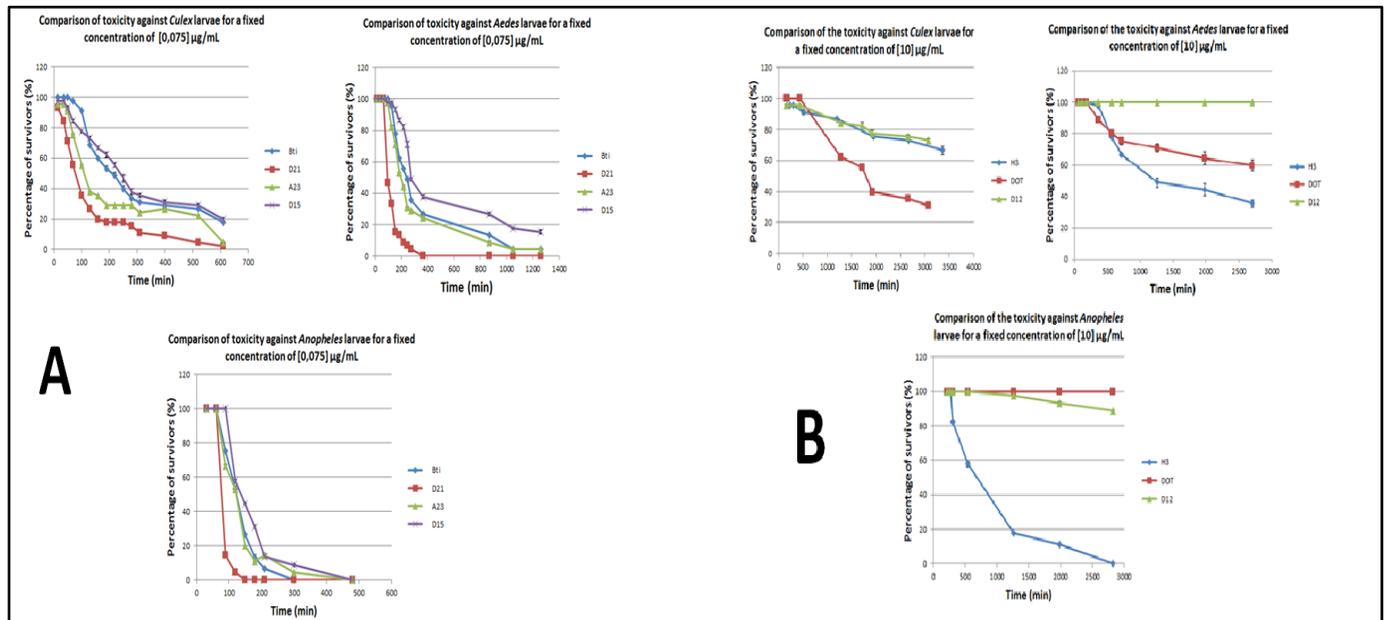


Fig 1A.1. Comparative toxicity analysis of the highly toxic *Bt* strains (*Bti*, D15, A23 and D21) and the *Bt* strains with low toxicity (H3, DOT and D12). The graphs represent the percentage of survivors (%) of dipteran larvae through different time for a fixed concentration of the spore-crystal mixtures : **A.** the survivors count was performed for a concentration of 0,075 µg/mL for the highly toxic strains and **B.** the survivors count was performed for a concentration of 10 µg/mL for the strains with low toxicity.

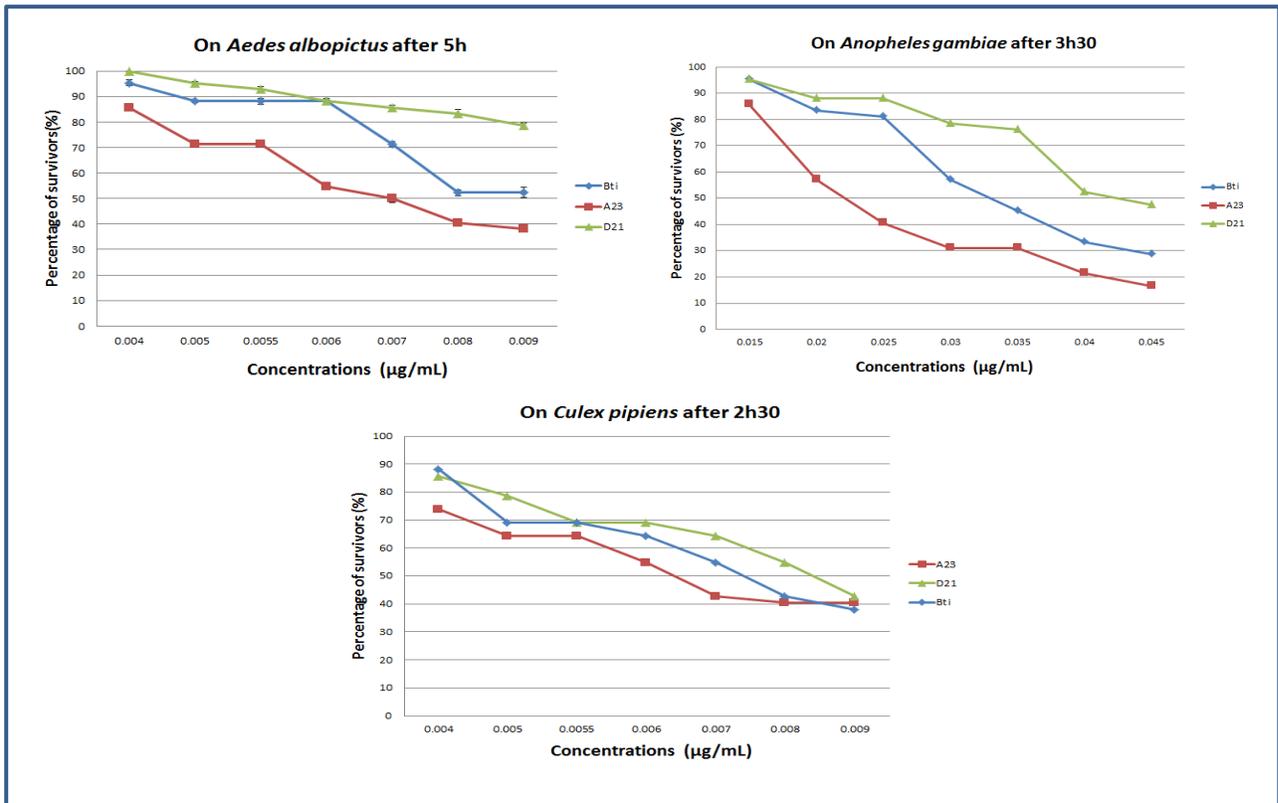


Fig 1A.2. Toxicity analysis of the three most toxic strains *Bti*, D21 and A23. The graphs represent the percentage of survivors (%) of dipteran larvae through different concentrations of the spore-crystal mixtures of the *Bt* strains using a fixed time for each mosquito: the survivors count was performed after 5 h of incubation with spore-crystal mixtures for *Aedes*, after 3h30 for *Anopheles* and 2h30 for *Culex*. In all the graphs, the red curve is the toxicity of A23, the blue one for *Bti* and the green curve for D21 respectively.

Annexe 3

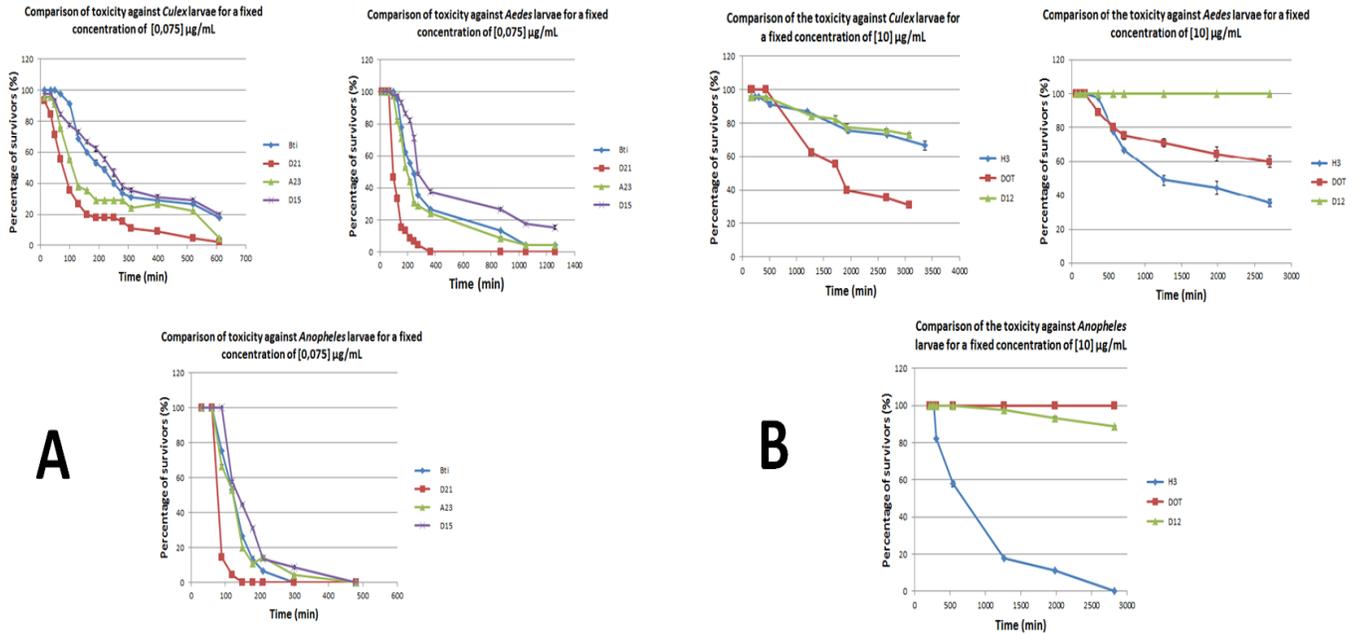


Fig 1A.1. Comparative toxicity analysis of the highly toxic *Bt* strains (*Bti*, D15, A23 and D21) and the *Bt* strains with low toxicity (H3, DOT and D12). The graphs represent the percentage of survivors (%) of dipteran larvae through different time for a fixed concentration of the spore-crystal mixtures: **A**. the survivors count was performed for a concentration of 0,075 µg/mL for the highly toxic strains and **B**. the survivors count was performed for a concentration of 10 µg/mL for the strains with low toxicity.

Références

Abdoarrahem, M. M., K. Gammon, et al. (2009). "Genetic basis for alkaline activation of germination in *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Appl Environ Microbiol **75**(19): 6410-3.

Abdullah, M. A., O. Alzate, et al. (2003). "Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering." Appl Environ Microbiol **69**(9): 5343-53.

Abdullah, M. A. F., A. P. Valaitis, et al. (2006). "Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*." BMC biochemistry **7**(1): 16.

Adekambi, T., P. Berger, et al. (2006). "rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov." International journal of systematic and evolutionary microbiology **56**(1): 133-143.

Agaisse, H. and D. Lereclus (1995). "How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?" Journal of bacteriology **177**(21): 6027.

Agrawal, N., P. Malhotra, and R.K. Bhatnagar, (2002). "Interaction of gene-cloned and insect cellexpressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C." Appl Environ Microbiol **68**(9): 4583-92.

Ahn, K. and A. Kornberg (1990). "Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate." Journal of Biological Chemistry **265**(20): 11734-11739.

Ajit, N. S., Verma, R., and Shanmugam, V. (2006). "Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi causing carnation wilt." Curr. Microbiol. **52**: 310-316.

Akiyama, M., E. Crooke, et al. (1993). "An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon." Journal of Biological Chemistry **268**(1): 633-639.

Aktar, W., D. Sengupta, et al. (2009). "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards." Interdisciplinary Toxicology **2**(1): 1-12.

Al-yahyaee, S. A. S. and D. J. Ellar (1995). "Maximal toxicity of cloned CytA δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis requires proteolytic processing from both the N-and C-termini." Microbiology **141**(12): 3141-3148.

Alexander M. (1982). "Most probable number method for microbial populations." In: Page AI., Muller RH., Keeney DR. Methods of soil analysis (Part 2). Chemical and microbiol properties (2nd ed.). Madison, Wisconsin: ASA-SSSA.: 815-820.

Ali, A. (1981). "*Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis (ABG-6180) against chironomids and some non-target aquatic invertebrates." J. Invertebr. Pathol. **38**: 264-272.

Ali, A., R. Xue, et al. (1994). "Evaluation of Granular Corn-cob Formulations of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis Against Mosquito Larvae Using a Semi-Field Bioassay Method." J. Amer. Mosq. Cont. Assoc **10**(4): 492-495.

Anderson, I., et al., (2005). "Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol Lett **250**(2): 175-84.

Andersson, A. F., M. Lindberg, et al. (2008). "Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing." PloS one **3**(7): e2836-e2836.

Ang, B. J. and K. W. Nickerson (1978). "Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation." Applied and environmental microbiology **36**(4): 625-626.

Angst, B. D., C. Marozzi, et al. (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." Journal of Cell Science **114**(4): 629-641.

Angsuthanasombat, C. (2010). "Structural Basis of Pore Formation by Mosquito-larvicidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*." The Open Toxinology Journal **3**: 119-125.

Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, et al. (1992). "Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo." FEMS Microbiol Lett **73**(1-2): 63-8.

Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, et al. (1993). "Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB δ -endotoxin." FEMS microbiology letters. **111**(2-3): 255-261.

Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, et al. C. (1992). "Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo." FEMS Microbiology Letters **94**(1): 63-68.

Angsuthanasombat, C., P. Uawithya, et al. (2004). "*Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity." BMB Reports **37**(3): 304-313.

Angsuthanasombat, C., P. Uawithya, et al. (2004). "*Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity." J Biochem Mol Biol **37**(3): 304-13.

Aptosoglou, S. G., A. Sivropoulou, and S.I. Koliais, (1997). "Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* strains and isolates." Microbios **91**(368-369): 203-14.

Armstrong JL, R. G., Beaudreau GS (1985). "Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis subsp israelensis*." J Bacteriol **161**: 39–46.

Aronson, A. (2002). "Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*." Cell Mol Life Sci **59**(3): 417-25.

Aronson, A. I. and Y. Shai (2001). "Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action." FEMS microbiology letters **195**(1): 1-8.

Aronson, A. I., D. Wu, et al. (1995). "Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene." Journal of bacteriology **177**(14): 4059-4065.

Aronson, J. N., D. P. Borris, et al. (1975). "γ-Aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*." Applied microbiology. **30**(3): 489-492.

Avignone-Rossa, C. and C. F. Mignone (1995). "*Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Basic and applied considerations." Mol Biotechnol **4**(1): 55-71.

Awad, M. K., I. n. Saadaoui, et al. (2007). "Differentiation between *Bacillus thuringiensis* strains by gyrB PCR-Sau3AI fingerprinting." Molecular biotechnology **35**(2): 171-177.

Back, C., J. Boisvert, et al. (1985). "High-dosage treatment of a Quebec stream with *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis: efficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects." The Canadian Entomologist **117**(12): 1523-1534.

Baird, G. S., D. A. Zacharias, et al. (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(22): 11984-11989.

Baker, G. C., J. J. Smith, et al. (2003). "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers." Journal of Microbiological Methods **55**(3): 541-555.

Balaban, N. P., et al., (2003). "Synthesis and secretion of *Bacillus intermedius* proteinases in the late stages of sporulation." Mikrobiologija **72**(3): 338-42.

Banerjee-Bhatnagar, N. (1998). "Modulation of Cry IV A Toxin Protein Expression by Glucose in *Bacillus thuringiensis* israelensis." Biochemical and biophysical research communications **252**(2): 402-406.

Banerjee-Bhatnagar, N. (1999). "Inorganic phosphate regulates CryIVA protoxin expression in *Bacillus thuringiensis* israelensis." Biochemical and biophysical research communications **262**(2): 359-364.

Barjac, H. d. (1981). "Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*." Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980.

Barlow, D. J. and J. M. Thornton (1988). "Helix geometry in proteins." Journal of molecular biology **201**(3): 601-619.

Barloy, F., A. Delécluse, et al. (1996). "Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. malaysia, encoding a

new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins." Journal of bacteriology **178**(11): 3099-3105.

Barrett, A. J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases, Academic Press.

Barrett, A. J., J. F. Woessner, et al. (2012). Handbook of proteolytic enzymes, Elsevier.

Baum, J. A. and T. Malvar (1995). "Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*." Molecular microbiology **18**(1): 1-12.

Baumann, P., B. M. Unterman, et al. (1985). "Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors." Journal of bacteriology **163**(2): 738-747.

Bayyareddy, K., T. M. Andacht, et al. (2009). "Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae." Insect biochemistry and molecular biology **39**(4): 279-286.

Bechtel DB, B. L. (1982). "Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation." J Ultrastruct Res **79**: 121-32.

Bechtel, D. B., L.A. Bulla, Jr., (1976). "Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. ." J Bacteriol **127**(3): 1472-81.

Becker, N., and Margalit, J. (1993). "Use of *Bacillus thuringiensis* israelensis against mosquitoes and blackflies. ." In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental

biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York.: 147-170.

Beebee T., K. A., Bond R.P. (1972). "Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei." Biochem. J. **127**: 619–634.

Beegle, C. C., T. Yamamoto, (1992). "History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research an development." Can Ent **124**: 587-616.

Ben-Dov, E. (2014). "*Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and its dipteran-specific toxins." Toxins **6**(4): 1222-1243.

Ben-Dov, E., G. Nissan, et al. (1999). "Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis plasmid carrying the mosquito larvicidal genes." Plasmid **42**(3): 186-91.

Ben-Dov, E. B., S.; Zaritsky. A. (1995). " Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." J. Bacteriol. **177**: 2851–2857.

Bent, S. J. and L. J. Forney (2008). "The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity." The ISME journal **2**(7): 689-695.

Berón, C. M. (2005 Feb). "New Strategy for Identification of Novel cry-Type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains." Appl Environ Microbiol. **71**(2): 761–765.

Berón, C. M. and G. L. Salerno (2007). "Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*." Current microbiology **54**(4): 271-276.

Berry, C., S. O'Neil, et al. (2002). "Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Appl Environ Microbiol **68**(10): 5082-95.

Berthelin, J., S. de Cara, et al. (2010). "La vie cachée."

Besenicar, M. P. and G. Anderluh (2010). "Preparation of Lipid Membrane Surfaces for Molecular Interaction Studies by Surface Plasmon Resonance Biosensors." N.J. de Mol, M.J.E. Fischer (eds.) , Surface Plasmon Resonance, Methods in Molecular Biology.

Bietlot, H. P. (1990). Characterization of the insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, University of Ottawa (Canada).

Bietlot, H. P., et al., (1990). "Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*." Biochem J **267**(2): 309-15.

Bingen, E. H., E. Denamur, et al. (1994). "Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks." Clinical microbiology reviews **7**(3): 311-327.

Blixt, Y., R. Knutsson, et al. (2003). "Interlaboratory random amplified polymorphic DNA typing of *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria." International journal of food microbiology **83**(1): 15-26.

Boonserm, P., P. Davis, et al. (2005). "Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications." Journal of molecular biology **348**(2): 363-382.

Boonserm, P., M. Mo, et al. (2006). "Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution." Journal of bacteriology. **188**(9): 3391-3401.

Borneman, J. and E. W. Triplett (1997). "Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation." Applied and environmental microbiology **63**(7): 2647-2653.

Bouchet, V., H. Huot, et al. (2008). "Molecular genetic basis of ribotyping." Clinical microbiology reviews **21**(2): 262-273.

Bourgouin, C., A. Delecluse, et al. (1988). "A *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences." J Bacteriol **170**(8): 3575-83.

Bourgouin, C., et al., (1988). "A *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences." J Bacteriol **170**(8): 3575-83.

Bourgouin, C., A. Klier, et al. (1986). "Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* israelensis." Molecular and General Genetics MGG **205**(3): 390-397.

Brar, S. K., et al., (2007). "*Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism Process." Biochemistry **42**: 773–790.

Bravo, A., H. Agaisse, et al. (1996). "Analysis of cryIAa expression in sigE and sigK mutants of *Bacillus thuringiensis*." Molecular and General Genetics MGG **250**(6): 734-741.

Bravo, A., et al., (2004). "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains." Biochim Biophys Acta, **1667**(1): 38-46.

Bravo, A., S. S. Gill, et al. (2007). "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." Toxicon **49**(4): 423-435.

Bravo, A., S. Likitvivanavong, et al. (2011). "*Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide." Insect biochemistry and molecular biology **41**(7): 423-431.

Broderick, N. A., R. M. Goodman, K. F. Raffa, and J. Handelsman. (2000). "Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)." Environ. Entomol. **29**: 101-107.

Bryce, J., C. Boschi-Pinto, et al. (2005). "WHO estimates of the causes of death in children." The Lancet. **365**(9465): 1147-1152.

Bulla LA, B. D., Kramer KJ, Shethna YI, Aronson AI, Fitz-James PC. (1980). "Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*." Crit Rev Microbiol **8**: 147-204.

Butko, P. (2003). "Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses." Applied and environmental microbiology **69**(5): 2415-2422.

Butko, P., F. Huang, et al. (1996). "Membrane permeabilization induced by cytolytic endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. israelensis." Biochemistry **35**(35): 11355-11360.

Butko, P., F. Huang, et al. (1997). "Interaction of the δ' -endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. israelensis with lipid membranes." Biochemistry **36**(42): 12862-12868.

Buzdin, A. A., Revina, L.P., Kostina, L.I., Zalunin, I.A., Chestukhina, G.G. (2002). "Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. ." Biochemistry **67**: 540–546. .

Cahan, R., H. Friman, et al. (2008). "Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Microbiology **154**(11): 3529-3536.

Cai, H. Y., M. Archambault, et al. (2003). "Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications." Animal Health Research Reviews **4**(02): 73-94.

Campbell, A. G., P. Schwientek, et al. (2014). "Diversity and genomic insights into the uncultured Chloroflexi from the human microbiota." Environmental microbiology **16**(9): 2635-2643.

Cantón, P. E., et al., (2011). "Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism." Peptides **32**(3): 595-600.

Cantón, P. E., López-Díaz, J.A., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M. (2013). "Membrane binding and oligomer membrane insertion are necessary but insufficient for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxicity. ." Peptides in press.

Carlson, C. R., D.A. Caugant, and A.B. Kolsto, (1994). "Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains." Appl Environ Microbiol **60**(6): 1719-25.

Carlton, B. C. and J. M. Gonzalez Jr (1985). "The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*." The molecular biology of the bacilli **2**: 211-249.

Carlton, B. C., Gonzalez, J.M., Jr., (1985). " Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. ." In Molecular Biology of Microbial Differentiation; Hoch, J.A., Setlow, P., Eds.; American Society for Microbiology: Washington, DC, USA: 246–252.

Carozzi, N., Koziel, M., (1997). "Advances in Insect Control: The role of Transgenic plants." Taylor & Francis Ltd.

Carozzi, N. B., et al., (1991). "Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles." Appl Environ Microbiol **57**(11): 3057-61.

Chakravorty, S., D. Helb, et al. (2007). "A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria." Journal of Microbiological Methods **69**(2): 330-339.

Charles, J.-F. and C. Nielsen-LeRoux (2000). "Mosquitocidal Bacterial Toxins: Diversity, Mode of Action and Resistance Phenomena." Mem Inst Oswaldo Cruz **95**: 201-206.

Chaufaux, J. (1995). "Utilisation de biopesticides contre les ravageurs des cultures: le point sur *Bacillus thuringiensis*."

Chen, J., K. G. Aimanova, et al. (2009). "Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin." *Insect biochemistry and molecular biology* **39**(10): 688-696.

Chen, J., S. Likitvivatanavong, et al. (2013). "A 104 kDa *Aedes aegypti* aminopeptidase N is a putative receptor for the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." *Insect biochemistry and molecular biology* **43**(12): 1201-1208.

Chen, J. A., K.G.; Fernandez, L.E.; Bravo, A.; Soberon, M.; Gill, S.S.. (2009). "*Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." *Biochem. J* **424**: 191–200.

Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H., Daffonchio, D. (2003). "Genetic relationship in the "*Bacillus cereus* group" by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment." *Journal of Applied Microbiology*. **94**(6): 1108-1119.

Chilcott, C. N. (1998 October). "Activities of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins Cyt1Aa and Cyt2Aa against Three Species of Sheep Blowfly." *Appl Environ Microbiol* **64**(10): 4060–4061.

Chilcott CN and E. DJ. (1988). "Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis crystal proteins in vivo and in vitro." *J Gen Microbiol*. **134**(9): 2551-8.

Chmielewski, R., Wieliczko, A., Kuczkowski, M., Mazurkiewicz, M., Ugorski M. (2002). "Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella enteritidis* isolates from Poland." *Journal of Veterinary medicine B*. **49**(4): 163-168.

Chow E, S. G., Gill SS. (1993). "Binding and aggregation of the 25 kDa toxin of *Bacillus thuringiensis subsp israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers." Appl. Environ. Microbiol. **55**: 2779–2788.

CHOW, E., G. J. P. SINGH, et al. (Nov. 1989). "Binding and Aggregation of the 25-Kilodalton Toxin of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* to Cell Membranes and Alteration by Monoclonal Antibodies and Amino Acid Modifiers." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **55**(11): 2779-2788.

Chungjatupornchai, W., H. Hofte, et al. (1988). "Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera." Eur J Biochem **173**(1): 9-16.

Clarridge, J. E. (2004). "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases." Clinical microbiology reviews **17**(4): 840-862.

Cohen, S., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A., Dym, O. (2011). "Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function." J. Mol. Biol **413**: 804–814. .

Cohen, S., R. Cahan, et al. (2007). "Specific targeting to murine myeloma cells of Cyt1Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies israelensis." Journal of Biological Chemistry **282**(39): 28301-28308.

Cohen, S., O. Dym, et al. (2008). "High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Journal of molecular biology **380**(5): 820-827.

Cooksey, K. E. (1971). "The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biochemistry and mode of action." In H.D.Burges and N.W.Hussey(ed.): 247-274.

Cooper, M. A., A. C. Try, et al. (1998). "Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer." Biochimica et Biophysica Acta: 101-111.

Corrêa, R. F. T., Ardisson-Araújo, D. M. P., Monnerat, R. G., & Ribeiro, B. M. (2012). "Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells." **e46121**.

Couche, G. A., M. A. Pfannenstiel, et al. (1987). "Structural disulfide bonds in the *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* protein crystal." Journal of bacteriology **169**(7): 3281-3288.

Crickmore, N., E. J. Bone, et al. (1995). "Contribution of the individual components of the delta endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." FEMS Microbiology Letters. **131**(3): 249-254.

Crickmore, N., D. R. Zeigler, et al. (1998). "Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 807-813.

Crickmore, N., D. R. Zeigler, et al. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.

Crosa, J. H., L. L. Hodges, et al. (1980). "Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*." Infection and immunity **27**(3): 897-902.

Crosa, J. H., M. H. Schiewe, et al. (1977). "Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*." Infection and immunity **18**(2): 509-513.

Croucher, N. J., G. S. Vernikos, et al. (2011). "Identification, variation and transcription of pneumococcal repeat sequences." BMC genomics **12**(1): 120.

Curtis T.P., S. W. T. (2005). "Exploring microbial diversity - A vast below. ." Science. **309**: 1331-1333. .

Dai, S.-M. and S. S. Gill (1993). "In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases." Insect biochemistry and molecular biology. **23**(2): 273-283.

Dai SM and G. SS. (1993 March). "In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases." Insect Biochem Mol Biol. **23**(2): 273-83.

Dalla Pozza, G. and G. Majori (1992). "First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy." Journal of the American Mosquito Control Association **8**(3): 318-320.

Dambach, P., V. R. Louis, et al. (2014). "Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso." Parasit Vectors **7**: 371.

Dancer, B. N. and J. Mandelstam (1975). "Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*." Journal of bacteriology **121**(2): 406-410.

Daniel, R. (2005). "The metagenomics of soil." Nature Reviews Microbiology **3**(6): 470-478.

Darboux, I., C. Nielsen-LeRoux, et al. (2001). "The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression." Insect biochemistry and molecular biology **31**(10): 981-990.

Darwin Ch. (1881). "The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observations on their habits." Murray ed., London: 298pp.

Dauga C. (2002). "Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies." Int J Syst. Evol. Microbiol. **52**: 531-47.

Davidson, E. W. (1984). "Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: Biological aspects which are important to field use." MOSQ. NEWS. **44**(2): 147-152.

Davidson, E. W. (1988). " Variation in Binding of *Bacillus sphaericus* Toxin and Wheat Germ Agglutinin to Larval Midgut Cells of Six Species of Mosquitoes. ." Journal of Invertebrate Pathology **53**: 251-259. .

de Barjac, H., A. Bonnefoi, (1962). "Attempted biochemical classification of 64 *Bacillus* strains of groups 2 and 3 representing 11 different species." Ann Inst Pasteur (Paris) **122**(3): 463-73.

de Barjac, H., A. Bonnefoi, (1968). "A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation." J Invertebr Pathol **11**(3): 335-47.

De Barros Moreira Beltrão, H. and M. H. N. L. Silva-Filha (2007). "Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. israelensis Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut." FEMS microbiology letters **266**(2): 163-169.

De Clerck E., D. V. P. (2004). "Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources." FEMS Microbiol Lett. **231**(1): 91-8.

de Maagd RA, B. A., Crickmore N (2001). "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world." Trends In Genetics **17**: 193-199. .

de Maagd, R. A., et al. (2003). "Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria." Annu Rev Genet **37**: 409-33.

Dean, D. H., F. Rajamohan, et al. (1996). "Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis" a minireview." Gene **179**(1): 111-117.

DELECLUSE, A. (June 1991). "Deletion by In Vivo Recombination Shows that the 28-Kilodalton Cytolytic Polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Is Not Essential for Mosquitocidal Activityt." JOURNAL OF BACTERIOLOGY: 3374-3381.

Delécluse, A., C. Bourgouin, et al. (1988). "Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis* israelensis toxins encoded by two different genes." Molecular and General Genetics MGG. **214**(1): 42-47.

Delecluse, A., M.L. Rosso, and A. Ragni, (1995). "Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein." Appl Environ Microbiol **61**(12): 4230-5.

Delecluse, A., S. Poncet, et al. (1993). "Expression of cryIVA and cryIVB Genes, Independently or in Combination, in a Crystal-Negative Strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Appl Environ Microbiol **59**(11): 3922-7.

Delecluse, A., S. Poncet, et al. (1993). "Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Applied and Environmental Microbiology **59**(11): 3922-3927.

Deng, C., Q. Peng, et al. (2014). "Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*." Toxins **6**(7): 2194-2209.

Deng, C., J. Wu, et al. (2014). "Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications." Progress in Polymer Science **39**(2): 330-364.

Derbyshire, D. J., D. J. Ellar, et al. (2001). "Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **57**(12): 1938-1944.

Dervyn, E., S. Poncet, et al. (1995). "Transcriptional regulation of the cryIVD gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Journal of bacteriology **177**(9): 2283-2291.

Després, L., R. Stalinski, et al. (2014). "Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins." BMC genomics **15**(1): 926.

Diaz-Mendoza, M., D. K. Bideshi, et al. (2012 March). "A 54-Kilodalton Protein Encoded by pBtoxis Is Required for Parasporal Body Structural Integrity in *Bacillus thuringiensis* subsp.israelensis." J Bacteriol **194**(6): 1562–1571.

Dombek, P. E., L. K. Johnson, et al. (2000). "Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources." Applied and environmental microbiology **66**(6): 2572-2577.

Donovan, W. P., J. T. Engleman, et al. (2006). "Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae." Applied microbiology and biotechnology **72**(4): 713-719.

Doruk, T., U. Avican, et al. (2013). "Overexpression of polyphosphate kinase gene (ppk) increases bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*." Microbiological research **168**(4): 199-203.

Du, J., B. Knowles, et al. (1999). "Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer." Biochem. J **338**: 185-193.

Du, L., L. Qiu, et al. (2012). "Identification of the promoter in the intergenic region between orf1 and cry8Ea1 controlled by sigma H factor." Applied and environmental microbiology **78**(12): 4164-4168.

Dunbar, J., S. Takala, et al. (1999). "Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning." Applied and environmental microbiology **65**(4): 1662-1669.

Eiler, A., F. Heinrich, et al. (2012). "Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa." The ISME journal **6**(2): 330-342.

Eilers, K. G., C. L. Lauber, et al. (2010). "Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil." Soil Biology and Biochemistry **42**(6): 896-903.

Elleuch, J., R. Z. Zghal, et al. (2014). "New *Bacillus thuringiensis* toxin combinations for biological control of lepidopteran larvae." International journal of biological macromolecules **65**: 148-154.

Estruch, J. J., Warren, G.W, Mullins, M.A, Nye, G.J, Craig, J.A and Koziel, M.G. (1996). "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. ." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**(11): 5389-5394.

F., G. (1995). "Comparisons between resistance management strategies for insects and weeds." Weed Technology **9**: 830-839.

Fabrick, J., C. Oppert, et al. (2009). "A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin." Journal of Biological Chemistry **284**(27): 18401-18410.

Fadare, T. A. and N. A. Amusa (2004). "Comparative efficacy of microbial and chemical insecticides on four major lepidopterous pests of cotton and their (insect) natural enemies." African Journal of Biotechnology **2**(11): 425-428.

Fast, P. G. (1981). "The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*." Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970 - 1960. H.D. Burges (ed). Academic Press. London: 223-248.

Fast, P. J. (1972). "The delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III. A rapid method for separating parasporal bodies from spores." J.Invertebr. Pathol. **20**: 139-140.

Federici, B. A., H.-W. Park, et al. (2010). "Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control." The Open Toxinology Journal **3**: 83-100.

Felix, F. and N. Brouillet (1966). "Purification and properties of 2 peptidases from baker's yeast." Biochimica et biophysica acta **122**(1): 127.

Fernandez-Luna, M. T., H. Lanz-Mendoza, et al. (2010). "An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae)." Environmental microbiology **12**(3): 746-757.

Fernandez, L., K. Aimanova, et al. (2006). "A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae." Biochem. J **394**: 77-84.

Fernandez L.E., M.-A. C., Lira E, Chen J, Evans A, Hernandez-Martinez S, Lanz-Mendoza H, Bravo A, Gill SS, Soberon M. (2009). "Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*." Biochemistry **48**: 8899–907.

Fernandez, L. E., Perez, C., Segovia, L., Rodriguez, M.H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M. (2005). "Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II." FEBS Lett. **579**: 3508–3514.

Ferré, J., B. Escriche, et al. (1995). "Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins." FEMS microbiology letters **132**(1-2): 1-7.

Ferré, J., M. D. Real, et al. (1991). "Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(12): 5119-5123.

Ferré, J. and J. Van Rie (2002). "Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*." Annual review of entomology **47**(1): 501-533.

French-Constant, R. H. (2004 March). "The genetics and genomics of insecticide resistance." TRENDS in Genetics **20**.

Fierer, N. and J. T. Lennon (2011). "The generation and maintenance of diversity in microbial communities." American Journal of Botany **98**(3): 439-448.

Fillinger, U. and S. W. Lindsay (2006). "Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya." Tropical Medicine & International Health **11**(11): 1629-1642.

Fisher, M. M. and E. W. Triplett (1999). "Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities." Applied and environmental microbiology **65**(10): 4630-4636.

Flores, H., X. Soberón, et al. (1997). "Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes." FEBS letters **414**(2): 313-318.

Fuerst, J. A. and E. Sagulenko (2011). "Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function." Nature Reviews Microbiology **9**(6): 403-413.

Galitsky, N., V. Cody, et al. (2001). "Structure of the insecticidal bacterial-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography **57**(8): 1101-1109.

Galperin, M. Y. (2013). "Genome diversity of spore-forming Firmicutes." Microbiology spectrum **1**(2): TBS-0015-2012.

García-Martínez, J., S. G. Acinas, et al. (1999). "Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity." Journal of Microbiological Methods **36**(1): 55-64.

Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. G. Lilburn., (2004). "Taxonomic outline of the prokaryotes,." release 5.0. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Garrity, G. M., J. A. Bell, T. G. Lilburn. (2004). "Taxonomic outline of the prokaryotes, release 5.0." Springer-Verlag, New York, N.Y.

Garrity, G. M., J. Leventhal, and T. G. Lilburn., (2005). " Taxonomic Outline of the Procaryotes." Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Release 6.0. ed. Springer-Verlag, New York.

Gazit, E., N. Burshtein, et al. (1997). "*Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin associates specifically with its synthetic helices A and C in the membrane bound state. Implications for the assembly of oligomeric transmembrane pores." Biochemistry **36**(49): 15546-15554.

Gazit, E., P. La Rocca, et al. (1998). "The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "œmbrella-like" structure of the pore." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(21): 12289-12294.

Ge, B., D. Bideshi, et al. (1998). "Differential effects of helper proteins encoded by the cry2A and cry11A operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*." FEMS microbiology letters **165**(1): 35-41.

Gelsomino, A., A. C. Keijzer-Wolters, et al. (1999). "Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis." Journal of Microbiological Methods **38**(1): 1-15.

Geny, B. and M. R. Popoff (2006). "Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells." Bio. Cell **98**: 667–678.

Geoffroy, C., G. Domínguez, et al. (1995). "The sulphhydryl-activated cytolyisin and a sphingomyelinase C are the major membrane-damaging factors involved in cooperative (CAMP-like) haemolysis of *Listeria* spp." Research in Microbiology **146**(4): 303-313.

Georghiou, G. P. and M. C. Wirth (1997). "Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)." Applied and environmental microbiology **63**(3): 1095-1101.

Gill, S. S., E. A. Cowles, et al. (1992). "The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins." Annual review of entomology **37**(1): 615-634.

Gill SS, S. G., Hornung JM. (1987). " Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis subsp israelensis* cytolytic toxins." Infect Immun **55**: 1300–1308.

Gillings, M. and M. Holley (1997). "Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements." Letters in Applied Microbiology **25**(1): 17-21.

Glatron, M. F. and G. Rapoport (1972). "Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA." Biochimie **54**(10): 1291-1301.

Goldberg, L. J., J. Margalit, (1977). "A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*." Mosq News **37**: 317–324.

Goldfarb, K. C., U. Karaoz, et al. (2011). "Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance." Frontiers in microbiology **2**.

Gómez, I., I. n. Arenas, et al. (2010). "New insights into the mode of action of Cry1Ab toxin used in transgenic insect-resistant crops." Southwestern Entomologist **35**(3): 387-390.

Gomez, I., et al. (2002). "Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." FEBS Let **513**(2-3): 242-6.

Gonzalez, J., Carlton, Bruce C. (1984). "A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety israelensis." Plasmid **11**(1): 28-38.

Gonzalez JM, B. B., Carlton BC (1982). "Transfer Of *Bacillus-Thuringiensis* Plasmids Coding For Delta-Endotoxin Among Strains Of *B-Thuringiensis* And *B-Cereus*." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences **79**: 6951-6955.

Gonzalez, J. M., Jr. and B.C. Carlton, (1980). "Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*." Plasmid **3**(1): 92-98.

Gonzalez, J. M., Jr., H.T. Dulmage, and B.C. Carlton, (1981). "Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*." Plasmid **5**(3): 352-65.

Goodman N.S., G. R. J., and Rogoff M.H. (1967). "Biphasic System for Separation of Spores and Crystals of *Bacillus thuringiensis*." Journal of bacteriology **94**(2): 485.

Gordon, R. L., W.C. Haines, and C.H.N. Pang, (1973). "The Genus *Bacillus*. Agricultural Handbook. ." 427 Washington DC: Agricultural research service, US Department of Agriculture.

Gotelli, N. J. and R. K. Colwell (2001). "Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness." Ecology letters **4**(4): 379-391.

Gould, F. (1997). "Integrating Pesticidal Engineered Crops into Mesoamerican Agriculture. In Transgenic Plants: *Bacillus thuringiensis* in Mesoamerican Agriculture (Hruska, A.J. and M. L. Pavon, eds.)." Zamorano: Honduras: 6-36.

Gould, F., A. Martinez-Ramirez, et al. (1992). "Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(17): 7986-7990.

Gray, J. S., A. D. McIntyre, et al. (1992). Manuel des méthodes de recherche sur l'environnement aquatique: Evaluation biologique de la pollution marine, eu égard en particulier au benthos. Onzième partie, Food & Agriculture Org.

Griffitts JS, A. R. (2005). "Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins." Bioessays **27**: 614-624.

Griffitts, J. S., J. L. Whitacre, et al. (2001). "Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme." Science **293**(5531): 860-864.

Grochulski, P., L. Masson, et al. (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA (a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation." Journal of molecular biology **254**(3): 447-464.

GUERCHICOFF, A., A. DELECLUSE, et al. (Mar. 2001). "The *Bacillus thuringiensis* cyt Genes for Hemolytic Endotoxins Constitute a Gene Family." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **67**(3): 1090–1096.

Guerchicoff, A., R. A. Ugalde, et al. (1997). "Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Applied and environmental microbiology **63**(7): 2716-2721.

Guerchicoff, A., R. A. Ugalde, et al. (1997). "Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Appl Environ Microbiol **63**(7): 2716-21.

Guidi, V., N. Patocchi, et al. (June 2011). "Distribution of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* in Soil of a Swiss Wetland Reserve after 22 Years of Mosquito Control." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY **77**: 3663–3668.

Guillaume Tetreau, R. S., Jean-Philippe David and Laurence Després. (2013). "Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately." Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **108**(7): 894-900.

Gunning, R. V., H. T. Dang, et al. (2005). "New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin." Applied and environmental microbiology **71**(5): 2558-2563.

Guo, S., et al. (2009). "Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*." J Struct Biol **168**(2): 259-66.

H, S., H. MT, et al. (2007 Apr). "Flexibility and strictness in functional replacement of domain III of cry insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*." J Biosci Bioeng **103**(4): 381-3.

Hamady, M., J. J. Walker, et al. (2008). "Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex." Nature methods **5**(3): 235-237.

Harbach, R. E. (1985). "Pictorial keys to the genera of mosquitoes, subgenera of *Culex* and the species of *Culex* (*Culex*) occurring in southwestern Asia and Egypt, with a note on the subgeneric placement of *Culex deserticola* (Diptera: Culicidae)." WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC.

Harvey, S. P. and J. M. Minter (2005). "Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates." FEMS Immunology & Medical Microbiology **44**(1): 91-97.

Hayes, M., Carney, B., Slater, J., and Bruck, W. (2008). "Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan - Part A: extraction methods." Biotechnol. J. **3**: 871-877.

Heckel, D. G. (2012). "Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action." Pesticide Biochemistry and Physiology **104**(2): 103-110.

Hemingway, J. and H. Ranson (2000). "Insecticide resistance in insect vectors of human disease." Annual Review of Entomology **45**(1): 371-391.

Herlemann, D. P. R., M. Labrenz, et al. (2011). "Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea." The ISME journal **5**(10): 1571-1579.

Hernández-Martínez, P., G. Navarro-Cerrillo, et al. (2010). "Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*." PloS one **5**(9): e12795.

Hernández-Soto, A., M. C. Del Rincón-Castro, et al. (2009). "Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism." Applied and environmental microbiology **75**(14): 4661-4667.

Herrero, S., T. Gechev, et al. (2005). "*Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes." BMC genomics **6**(1): 96.

Hibbs, M. S., K. A. Hasty, et al. (1985). "Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase." Journal of Biological Chemistry **260**(4): 2493-2500.

Hill, K. K. (Feb. 2004). "Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* Isolates." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY: 1068–1080.

Hillis, D. M. and M. T. Dixon (1991). "Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference." Quarterly Review of Biology: 411-453.

Hodgman, T. C., et al., (1993). "Identification of a cryptic gene associated with an insertion sequence not previously identified in *Bacillus thuringiensis* ." FEMS Microbiol Lett **114**(1): 23-9.

Hofmann, C., H. Vanderbruggen, et al. (1988). "Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(21): 7844-7848.

Höfte, H., Whiteley, H. R. (1989). "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*." Microbiological reviews **53**(2): 242-255.

Howlader, M. T. H., Y. Kagawa, et al. (2010). "Alanine scanning analyses of the three major loops in domain II of *Bacillus thuringiensis* mosquitoicidal toxin Cry4Aa." Applied and environmental microbiology **76**(3): 860-865.

Howlader, M. T. H., Kagawa, Y., Sakai, H., Hayakawa, T. (2009). "Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitoicidal Cry4Aa. ." J. Biosci. Bioeng. **108**: 179–183.

Hua, G., R. Zhang, et al. (2008). "*Anopheles gambiae* Cadherin AgCad1 Binds the Cry4Ba Toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a Fragment of AgCad1 Synergizes Toxicity" Biochemistry **47**(18): 5101-5110.

Hua, G., R. Zhang, et al. (2009). "*Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* jegathesan Cry11Ba toxin." Biochemistry **48**(41): 9785-9793.

Hubálek, Z. and J. Halouzka (1999). "West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe." Emerging infectious diseases **5**(5): 643.

Huber, H. E., P. Lüthy, et al. (1981). "The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity." Archives of Microbiology **129**(1): 14-18.

Hueck, C. J. and W. Hillen (1995). "e repression in *Bacillus subtilis*: ag mechanism for the Gram-positive bacteria?" Molecular microbiology **15**(3): 395-401.

Huffman, D. L., L. Abrami, et al. (2004). "Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins." Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America **101**(30): 10995-11000.

Huffman DL, A. L., Sasik R, et al. (2004). "Mitogen-activated protein kinase pathways defends against bacterial pore-forming toxins." Proceedings Of The

National Academy Of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences **101**: 10995-11000.

Ibarra, J. E., M. C. del Rincón, et al. (2003). "Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species." Applied and environmental microbiology **69**(9): 5269-5274.

Ibrahim, M. A., et al., (2010). "*Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective." Bioeng Bugs **1**(1): 31-50.

Ibrahim, M. A., N. Griko, et al. (2010). "*Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective." Bioengineered bugs **1**(1): 31-50.

Igbedioh, S. O. (1991). "Effects of agricultural pesticides on humans, animals, and higher plants in developing countries." Archives of Environmental Health: An International Journal **46**(4): 218-224.

Ignoffo, C. M., and V. H. Dropkin., (1977). "Deleterious effects of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil-inhabiting, myceliophagus, and plant-parasitic nematodes." Journal of the Kansas Entomological Society **50**: 394-398.

Ishiwata, S. (1901). "On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1)." Rep Sericult Assoc Jpn, **114**: 1-5.

Itsko, M. and A. Zaritsky (2007). "Exposing cryptic antibacterial activity in Cyt1Ca from *Bacillus thuringiensis israelensis* by genetic manipulations." FEBS letters **581**(9): 1775-1782.

Ivanov, D. B., M. P. Philippova, et al. (2001). "Structure and functions of classical cadherins." Biochemistry (Moscow) **66**(10): 1174-1186.

J, L.-M., F. B.A, et al. (July 1995). "Highly Mosquitocidal Isolates of *Bacillus thuringiensis* subspecies kenyae and entomocidus from Mexico." Biochemical Systematics and Ecology **23**: 461-468.

J, O., E. RU, et al. (2007 Jun). "Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation." Appl Environ Microbiol. **73**(11): 3623-9.

J.Ellar, E. S. W. a. D. (1987). "Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. israelensis gene encoding a 130 kDa deltaendotoxin." Nucleic Acids Research **15**.

Janeček Štefan. (1997). "α-Amylase family: molecular biology and evolution." Progress in biophysics and molecular biology **67**(1): 67-97.

Janmaat, A. F. and J. Myers (2003). "Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*." Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences **270**(1530): 2263-2270.

Janssen, P. H. (2006). "Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes." Applied and environmental microbiology **72**(3): 1719-1728.

Jensen, G. B., A. Wilcks, et al. (1995). "The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis is located on the large conjugative plasmid pXO16." Journal of bacteriology **177**(10): 2914-2917.

Jensen, M. A., J. A. Webster, et al. (1993). "Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms." Applied and environmental microbiology **59**(4): 945-952.

Jiménez AI, R. E., Cancino-Rodezno A, Bedoya-Pérez LP, Caballero-Flores GG, Muriel-Millan LF, Likitvivatanavong S, Gill SS, Bravo A, Soberón M. (2012 Sep). "Aedes aegypti alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins." Insect Biochem Mol Biol.

Jiménez, A. I., E. Z. Reyes, et al. (2012). "Aedes aegypti alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins." Insect biochemistry and molecular biology **42**(9): 683-689.

Jones, B. E., V. r. Dossonnet, et al. (1997). "Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr." ournal of Biological Chemistry **272**(42): 26530-26535.

Jorge E. Ibarra and B. A. Federici (March 1986). "Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. morrisoni (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis are similar in protein composition and toxicity." FEMS Microbiology Letters **34**(1): 79–84.

Juárez-Pérez, V., A. Guerchicoff, et al. (2002). "Characterization of Cyt2Bc toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin." Applied and environmental microbiology **68**(3): 1228-1231.

Juárez-Pérez, V., M. Porcar, et al. (2003). "Cry29A and Cry30A: Two Novel δ -endotoxins Isolated from *Bacillus thuringiensis* serovar medellin." Systematic and applied microbiology **26**(4): 502-504.

Jurat-Fuentes, J. L. and M. J. Adang (2006). "Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae." Journal of Invertebrate Pathology **92**(3): 166-171.

Jurat-Fuentes JL, G. F., Adang MJ. (2003). "Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance." Applied And Environmental Microbiology **69**: 5898-5906.

Jurat-Fuentes, J. L. a. M. J. A. (2004). "Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae." Eur J Biochem. **271**(15): 3127-35.

Kaelin, P., P. Morel., F. Gadani., (1994). "Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.)." Appl Environ Microbiol **60**(1): 19-25.

Kamoun, F., I. B. Fguira, et al. (13 April 2011). "Purification and Characterization of a New *Bacillus thuringiensis* Bacteriocin Active Against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*." Appl Biochem Biotechnol **165**: 300–314.

Kampen, H. and D. Werner (2014). "Out of the bush: the Asian bush mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901)(Diptera, Culicidae) becomes invasive." Parasit Vectors **7**(1): 59.

Kang, H. P. and W. M. Dunne (2003). "Stability of repetitive-sequence PCR patterns with respect to culture age and subculture frequency." Journal of clinical microbiology **41**(6): 2694-2696.

Kanintronkul, Y., I. Sramala, et al. (2003). "Specific mutations within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveal a crucial role for Asn-166 and Tyr-170." Molecular biotechnology **24**(1): 11-19.

Kanintronkul, Y., T. Srihirin, et al. (2005). "Insertion behavior of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba insecticidal protein into lipid monolayers." Arch Biochem Biophys **442**(2): 180-6.

Karch, S. and J. F. Charles (1987). Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore/crystal complex used in the field. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie, Elsevier.

Kato H., Y. T., Arakawa Y. (2005). "Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan." J Med Microbiol. **54**: 167-71.

Kellenberger, E. (2001). "Exploring the unknown." EMBO reports **2**(1): 5-7.

Khajuria, C., H. Wang, et al. (2013). "Mobilization of lipids and fortification of cell wall and cuticle are important in host defense against Hessian fly." BMC genomics **14**(1): 423.

Khosravi, A. D. and S. Seghatoleslami (2009). "Genotyping and identification of mycobacteria by fingerprinting techniques." Jundishapur J Microbiol **2**(3): 81-91.

Kim BJ, H. S., Lee KH, et al., (2004). "Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*)." J Clin Microbiol. **42**: 1308-12.

Knowles, B. H. (1994). "Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins." Adv. Insect Physiol **24**: 275-308.

Knowles, B. H. and J. A. T. Dow (1993). "The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut." BioEssays **15**(7): 469-476.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar (1987). "Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **924**(3): 509-518.

Koch, M. S., J. M. Ward, et al. (2015). "The food and environmental safety of Bt crops." Frontiers in plant science **6**.

Koeuth, T., J. Versalovic, et al. (1995). "Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria." Genome Research **5**(4): 408-418.

Komano, T., Yamigawa, M., Nishimoto, T., Yoshisue, H., Tanabe, K., Sen, K., Sakai, H. (1998). "Activation process of the insecticidal proteins CryIVA and CryIVB produced by *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Isr. J. Entomol. **32**: 185–198.

Koni, P. A. and D. J. Ellar (1993). "Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin." Journal of molecular biology **229**(2): 319-327.

Koni, P. A. and D. J. Ellar (1994). "Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins." Microbiology **140**(8): 1869-1880.

Königsson, M. H., G. Bölske, et al. (2002). "Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains." Veterinary microbiology **85**(3): 209-220.

Krattiger, A. F. (1997). "Insect Resistance in Crops: A Case Study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its Transfer to Developing Countries." SAAA Briefs No. 2. ISAAA: Ithaca, NY. : 42.

Krieg, A., et al.,. (1983). " *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteran wirksamer Pathotype." Z Angew Entomol **96**: 500-508.

Kronstad, J. W., H.R. Whiteley, (1984). "Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. ." J Bacteriol **160**(1): 95-102.

Kronstad, J. W. and H. R. Whiteley (1986). "Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes." Gene **43**(1): 29-40.

Krywienczyk, J., H. T. Dulmage, et al. (1978). "Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3 ab var. *kurstaki*." Journal of invertebrate pathology **31**(3): 372-375.

Kullik, S. A., M. K. Sears, et al. (2011). "Sublethal effects of Cry 1F Bt corn and clothianidin on black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development." Journal of economic entomology **104**(2): 484-493.

KUMAR, A. S. M. and A. I. ARONSON (Oct. 1999). "Analysis of Mutations in the Pore-Forming Region Essential for Insecticidal Activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin." JOURNAL OF BACTERIOLOGY **181**: 6103–6107.

Labbe, J. P., P. Rebeyrotte, et al. (1974). "[Demonstration of extracellular leucine aminopeptidases (EC 3.4. 1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410). Study of the leucine aminopeptidase 2 fraction]." Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles **278**(21): 2699-2702.

Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing." Nucleic acid techniques in bacterial systematics: 125-175.

Larentis, M., R. Psenner, et al. (2015). "Prokaryotic community structure in deep bedrock aquifers of the Austrian Central Alps." Antonie van Leeuwenhoek **107**(3): 687-701.

Lauber, C. L., M. Hamady, et al. (2009). "Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale." Applied and environmental microbiology **75**(15): 5111-5120.

Leal, N. C., M. Sobreira, et al. (2004). "Evaluation of a RAPD based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil." Journal of applied microbiology **96**(3): 447-454.

Lebl, K., C. Zittra, et al. (2015). "Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their relevance as disease vectors in the city of Vienna, Austria." Parasitology research **114**(2): 707-713.

Lecadet, M. M., et al., (1999). "Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*." J Appl Microbiol **86**(4): 660-72.

Lecadet, M. M., M. Lescourret, et al. (1977). "Characterization of an intracellular protease isolated from *Bacillus thuringiensis* sporulating cells and able to modify homologous RNA polymerase." European Journal of Biochemistry **79**(2): 329-338.

Leclerc, H. (1975). Microbiologie générale. Microbiologie generale, Doin.

Lee, A., and E. Wong (2009). "Optimization and robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using Trout Lake *E. coli* isolates." J. Exp. Microbiol. Immunol. **13**: 104-113.

Lee, H.-K. and S. S. Gill (1997). "Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. fukuokaensis." Applied and environmental microbiology **63**(12): 4664-4670.

Lee, K. C.-Y., C. W. Herbold, et al. (2013). "Phylogenetic delineation of the novel phylum Armatimonadetes (former candidate division OP10) and definition of two novel candidate divisions." Applied and environmental microbiology **79**(7): 2484-2487.

Lereclus, D., H. Agaisse, et al. (2000). "Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*." International journal of medical microbiology **290**(4): 295-299.

Lereclus, D., Agaisse, H., Ed. (2000). Toxin and virulence gene expression in *Bacillus thuringiensis*. In Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application; Charles, J.F., Delécluse, A., Nielsen-Leroux, C., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Heidelberg, Germany,.

Lereclus, D., et al., (1984). "A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* " EMBO J **3**(11): 2561-7.

Lereclus, D., J. Mahillon, et al. (1986). "Identification of Tn4430, a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*." Molecular and General Genetics MGG **204**(1): 52-57.

Li, J., R. Akhurst, et al. (1998). "BINDING ASSAY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY1AC INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEINS IN DIAMONDBACK MOTH*." *Insect Science* **5**(4): 350-354.

Li, J., J. Carroll, et al. (1991). "Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution."

Li, J., D. J. Derbyshire, et al. (2001). "Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms." *Biochemical Society Transactions* **29**(Pt 4): 571-577.

Li, J., P. A. Koni, et al. (1996). "Structure of the Mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kyushuensis* and Implications for Membrane Pore Formation." *Journal of molecular biology* **257**(1): 129-152.

Li, W., D. Raoult, et al. (2009). "Bacterial strain typing in the genomic era." *FEMS microbiology reviews* **33**(5): 892-916.

Likitvivanavong, S., Chen, J. W., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S. S., (2011a). "Cadherin, Alkaline Phosphatase, and Aminopeptidase N as Receptors of Cry11Ba Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti* ." *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(1): 24-31.

Likitvivanavong, S., Chen, J. W., Evans, A. M., Bravo, A., Soberon, M., Gill, S. S., (2011b). "Multiple Receptors as Targets of Cry Toxins in Mosquitoes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**(7): 2829-2838.

Likitvivanavong, S., G. Katzenmeier, et al. (2006). "Asn 183 in 5 \pm ζ is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin." *Archives of biochemistry and biophysics* **445**(1): 46-55.

Lilien, J. a. J. B. (2005). "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 459-65.

Liu, J. A. (1996). "Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *Asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of Gram negative bacteria in mosquito control." Nature Biotechnology **14**: 343-347.

Liu, W.-T., T. L. Marsh, et al. (1997). "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA." Applied and environmental microbiology **63**(11): 4516-4522.

Liu X, R. L., Peng D, Li L, Sun M, Yu Z. (2014). "Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects." Toxins (Basel) **6**(8): 2229-38.

Liu, X. Y. R., L.F.; Hu, Z.F.; Peng, D.H.; Cao, S.Y.; Yu, Z.N.; Liu, Y.; Zheng, J.S.; Sun, M. (2010). "Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*." J. Biol. Chem. **285**: 39191–39200.

Liu, Y.-B., B. E. Tabashnik, et al. (2000). "Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae)." Journal of economic entomology **93**(1): 1-6.

Liu, Y., Q. Lai, et al. (2015). "Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group." Scientific reports **5**.

Lu, A. Y. H., K. W. Junk, et al. (1969). "Resolution of the cytochrome P-450-containing α -hydroxylation system of liver microsomes into three components." Journal of Biological Chemistry **244**(13): 3714-3721.

Lucena, W. A., P. B. Pelegri, et al. (2014). "Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins." Toxins. **6**(8): 2393-2423.

Ludwig, W., K. H. Schleifer, and W. B. Whitman., (2009). "Revised Road Map to Phylum Firmicutes." Bergey's Outline **3**: 1-32.

Lupski, J. R. (1993). "Molecular epidemiology and its clinical application. ." JAMA, **270**(11): 1363-1364.

M.D. Collins, U. R., C. Ash, M. Aguirre, J.A.E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B.A. Phillips, A.M. Williams and S. Wallbanks. (1991). "Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. ." FEMS Microbiol. Lett. **77**: 5–12.

Mahalakshmi, A. (2012). "Distribution of cry and cyt Genes among Indigenous *Bacillus thuringiensis* Isolates with Mosquitocidal Activity." Advances in Microbiology **2**: 216-226.

Mahillon, J., R. Rezsöhazy, et al. (1994). "IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: A review." Genetica **93**(1-3): 13-26.

Mahmood, F. (1998). "Laboratory bioassay to compare susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus* to *Bacillus thuringiensis* var. israelensis as affected by their feeding rates." Journal of the American Mosquito Control Association **14**(1): 69-71.

Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, et al. (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic

microorganisms." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(6): 3140-3145.

Manasherob, R., Itsko, M., Sela-Baranes, N., Ben-Dov, E., Berry, C., Cohen, S., Zaritsky, A. (2006). "Cyt1Ca from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis: production in *Escherichia coli* and comparison of its biological activities with those of other Cyt-like proteins. ." Microbiology **152**: 2651–2659. .

Manasherob, R., A. Zaritsky, et al. (2001). "Effect of accessory proteins P19 and P20 on cytolytic activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis in *Escherichia coli*." Current microbiology **43**(5): 355-364.

Manasherob, R. Z., A.; Metzler, Y.; Ben-Dov, E.; Itsko, M.; Fishov, I. (2003). "Compaction of the *Escherichia coli* nucleoid caused by Cyt1Aa." Microbiology **149**: 3553–3564.

Mandal, C. C., S. Gayen, et al. (2007). "Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects." Protein Engineering Design and Selection **20**(12): 599-606.

Margalith, Y., E. Ben-Dov (2000). "Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Insect pest management: techniques for environmental protection **200**: 243-301.

Margosch, D., M. A. Ehrmann, et al. (2006). "High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature." Applied and environmental microbiology **72**(5): 3476-3481.

Martin, B., O. Humbert, et al. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucleic acids research **20**(13): 3479-3483.

Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, and R. Hakenbeck. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucleic Acids Res. **20**: 3479–3483.

Martínez-Alonso, M., J. Escolano Sánchez, et al. (2010). "Diversity of the bacterial community in the surface soil of a pear orchard based on 16S rRNA gene analysis." International Microbiology, 2010, vol. 13, n^o 3, p. 123-134.

MARY ANN PFANNENSTIEL (Oct. 1986). "Immunological Relationships among Proteins Making Up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Crystalline Toxin." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY: 644-649.

Masashi Yamagiwa, Motoyuki Esaki, et al. (1999). "Activation Process of Dipteran-Specific Insecticidal Protein Produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." Appl. Environn. Microbiol. **65**: 3464-3469.

Masson, L., B. E. Tabashnik, et al. (1999). "Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel." Journal of Biological Chemistry **274**(45): 31996-32000.

Mathy, N., L. Bionard, et al. (2007). "5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA." Cell **129**(4): 681-692.

Matsushima, R., Ozawa, R., Uefune, M., Gotoh, T., and Takabayashi, and J. (2006). "Interspecies variation in the Kanzawa spider mite differentially affects induced defensive response in lima bean plants." J. Chem. Ecol. **32**: 2501–2512.

McGaughey, W. H. (1985). "Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*." Science **229**(4709): 193-195.

Meadows, M. P., et al., (1992). " Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. ." Appl Environ Microbiol **58**(4): 1344-50.

Melzak, K. A. (2004). "Interaction of Cytolytic Toxin CytB with a Supported Lipid Bilayer: Study Using an Acoustic Wave Device." Langmuir **20**: 1386-1392.

Menou, G., et al., (1990). "Structural and genetic organization of IS232, a new insertion sequence of *Bacillus thuringiensis*. ." J Bacteriol **172**(12): 6689-96.

Merritt, R. W. (1989). "A broad evaluation of B.t.i. for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish. ." J. Am. Mosq. Contr. Ass. **5**(3): 397-415.

Meunier, L., G. Prefontaine, et al. (2006). "Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*." Insect molecular biology **15**(4): 475-483.

Miller, K. M., T. J. Ming, et al. (1999). "Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations." Biotechniques **27**: 1016-1031.

Millet, J. and E. Pineau (1960). "N-Succinyl-L-glutamic acid in bacteria, its influence on the sporulation of *Bacillus subtilis*." Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences **250**: 1363.

Mollet, C., M. Drancourt, et al. (1997). "rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification." Molecular microbiology **26**(5): 1005-1011.

Moonsom, S., U. Chaisri, et al. (September 2007). "Binding Characteristics to Mosquito-larval Midgut Proteins of the Cloned Domain II-III Fragment from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba Toxin." Journal of Biochemistry and Molecular Biology **40**(5): 783-790.

Moran Jr, C. P. (1993). "RNA polymerase and transcription factors." Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC: 653-667.

Morin, S., R. W. Biggs, et al. (2003). "Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(9): 5004-5009.

Morse, R. J., T. Yamamoto, et al. (2001). "Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope." Structure **9**(5): 409-417.

Mühling, M., J. Woolven-Allen, et al. (2008). "Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities." The ISME journal **2**(4): 379-392.

Mulla, M. S. (1990). Activity, field efficacy, and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies, Springer: 134-160.

Mulla, M. S., B. A. Federici, et al. (1982). "Field evaluation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against floodwater mosquitoes." Applied and environmental microbiology **43**(6): 1288-1293.

Mulla, M. S. S., Eds. (1990). "Activity, field efficacy. and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes." Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies Rutgers University Press, New Brnswick. NJ. : 134-160.

Muller AK., W. K., Christensen S & Sorensen SJ., (2002). "The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances." Microb. Ecol. **44**: 49-58.

Muñoz, V. a. S., L. (1994a). "Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters." Nature Struct. Biol **1**: 399–409.

Muyzer, G., E. C. De Waal, et al. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Applied and environmental microbiology **59**(3): 695-700.

Naimov, S., M. Weemen-Hendriks, et al. (2001). "*Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle." Applied and environmental microbiology. **67**(11): 5328-5330.

Narva, K. E., J. M. Payne, et al. (1991). Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes, and genes encoding novel nematodes-active toocin from *Bacillus thuringiensis* isolates.

Neppl, C. C. (2000). "Management of Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, The Environmental Studies Program." University of Chicago. Available at <http://camillapede.tripod.com/bapaper.html>.

Nicolas L, C. J., de Barjac H. (1993). "*Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*: characterization of putative mosquito larvicidal proteins." FEMS Microbiol Lett **113**(1): 23–28.

Nielsen-Leroux, C. and J. F. Charles (1992). "Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae." Eur J Biochem **210**(2): 585-90.

Nishimoto, T., H. Yoshisue, et al. (1994). "Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." FEBS Lett **348**(3): 249-54.

Nishiwaki, H., K. Nakashima, et al. (2007). "Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*." Applied and environmental microbiology **73**(10): 3404-3411.

Nisnevitch, M. C., S.; Ben-Dov, E.; Zaritsky, A.; Sofer, Y.; Cahan, R. (2006). "Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis* israelensis: Activation by putative endogenous protease." Biochem. Biophys. Res. Commun. **344**: 99–105.

Oda, Y., B. Star, et al. (2003). "Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris*." Applied and environmental microbiology **69**(9): 5186-5191.

Oerke, E.-C. and H.-W. Dehne (1997). "Global crop production and the efficacy of crop protection-current situation and future trends." European Journal of Plant Pathology **103**(3): 203-215.

Oestergaard, J., R. U. Ehlers, et al. (2007). "Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation." Appl Environ Microbiol **73**(11): 3623-9.

Okada, Y., H. Nagase, et al. (1986). "A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization." Journal of Biological Chemistry **261**(30): 14245-14255.

Olive, D. M. and P. Bean (1999). "Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms." Journal of clinical microbiology **37**(6): 1661-1669.

Opota, O., J.-F. Charles, et al. (2008). "Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **149**(3): 419-427.

Oppert, B. (1999). "Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins." Archives of insect biochemistry and physiology **42**: 1-12.

Oppert, B., K. J. Kramer, et al. (1997). "Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins." Journal of Biological Chemistry **272**(38): 23473-23476.

Ortiz-Herrera, M., A. Gerónimo -Gallegos, et al. (2004). "RAPD-PCR characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from cystic fibrosis patients." salud pública de méxico **46**(2): 149-157.

Otieno-Ayayo, Z. N., A. Zaritsky, et al. (2008). "Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis." Environmental Microbiology **10**(9): 2191–2199.

Otieno-Ayayo, Z. N., A. Zaritsky, et al. (2008). "Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis." Environmental microbiology **10**(9): 2191-2199.

Ounjai, P., V. M. Unger, et al. (2007). "Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation." Biochem Biophys Res Commun **361**(4): 890-5.

Özkan, M., F. B. Dilek, et al. (2003). "Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production." Research in Microbiology **154**(1): 49-53.

Pacheco, S., I. Gomez, et al. (2009). "Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors." Journal of Biological Chemistry **284**(47): 32750-32757.

Palmisano CT, T. V., Caillouet K, Byrd B, Wesson DM. (2005). "Impact of West Nile virus-outbreak upon St. Tammany Parish mosquito abatement district." J Am Mosq Control Assoc **21**: 33–38.

Pardo-Lopez, L., C. Munoz-Garay, et al. (2009). "Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*." Peptides **30**(3): 589-595.

Pardo-Lopez, L., M. Soberon, et al. (2013). "*Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection." FEMS microbiology reviews **37**(1): 3-22.

Pearson, T. H. and R. Rosenberg (1978). "Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment." Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev **16**: 229-311.

Peet, R. K. (1974). "The measurement of species diversity." Annual review of ecology and systematics: 285-307.

Pérez-García, G., R. Basurto-Ríos, et al. (2010). "Potential effect of a putative σ H-driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*." Journal of Invertebrate Pathology **104**(2): 140-146.

Perez, C., et al., (2007). "*Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure." Cell Microbiol **9**(12): 2931-7.

Perez C, F. L., Sun JG, et al. (2005). "*Bacillus thuringiensis* subsp israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. ." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences **102**: 18303-18308.

PETERSON, G. L. (1977 July 29). "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.

Pfannenstiel, M. A., W. C. Cray, Jr., et al. (1990). "Toxicity of protease-resistant domains from the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* bioassays." Appl Environ Microbiol **56**(1): 162-6.

Pigott, C. R. and D. J. Ellar (2007). "Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity." Microbiology and molecular biology reviews **71**(2): 255-281.

Poncet, S., A. Delécluse, et al. (1995). "Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals." Journal of Invertebrate Pathology **66**(2): 131-135.

Poncet, S., E. Dervyn, et al. (1997). "SpoOA represses transcription of the cry toxin genes in *Bacillus thuringiensis*." Microbiology **143**(8): 2743-2751.

Poopathi, S. and S. Abidha (2010). "Mosquitocidal bacterial toxins (*bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis*): mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance." Physiology and Pathophysiology **1**(3): 22-38.

Poopathi, S. and B. Archana (2012 Mar). "A novel cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for mosquito control." Trop Biomed **29**(1): 81-91.

Porcar, M. (1999). "Identification and characterization of the new *Bacillus thuringiensis* serovars *pirenaica* (serotype H57) and *iberica* (serotype H59)." Journal of Applied Microbiology **87**: 640–648.

Pornwiroon, W., G. Katzenmeier, et al. (2004). "Aromaticity of Tyr-202 in the α 4- α 5 loop is essential for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin." BMB Reports **37**(3): 292-297.

Pornwiroon, W., G. Katzenmeier, et al. (2004). "Aromaticity of Tyr-202 in the α 4- α 5 loop is essential for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin." BMB Reports **37**(3): 292-297.

Puntheeranurak, T., C. Stroh, et al. (2005). "Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes." Ultramicroscopy **105**(1-4): 115-24.

Rainey, F. A., N. L. Ward-Rainey, et al. (1996). "Clostridium paradoxum DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences." Microbiology **142**(8): 2087-2095.

Rajamohan, F., E. Alcantara, et al. (1995). "Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles." Journal of bacteriology **177**(9): 2276-2282.

Ramette, A. (2009). "Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities." Applied and environmental microbiology **75**(8): 2495-2505.

Ramirez-Peralta, A., P. Zhang, et al. (2012). "Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores." Applied and environmental microbiology **78**(8): 2689-2697.

Ranjard, L., F. Poly, et al. (2000). "Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment." Research in Microbiology **151**(3): 167-177.

Ranjard L., D. S., Jolivet C., Saby N.P.A., Thioulouse J., Harmand J., Loisel P., Rapaport A., S. P. Fall S., Joffre R., Chemidlin-Prévost Bouré N., Maron P.A., Mougél C., Martin M.P., et al. (2010). "Biogeography of Soil Microbial Communities: a Review and a Description of the Ongoing French National Initiative. ." Agronomy for Sustainable development **30**: 359-365.

Rao, M. B., A. M. Tanksale, et al. (1998). "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 597-635.

Rappé, M. S. and S. J. Giovannoni (2003). "The uncultured microbial majority." Annual Reviews in Microbiology **57**(1): 369-394.

Rasko, D. A., et al., (2005). "Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 303-329.

Rausell, C., I. Garcia-Robles, et al. (2004). "Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say)." Biochimica et Biophysica Acta **1660**: 99 – 105.

Ravoahangimalala, O. and J.-F. Charles (1995). "In vitro binding of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae)." FEBS letters **362**(2): 111-115.

Raymond, B., P. R. Johnston, et al. (2010). "*Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?" Trends in microbiology **18**(5): 189-194.

Reddy, Y. C. and G. Venkateswerlu (2002). "Intracellular Proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and a Protease-Deficient Mutant Btk-q." CURRENT MICROBIOLOGY **45**: 405-409.

Rees, J. S., P. Jarrett, et al. (2009). "Peritrophic membrane contribution to Bt Cry 3 δ -endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor." Journal of Invertebrate Pathology **100**(3): 139-146.

Revina, L. P., Kostina, L.I., Ganushkina, L.A., Mikhailova, A.L., Zalunin, I.A., Chestukhina, G.G. (2004). "Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis Cry11A endotoxin from fragments corresponding to its N- and C moieties restores its original biological activity." Biochemistry **69**: 181–187.

Revina, L. P. K., L.I.; Dronina, M.A.; Zalunin, I.A.; Chestukhina, G.G.; Yudina, T.G.; and A. V. I. Konukhova, A.V. Can. (2005). "Novel antibacterial proteins from entomocidal crystals of *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis." J. Microbiol **51**: 141–148.

Rezsohazy, R., et al., (1993). " IS231V and W from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis, two distant members of the IS231 family of insertion sequences." Plasmid **30**(2): 141-9.

Rezsohazy, R., et al., (1993). "The IS4 family of insertion sequences: evidence for a conserved transposase motif. ." Mol Microbiol **9**(6): 1283-95.

Rezza, G., L. Nicoletti, et al. (2007). "Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region." The Lancet **370**(9602): 1840-1846.

Rodríguez-Almazán, C., Reyes, E.Z., Zúñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., and A. M. Evans, Likitvivatanavong, S., Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. (2012). "Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae." Biochem. J. **443**: 711–717. .

Rodriguez-Almazan, C., I. Ruiz de Escudero, et al. (2010). "The amino-and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles in toxin oligomerization and pore formation." Biochemistry **50**(3): 388-396.

Rosso, M.-L. and A. Delecluse (1997). "Contribution of the 65-kilodalton protein encoded by the cloned gene cry19A to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. jgathesan." Applied and environmental microbiology **63**(11): 4449-4455.

Rukmini, V., C. Y. Reddy, et al. (2000). "*Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin." Biochimie **82**(2): 109-116.

S, K., K. R, et al. (2009 Jul). "Identification of a catabolite-responsive element necessary for regulation of the cry4A gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." J Bacteriol **191**(14): 4687-92.

SA, L. P. and C. S. JA (2007). "THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF *Bacillus thuringiensis* TOXINS: A REVIEW." Acta biol. Colomb **12**: 19-32.

Sacchi, C. T., A. M. Whitney, et al. (2002). "Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool." Journal of clinical microbiology **40**(12): 4520-4527.

Sadeghifard, N., V. Gürtler, et al. (2006). "The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains." Applied and environmental microbiology **72**(11): 7311-7323.

Saeki, Y. and S. Shiro (2014). "Comparison of Soybean-Nodulating Bradyrhizobia Community Structures Along North Latitude Between Japan and USA."

Saenko, E. (2001). "Comparison of the properties of phospholipid surfaces formed on HPA and L1 biosensor chips for the binding of the coagulation factor VIII." Journal of Chromatography A **921**: 49–56.

Sal-Man N, O. Z., Shai Y. (2002 Oct). "Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells." Biochemistry **41**(39): 11921.

Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(12): 5463-5467.

Sangwan, P., S. Kovac, et al. (2005). "Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia." Applied and environmental microbiology **71**(12): 8402-8410.

Sarthou J.P. (2006). "Dossier : la biodiversité dans tous ses états." Alter Agri n°76: p 4-14.

Sashi Kant, R. K., and Nirupama Banerjee (2009). "Identification of a Catabolite-Responsive Element Necessary for Regulation of the cry4A Gene of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*." Journal of bacteriology **191**(14): 4687–4692.

Schloss, P. D., S. L. Westcott, et al. (2009). "Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities." Applied and environmental microbiology **75**(23): 7537-7541.

Schnepf, E., N. Crickmore, et al. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." Microbiology and molecular biology reviews **62**(3): 775-806.

Schnepf, H. E. and H. R. Whiteley (1981). "Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **78**(5): 2893-2897.

Sekar, V. and B. C. Carlton (1985). "Molecular cloning of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis." Gene **33**(2): 151-158.

Sen, K., Honda, G., Koyama, N., Nishida, M., Neki, A., Sakai, H., Himeno, M., Komano, T. (1988). "Cloning and nucleotide sequences of the two 130 kDa insecticidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis." Agric. Biol. Chem. **52**: 873–878. .

Shan, S., Y. Zhang, et al. (2011). "A Cry1Ac toxin variant generated by directed evolution has enhanced toxicity against Lepidopteran insects." Current microbiology. **62**(2): 358-365.

Shannon, J. D., E. N. Baramova, et al. (1989). "Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin." Journal of Biological Chemistry **264**(20): 11575-11583.

Shao, Z., Z. Liu, et al. (2001). "Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*." Applied and environmental microbiology **67**(12): 5362-5369.

Sharpe E.S., H. A. I., Toolan S.C., (1978). "Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* by flotation." Journal of Invertebrate Pathology **34**: 315-316.

Silo-Suh, L. A., B. J. Lethbridge, et al. (1994). "Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85." Applied and environmental microbiology **60**(6): 2023-2030.

Singh, B. K., P. Millard, et al. (2004). "Unravelling rhizosphereâ€“microbial interactions: opportunities and limitations." Trends in microbiology **12**(8): 386-393.

Smith, G. P., et al., (1994). "Nucleotide sequence and analysis of an insertion sequence from *Bacillus thuringiensis* related to IS150." Plasmid **32**(1): 10-8.

Smith, R. A., G.A. Couche, (1991). "The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. ." Appl Environ Microbiol, **57**(1): 311-5.

Soberon, M., S. S. Gill, et al. (2009). "Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?" Cellular and molecular life sciences **66**(8): 1337-1349.

Soberón, M., C. Rodriguez-Almazán, et al. (2012). "*Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field." Pesticide Biochemistry and Physiology **104**(2): 111-117.

Sogin, M. L., H. G. Morrison, et al. (2006). "Microbial diversity in the deep sea and the underexplored â€œrare biosphereâ€“." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(32): 12115-12120.

Speijer, H., P. H. M. Savelkoul, et al. (1999). "Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit." Journal of clinical microbiology **37**(11): 3654-3661.

Spratt, B. G. (1999). "Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet." Current opinion in microbiology **2**(3): 312-316.

Sreshty, M. A., S. Misra, et al. (2011 Jan). "Interpreting the SDS-PAGE protein patterns with self-organizing maps: application for the characterization of mosquito-pathogenic *Bacillus* strains." J Appl Microbiol **110**(1): 239-47.

Stein C, J. G., Chalmers T, Berry C. (2006 Mar). "Transcriptional analysis of the toxin-coding plasmid pBtoxis from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Appl Environ Microbiol.

Stein, C., G. W. Jones, et al. (2006). "Transcriptional analysis of the toxin-coding plasmid pBtoxis from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis." Appl Environ Microbiol **72**(3): 1771-6.

Stern, M. J., G. F.-L. Ames, et al. (1984). "Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome." Cell **37**(3): 1015-1026.

Stewart, G. S., K. Johnstone, et al. (1981). "Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction." Biochem J **198**(1): 101-6.

Svensson, B., K. Ekelund, et al. (2004). "Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants." International Dairy Journal **14**(1): 17-27.

Swift M.J., A. O., Brussaard L., Briones M., Couteaux M., Ekschmitt K., Kjoller A., Loiseau P., and Smith P. (1998). "Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: three case studies." Global Change Biology **4**: 729-743.

Tabashnik, B. E. (1994). "Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*." Annual Review of Entomology **39**: 47-79.

Tabashnik, B. E., Y.-B. Liu, et al. (1997). "One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(5): 1640-1644.

Takeshi Ito, T. I., Ken Sahara, Hisanori Bando, Shin-ichiro Asano. (2006). "Cloning and Expression of Two Crystal Protein Genes, cry30Ba1 and cry44Aa1, Obtained from a Highly Mosquitocidal Strain, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* INA288." Appl Environ Microbiol **72**(8): 5673–5676.

Tan, F., J. Zhu, et al. (2009). "Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, cry54Aa1 and cry30Fa1, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28." Current microbiology **58**(6): 654-659.

Tan, Y., W.P. Donovan, (2001). "Deletion of aprA and nprA genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. ." J Biotechnol **84**(1): 67-72.

Tarlera, S., K. Jangid, et al. (2008). "Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77 000 years of ecosystem development." FEMS microbiology ecology **64**(1): 129-140.

Taylor, A. (1993). "Aminopeptidases: structure and function." The FASEB Journal **7**(2): 290-298.

Teixeira Corrêa RF, A.-A. D., Monnerat RG, Ribeiro BM. (2012). "Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells." PLoS One.

TEMEYER, K. B. (May 1984). "Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the Dipteran *Haematobia irritans*." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY: 952-955.

Tetreau, G., R. Stalinski, et al. (2013). "Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **108**(7): 894-900.

Thaphan, P. (2008 Sept-Oct). "Isolation, toxicity and detection of cry gene in *Bacillus thuringiensis* isolates in Krabi province, Thailand." Songklanakarin J. Sci. Technol **30** (5): 597-601.

Thiery, I., Delecluse, A., Tamayo, M.C., Orduz, S. (1997). "Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. ." Appl. Environ. Microbiol. **63**: 468–473. .

Thomas DJI, M. J., Whipps JM, Saunders JR (2001). "Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae." Applied And Environmental Microbiology **67**: 330-338. .

Thomas, W. E., & Ellar, D. J. (1983). "Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var israelensis insecticidal δ -endotoxin." FEBS letters **154**(2): 362-368.

Thorne, L., F. Garduno, et al. (1986). "Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "kurstaki" and "israelensis"." J Bacteriol **166**(3): 801-11.

Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, et al. (1999). "Opening the black box of soil microbial diversity." Applied Soil Ecology **13**(2): 109-122.

Tiewsir, K. and C. Angsuthanasombat (2007). "Structurally conserved aromaticity of Tyr 249 and Phe 264 in helix 7 is important for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin." BMB Reports **40**(2): 163-171.

Tilquin, M., M. Paris, et al. (October 20, 2008). "Long Lasting Persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp.israelensis (Bti) in Mosquito Natural Habitats." **3**(10).

Todd R., D. R., Kim Y., Wong DT. (2001). "From the chromosome to DNA: Restriction fragment length polymorphism analysis and its clinical application." J Oral Maxillofac Surg. **59**(6): 660-7.

Vadlamudi, R. K., T. H. Ji, et al. (1993). "A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner." Journal of Biological Chemistry **268**(17): 12334-12340.

Van Berkum, P., Z. Terefework, L. Paulin, S. Suomalainen, K. Lindstrom, and B. D. Eardly. (2003). "Discordant phylogenies within the *rrn* loci of Rhizobia. ." J Bacteriol. **185**: 2988-2998.

Versalovic, J. and J. R. Lupski (2002). "Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers." Trends in microbiology **10**(10): s15-s21.

Versalovic, J., M. Schneider, et al. (1994). "Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction." Methods in molecular and cellular biology **5**(1): 25-40.

Verville, J. H., S. E. Hobbie, et al. (1998). "Response of tundra CH₄ and CO₂ flux to manipulation of temperature and vegetation." Biogeochemistry **41**(3): 215-235.

Vila, J., M. A. Marcos, et al. (1996). "A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex." Journal of Medical Microbiology **44**(6): 482-489.

Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O., and Chet, I. (2001). "Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM." FEMS Microbiol. Lett. **200**: 169-174.

von Wintzingerode, F., F. A. Rainey, et al. (1997). "Identification of environmental strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rDNA oligonucleotide probe." FEMS microbiology ecology **24**(3): 201-209.