

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة
قسم الميكروبيولوجيا و الحياة

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Les bactéries entomopathogènes agents de lutte contre Fusarium

Présenté par : BELGHOUL NADJET Le24/06/2023

Jury d'évaluation :

Président :MEZIANI MERIEM (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : ABDELAZIZ OUIDED (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : MEGHNOUS OUISSEM (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire

2022 – 2023



Remerciements

ET

dédicaces





REMERCIEMENTS

Avant tous, on remercie ALLAH le tout puissant de nous avoir aidées à surmonter toutes les difficultés lors de la réalisation de ce modeste travail.

On remercie vivement notre encadreur M.elle : Abdelaziz wided, d' avoir accepté d' encadrer ce travail.

Nos remerciements vont également aux membres du jury, pour l'évaluation de ce travail.

Qu' elles trouvent ici, notre reconnaissance la plus sincère.

À Mme Meziari Meriem, qui nous avoir fait l'honneur d' accepter de présider ce jury.

À Mme Meghencus Ouissem, qui nous a fait l'honneur d' accepter d' examiner notre travail.

Merci infiniment à tous les enseignants du Département de Microbiologie.

Merci





DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux personnes, les plus chers au monde que je ne remercierais jamais assez : leur aide, encouragements, Soutien, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie.

À mes chers parents : Mohamed Saleh et Loucif Zahra


À Mon mari Ahssan pour ses sacrifices, son soutien moral et matériel, sa gentillesse, son profond attachement qui m'ont permis de réussir mes études.

À ma chère sœur : Souad, Seria Et Samiha pour la confiance et l'espoir qu'elle a mis en moi. Elle m'a toujours réconfortée et poussée en avant.

À Mes chers frères : Kamel, Fateh et Loheir, Que ce travail soit pour eux un exemple de persévérance de ma part.

À Mes chers enfants que dieu vous protège.

*À ma chère Madjdu qu'elle mérite toute le bonheur du monde je vous remercier ma puce
dieu te garde*



Résumé

Fusarium est parmi les champignons les plus agressifs provoquant la tolérance de nombreuses espèces de plantes, en particulier les racines. Il y a des décennies, les agriculteurs utilisaient des biopesticides pour supprimer ces champignons nocifs pour les cultures agricoles. À l'heure actuelle, ils ont été classés en trois catégories principales par origine microbienne, végétale ou animale et présentent de nombreux avantages pouvant être utilisés dans l'agriculture biologique traditionnelle; notre étude est spécifique aux biopesticides à base de métabolites organiques, qui sont les plus commercialisés car ils contiennent un travail fongique général. Cela réduit l'occurrence du parasite *Fusarium* qui contrôle le parasite *Fusarium* et la pourriture des racines comme tomates et blé.

Mots clés :

Lutte biologique, Bactéries entomopathogènes, *B.thuringiensis*, *Fusarium*.

Abstract

Fusarium is among the most aggressive fungi causing tolerance of many species of plants, especially the roots. Decades ago, farmers used biopesticides to suppress these harmful fungi for agricultural crops. At present, they have been classified into three main categories by microbial, plant or animal origin and have many benefits that can be used in traditional organic farming; our study is specific to biopesticides based on organic metabolites, which are the most commercialized because they contain a general fungal work. This reduces the occurrence of the *Fusarium* parasite which controls the *Fusarium* parasite and root rot such as tomatoes and wheat.

key words:

Biological control, Entomopathogenic bacteria, *B.thuringiensis*, *Fusarium*.

ملخص

الفوزاريوم هو من بين الفطريات الأكثر عدوانية المسببة لذبول العديد من الأنواع النباتية خاصة الجذور

منذ عقود من الزمن تم استخدام المبيدات الحيوية لقمع هذه الفطريات المضرّة بالمحاصيل الزراعية من طرف المزارعون؛
أما في الوقت الحاضر تم تصنيفها إلى ثلاث فئات رئيسية حسب أصلها ميكروبي أو نباتي أو حيواني ولها مزايا عديدة
يمكن استخدامها في الزراعة العضوية التقليدية؛ نخص بدراستنا هاته المبيدات الحيوية القائمة على التوريجينيسيس العضوية
والتي تعتبر الأكثر توفرا تجاريا لاحتوائها على عمل فطري عام وهذا ما يؤدي إلى تقليل حدوث افة الفوساريوم التي تتحكم
في افة راس الفوساريوم وتعفن الجذر مثل الطماطم والقمح

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الممرضة للحشرات ، عامل المكافحة البيولوجية ، الفوزاريوم

Table des matières

Sommaire.....	8
Introduction.....	2
Chapitre 1 : Les bactéries entomopathogènes	
1. Généralités sur les bactéries entomopathogènes	5
2. Définition	6
3. Différentes Types des bactéries entomopathogènes	6
4. Interaction insectes microorganismes.....	9
4.1. Les relations de parasitisme : les micro-organismes entomopathogènes.....	9
4.2. Les relations de mutualisme	11
4.2.1. Les symbioses protectrices.....	11
4.2.2. Les symbioses nutritives	12
5. Mode d'action	12
6. Avantages et les inconvénients des bactéries entomopathogènes.....	13
6.1. Avantages.....	13
6.2. Inconvénients	14
Chapitre 2 : Bacillus thuringiensis	
1. Bacillus.....	16
2. Bacillus thuringiensis	17
3. Identification et classification des sous-espèces de Bt	18
4. Cycle de croissance de Bt	20
5. Méthodes de caractérisation de Bacillus thuringiensis	21
5.1. Le sérotypage	21
5.2. Méthodes phénotypiques et biochimique	22
5.3. Méthodes moléculaire	22
6. Génome et plasmide de Bt.....	23
7. Les δ -endotoxines de B. thuringiensis et Leur mode d'action.....	24
8. Utilisations de B. thuringiensis.....	25
Chapitre 3 Fusarium et la maladie fusariose	
1. Généralités sur le genre Fusarium.....	27
2. Evolution taxinomique et classification récente	27
3. Physiologie du Fusarium.....	28
4. Pouvoir pathogène et potentiel toxigène	28

5. Espèces de Fusarium	29
5.1. Le groupe du chancre fusarien.....	29
5.1.1. Fusarium solani (pourriture fusarienne)	30
5.1.2. Fusarium oxysporum.....	30
6. Fusariose et mécanisme d'invasion des plantes.	31
6.1. Dégâts de la fusariose.....	31
6.2. Dommages et cycle de la fusariose	33

Chapitre 04 : Moyens de lutte contre la fusariose

1. Moyens de lutte contre la fusariose.....	35
1.1 .Bio-fongicides.....	35
1.2. Bacillus. thuringiensis agent de lutte biologique	35
Conclusion :	38
Référence bibliographique	40

Liste des tableaux

Tableau 1. Les interactions insectes bactéries et leurs insectes hôtes (Vallet-Gelyet *al.*, 2008).....7

Tableau 2 : Classification courante de 67 sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* basée sur leur antigène flagellaire (H) (WHO, 1999)..... .19

Tableau 3 : classification de genre *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2015)....28

Liste des figures

Figure 1 : diagramme de différentes bactéries entomopathogènes (Asolkar, R <i>et al.</i> ,2019).....	9
Figure 2 : Exemples de contamination par des champignons entomopathogènes(Vega <i>et al.</i> , 2012).....	11
Figure 3: coléoptère du genre <i>Paederus</i> (Entomart).....	11
Figure 4: <i>Bacillus thuringiensis</i> (Naima, 2020).....	17
Figure 5: Schéma représentatif du cycle vital de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bechtelet <i>al.</i> , 1976).....	21
Figure 6: le mode d'action de <i>Bacillus thuringiensis</i> dans l'intestin des lépidoptères. Après ingestion d'un mélange de spores et de cristaux (Sanchis. V ,2016).....	24
Figure 7 : la sporulation de <i>fusarium</i> sur la tige d'une plante de cantaloup (Lapeyre, 2020).....	30
Figure 8 : Symptômes de la pourriture racinaire causée par <i>Fusarium oxysporum f. sp. Radicislycopersici</i> (Fouré <i>et al.</i> , 2020).....	30
Figure 9: Symptômes de la fusariose vasculaire de la tige de tomate causée par <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> (Spiga , 2015).....	32
Figure 10 : symptômes de la flétrissure fusarienne (<i>fusarium oxysporum f.sp. phseoli</i>) sur les racines de plante de haricot secs (Lapeyre, 2020).....	33

Liste des abréviations

B: *Bacillus*

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Ba: *Bacillus anthracis*

Bc: *Bacillus cereus*

Btk: *Bacillus thuringiensis* kurstaki

Bti: *Bacillus thuringiensis* israelensis

Bsp: *Bacillus sphaericus*

AMPS : Peptides antimicrobiens

Cry: crystal

Cyt: cytotoxic

PCR: polymerase chain reaction

RFLP: polymorphisme de longueur des fragments de restriction

AFLP: polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

MLST: typage par séquençage multilocus

CRP : protéine C réactive

DAR: délai avant récolte

pH : potentiel Hydrogène

ADN : Acide Désoxy-ribo-Nucléique.



Introductions



Introduction

Les bactéries entomopathogènes à Gram positif ont fait l'objet d'une attention considérable en raison de leur utilité dans la lutte contre les insectes nuisibles dans l'agriculture et les insectes vecteurs de maladie humaine. Depuis la découverte du premier pathogène de ce type, *Bacillus thuringiensis* (Bt), il y a un peu plus d'un siècle (**Beegle CC, 1992**), plusieurs autres espèces bactériennes entomopathogènes ont été identifiées. Les pulvérisations de *B. thuringiensis* sporulé ont une longue histoire d'utilisation sûre pour la lutte antiparasitaire dans l'agriculture, et plus récemment, les pulvérisations de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) et de *Bacillus sphaericus* (Bsp) ont été utilisées pour lutter contre les moustiques et les mouches noires porteurs de maladies (**Becker N. 2000**). Depuis 1996, des plantes cultivées transgéniques ont été commercialisées qui expriment le Cry entomocidique protéines de *B. thuringiensis*, rendant ces plantes résistantes à plusieurs insectes nuisibles (**de Maagd RA et al., 1999**).

Les bactéries entomopathogènes à Gram positif examinées ici forment des endospores dans des conditions défavorables et, coïncidant avec la sporulation, forment des paraspores. Inclusions cristallines contenant une ou plusieurs protéines insecticides. Ces les protéines sont toxiques pour les insectes par ingestion, généralement par leur action sur l'intestine moyenne cellule de l'épithélium et présentent un large éventail de spécificités. A une exception près, toutes ces bactéries étaient à l'origine considérées comme différentes espèces du genre *Bacillus*. Plus récemment, les développements de la systématique moléculaire ont incité la redistribution de ces espèces en plusieurs genres différents (**Priest FG. 2000**). L'espèce de loin la plus étudiée est *B. thuringiensis*. Programmes de dépistage ont identifié des milliers de souches différentes, qui ont toutes une gamme d'hôtes limitée mais couvrent ensemble un large éventail d'ordres d'insectes (Lépidoptères, Diptères, Coléoptères, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera et Mallophaga) et même d'autres organismes tels que les nématodes, les acariens et les protozoaires (**Feitelson JS et al., 1992**). Bt semble être une bactérie commune trouvée dans diverses niches écologiques telles que le sol, les surfaces des plantes, la poussière des produits stockés et les insectes. La production de cristaux augmente évidemment la gamme d'hôtes de Bt en lui fournissant un moyen d'accès aux nutriments de l'hémocèle dans un insecte sensible, mais le véritable rôle écologique du Bt fait encore débat. Au niveau du génome, *B. thuringiensis* est si étroitement lié à *Bacillus cereus*, qui occupe les mêmes niches mais ne produit pas de cristaux, qu'ils peuvent être considérés comme appartenant à la même espèce (**Helgason E et al., 2000**). Bien qu'il puisse y avoir des

différences génétiques qui déterminent le maintien de plasmides porteurs de gènes de toxine, qui à leur tour déterminent si une bactérie est pathogène humain ou insecte.



**Chapitre 1 :Les bactéries
entomopathogènes**



1. Généralités sur les bactéries entomopathogènes

Les bactéries entomopathogènes sont des organismes procaryotes unicellulaires dont la taille varie de moins de 1 μm à plusieurs μm de longueur. Les bactéries à parois cellulaires rigides sont des coques, en forme de bâtonnet et en spirale, tandis que les bactéries sans parois cellulaires sont pléomorphes. Plus de 100 bactéries ont été identifiées comme pathogènes arthropodes, parmi lesquelles *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. cereus* et *B. popilliae* ont reçu le plus d'attention en tant qu'agents de contrôle microbien. La majorité des agents pathogènes bactériens des insectes nuisibles appartiennent aux familles bactériennes Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae et Micrococcaceae. Ces familles de bactéries représentent généralement des épiphytes ou des pathogènes faibles ; cependant, certains d'entre eux sont très virulents pour leurs hôtes respectifs. Parmi les bactéries entomopathogènes, une grande attention a été accordée à la famille des Bacillaceae (**Kalha et al., 2019**).

Certaines des espèces bactériennes appartenant au genre *Bacillus* sont hautement pathogènes pour les arthropodes, telles que *Bacillus popilliae*, qui provoque la maladie des spores laiteuses chez les scarabées, tandis que *B. sphaericus* est très virulent pour les moustiques. *Bacillus thuringiensis* (Bt) est répandu dans le sol, est un agent pathogène mortel de divers ordres et est l'agent de lutte biologique entomopathogène le plus largement utilisé. Il existe actuellement plus de 40 produits Bt disponibles pour lutter contre les insectes nuisibles, ce qui représente 1 % du marché mondial des insecticides (**Evans, 2008**).

La sous-espèce Bt représente un groupe d'organismes qui se produisent naturellement et peuvent être ajoutés à un écosystème pour contrôler les insectes. Les produits commerciaux Bt peuvent être appliqués comme insecticide sur le feuillage, le sol, les environnements aquatiques et les installations de stockage des aliments. Après l'application de Bt à un écosystème, l'organisme peut persister en tant que composant de la microflore naturelle (**Sharma et al., 2014**).

2. Définition

Les entomopathogènes sont des micro-organismes pathogènes pour les arthropodes tels que les insectes, les acariens et les tiques. Plusieurs espèces de bactéries, de champignons, de nématodes et de virus naturels infectent une variété d'arthropodes nuisibles et jouent un rôle important dans leur gestion. Certains entomopathogènes sont produits en masse *in vitro* (bactéries, champignons et nématodes) ou *in vivo* (nématodes et virus) et commercialisés. Dans certains cas, ils sont également produits à petite échelle pour un usage local non commercial. L'utilisation d'entomopathogènes comme bio pesticides dans la lutte antiparasitaire est appelée lutte microbienne, qui peut être un élément essentiel de la lutte antiparasitaire intégrée contre plusieurs ravageurs, Certains entomopathogènes ont été ou sont utilisés dans une approche classique de contrôle microbien où des micro-organismes exotiques sont importés et libérés pour gérer les ravageurs envahissants pour un contrôle à long terme. La libération de micro-organismes exotiques est hautement réglementée et n'est effectuée par des agences gouvernementales qu'après des tests approfondis et rigoureux. En revanche, les entomopathogènes disponibles dans le commerce sont libérés par des méthodes d'application inondées en tant que bio pesticides et sont couramment utilisés par les agriculteurs, les agences gouvernementales et les propriétaires. Comprendre le mode d'action, les adaptations écologiques, la gamme d'hôtes et la dynamique des interactions pathogène-arthropode- plante est essentiel pour utiliser avec succès des bios pesticides à base d'entomopathogènes pour la lutte antiparasitaire dans l'agriculture, l'horticulture, les vergers, le paysage, le gazon et les environnements urbains (Dara, 2017).

3. Différentes Types des bactéries entomopathogènes

Plusieurs agents pathogènes arthropodes ont été identifiés par les familles bactériennes Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae et Streptococcacées Jusqu'à présent. Habituellement, ces familles contiennent des épiphytes, mais certains agents pathogènes ont été démontrés avoir des effets très toxiques sur leurs hôtes. Les deux genres (photorhabdus et xénorhabdus) portés par des nématodes ont été utilisés à des fins agricoles de différentes manières (Tohet *al.*, 2006; Shigenobuet *al.*, 2000; Akmanet *al.*, 2002). Ils vivent symbiotiquement dans le canal alimentaire des nématodes entomopathogènes et produisent une série de toxines (Forst *et al.*, 2007). Ces toxines peuvent être appliquées sur des feuilles de plantes CRP comme extraits ou suspensions cellulaires pour contrôler les insectes (Munsonet *al.* 1991). De plus, les gènes qui codent des toxines peuvent être utilisés

pour développer des plantes transgéniques pour protéger les cultures (**Bowen,2000**). Parmi les bactéries entomopathogènes, la famille Bacillaceae a attiré beaucoup d'attention. *Bacillus thuringiensis* (BT) est une espèce bactérienne portée au sol et une série de nombreux agents pathogènes mortels. Il est très utilisé comme agent de biocontrol pour les insectes nuisibles (**Pigott, Kalhaet al., 2014**).

Tableau 1. Les interactions insectes bactéries et leurs insectes hôtes (Vallet-Gelyet al., 2008).

Bactérie	Type d'interaction	Mode d'interaction	Hôte
<i>Erwinia aphidicola</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Peaaphid</i>
<i>Dickeyadadantii</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Pea aphid</i>
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Drosophila, Bombyx, galleria</i>
<i>Yersinia pestis</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Rat flea</i>
<i>Serratia entomophila</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Grass grub</i>
<i>Serratia marcescens</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Drosophila</i>
<i>Photorhabdus sp.</i>	Pathogène	Entrée assistée	<i>Lepidopteran</i>
<i>Xenorhabdus sp.</i>	Pathogène	Entrée assistée	<i>Lepidopteran</i>
<i>Vibrio cholera</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Drosophila</i>
<i>Melissococcus pluton</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Honey bee</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Different orders</i>
<i>Bacillus papillae</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Scarab larvae</i>
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Scarab larvae</i>
<i>Paenibacillus larvae</i>	Pathogène	Ingestion	<i>Honey bee larvae</i>

Bacillus sphaericus	Pathogène	Ingestion	<i>Mosquito</i>
Bacillus laterosporus	Pathogène	Ingestion	<i>Bee larvae, dipteran</i>
Pseudomonas aeruginosa	Opportunists	Ingestion	<i>Caterpillar</i>
Pseudomonas aeruginosa	Opportunists	Injection direct	<i>Drosophila</i>
Bacillus cereus	Opportunists	Ingestion	<i>Galleria mellonella</i>
Erwinia carotovora	Infectieuses	Ingestion	<i>Drosophila larvae</i>
Shigella spp.	Passive	Ingestion	<i>Vector house fly</i>
Rickettsia spp.	Vecteur	Ingestion	<i>Cat flea</i>
Bartonella spp.	Vecteur	Ingestion	<i>Cat flea</i>

Certaines autres espèces de bactéries de Bacillus et de Paenibacillus sont également trouvées pathogènes pour les insectes coléoptères, diptères et lépidoptères. Par exemple, *B. Sphaericus* est très toxique pour les moustiques, alors que *Bacillus popilliae* et *Paenibacilluspopilliae* provoquent la maladie de la Spore de lait et sont utilisées contre les larves japonaises du coléoptère (**Baumann ,Zhanget al., 1997**). Jusqu'à plus de 100 espèces de Clostridium SPP., Paenibacillus spp. Et Bacillus spp. Ont été identifiés comme des agents de biocontrôle et sont hautement pathogènes pour arthropodes .En outre, il est rapporté que les biopesticides basés sur la Burkholderia Rinojensis et le Chromobacterium subtsugae peuvent cibler différents types d'acariens, car ils ont plusieurs modes d'action (**Burkhead, Martin et al., 2007**). Certains formateurs de non-croyants qui appartiennent au genre Pseudomonas, Xenorhabdu, Photorhabdus, Yersinia et Serratia ont également une grande attention en tant qu'agents microbiens (**Waterfield, Marshall et al., 2012**).

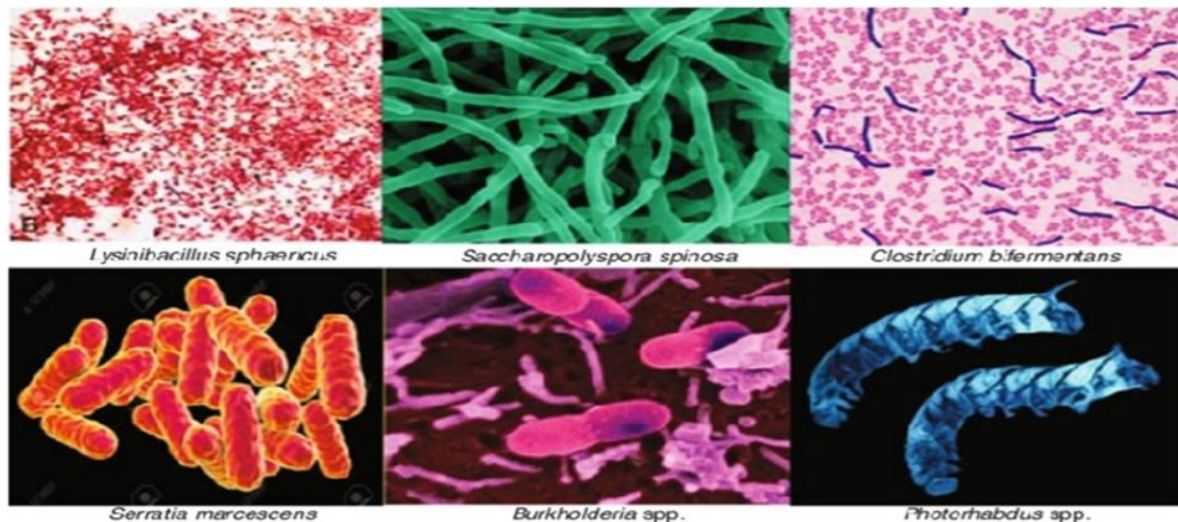


Figure 1 : diagramme de différentes bactéries entomopathogènes (Asolkar, R et al.,2019).

4. Interaction insectes microorganismes

Avec plus d'un million d'espèces décrites (plus que pour tous les autres groupes d'animaux combinés), les insectes sont de loin le clade animal le plus diversifié et le plus abondant sur Terre, en terme d'espèces, d'habitat et de biomasse. Les symbioses entre insectes et micro-organismes ont été démontrées comme pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de digestion chez l'insecte hôte (Brune,2014). Des symbioses sont également impliquées dans les mécanismes de défense des insectes face à leurs prédateurs (Nirma,2015). Enfin il a été montré qu'elles contribueraient aux communications intra- et interspécifiques. En effet les micro-organismes auraient une influence sur les systèmes d'accouplement et de reproduction de leur hôte. De plus, ils auraient la capacité de réguler la pathogénicité des micro-organismes transportés chez les insectes vecteurs de maladies (Engel,2013). Les relations entre insectes et micro-organismes sont gouvernées par des interactions allant du mutualisme au parasitisme.

4.1. Les relations de parasitisme : les micro-organismes entomopathogènes

Les relations entre micro-organismes et insectes ne sont pas toujours bénéfiques. Certaines communautés microbiennes peuvent être parasites et se développer aux dépens de leur hôte, pouvant conduire à la mort de ce dernier. Ces micro-organismes pathogènes sont appelés entomopathogènes. Les micro-organismes entomopathogènes sont une composante importante et répandue dans l'écosystème terrestre. On ne les retrouve pas exclusivement

dans les lieux d'habitat de leurs cibles. Certaines espèces se retrouvent pratiquement partout sur Terre, également au sein d'environnements extrêmes (Vega,2012). Nous nous focaliserons dans cette partie sur les entomopathogènes fongiques et bactériens.

□ **Les champignons entomopathogènes**

Les champignons entomopathogènes représentent un vaste groupe hétérogène. Ils se répartissent en 700 espèces appartenant approximativement à 100 ordres, mais beaucoup appartiennent aux ordres des Entomophthorales et des Hypocreales(Kram,2012) En tant que parasites, les champignons entomopathogènes infectent un large éventail d'insectes hôtes (**Figure 2**). Ils peuvent infecter leurs hôtes à tous les stades de développement: œufs, larves, nymphes et adultes. Au sein d'une population d'insectes, ils peuvent être transmis de trois façons: horizontalement (au sein d'une même génération par des individus infectés), verticalement (entre générations) ou être déplacés par des vecteurs. Cette troisième méthode joue un rôle important dans la dissémination des champignons vers de nouveaux habitats (**Fuxa,1987**)

Le cycle de vie des champignons entomopathogènes comprend une phase parasite (de l'infection à la mort) et une phase saprophyte (après la mort). Le processus d'infection passe par plusieurs étapes :

- Adhésion des spores fongiques à la cuticule de l'insecte,
- Pénétration de la cuticule par le tube germinatif,
- Développement du champignon au sein de l'hôte,
- Nolonisation de l'hémocœle par les hyphes.



Figure 2 : Exemples de contamination par des champignons entomopathogènes(Vega *et al.*, 2012).

4.2. Les relations de mutualisme

4.2.1. Les symbioses protectrices

Certains coléoptères du genre *Paederus* produisent une toxine appelée pédérine qui les protègent de prédateurs tels que les araignées (Figure 3) (Kellner,1996) Connue depuis les années 50, ce n'est que récemment que ses origines biosynthétiques ont été découvertes. En effet la toxine n'est observée chez le coléoptère qu'en présence d'une gammaprotéobactérie endosymbiotique du genre *Pseudomonas*. Le séquençage du génome bactérien a alors révélé un cluster de gènes cohérent avec la biosynthèse de la pédérine (Piel , 2002). Ce fut la première preuve convaincante de la capacité d'un endosymbiote à produire une toxine protégeant son hôte.



Figure 3: coléoptère du genre *Paederus* (Entomart).

4.2.2. Les symbioses nutritives

Les insectes se sont adaptés à une vaste gamme de niches écologiques où ils prospèrent souvent dans des régimes pauvres en nutriments ou réfractaires. Par conséquent, les symbioses nutritionnelles avec des micro-organismes modifiant les nutriments alimentaires sont répandues. Ces relations persistantes et durables contribuent au mode de vie de l'hôte (**Engel, 2013**) Les symbioses nutritives (trophobiose, du grec trophê = nourriture et de -biose pour symbiose) sont particulièrement bien documentées chez les insectes. Ceux se nourrissant de matière végétale, en particulier de bois (xylophage), peuvent abriter des communautés microbiennes intestinales impliquées dans la dégradation de la cellulose (**Anand, 2010**). Ces communautés microbiennes sont très diversifiées et spécifiques, s'adaptant au régime de l'hôte.

5. Mode d'action

Pour infecter n'importe quel hôte, la première tâche d'un agent pathogène consiste à entrer les cellules et les cavités de son corps de l'hôte. Cela peut se dérouler à travers trois mécanismes principaux: à travers une lésion, attaque de la cavité corporelle à travers le vecteur Nématode et la consommation d'aliments infectés par l'hôte (**Vallet-glelyet al., 2008**). Sur l'infection de l'hôte, l'agent pathogène pénètre dans l'hémolymphe (**Evans et al., 2006**). Enfin, les bactéries infectent et tuent les insectes (**Forst et al., 1997**). Après l'entrée dans le corps de l'insecte, la prochaine étape consiste à maintenir et coller l'insecte. Une variété d'enzymes sont sécrétées pour ce processus, qui fonctionnent contre les produits intestinaux de l'insecte, commencent à produire du biofilm et à modifier le gut hôte (**Jarrett, Vallet-glelyet al., 2008**). Gene AFP (Propagaseantifogène) présent dans *Serratia* spp. Est un bon exemple de cela. Il a des effets toxiques sur les cellules épithéliales de l'hôte et les favorise de la colonisation bactérienne (**Hurst et al. 2007**). Les bactéries doivent s'échapper du système immunitaire de l'hôte tout en vivant dans l'intestin de l'insecte. Ils le font soit en évitant la reconnaissance par le système immunitaire ou en supprimant la réponse immunitaire (**Vallet-glelyet al., 2008**). Les insectes hôtes utilisent un mécanisme pour s'empêcher d'infection en produisant des espèces d'oxygène réactive (ROS) et des peptides antimicrobiens (AMPS) (**Hinnebusch Singhet al., 2003**). Au contraire, les bactéries produisent des protéines qui les protègent des effets de ces composés ou de dégrader ces composés ; Après avoir évité le mécanisme de défense de l'hôte, les bactéries commencent à tuer l'hôte. Bien que plusieurs facteurs impliqués dans la pathogenèse

des bactéries ont été décrits, il n'est toujours pas clair ce que fait exactement la mort de l'insecte.

6. Avantages et les inconvénients des bactéries entomopathogènes

6.1. Avantages

Les agents de bio contrôle sont généralement reconnus comme substances à faible risque que les pesticides chimiques traditionnels. Divers avantages sont associés à l'utilisation de bactéries entomopathogènes comme agents de bio contrôle. Comme d'autres ennemis naturels, des agents pathogènes d'insectes, tels que les bactéries et les virus, peuvent atteindre un contrôle considérable sur les populations cibles. Par exemple, leur méthode d'action est généralement plus complexe que celle des produits chimiques classiques. Ils ciblent une grande variété de sites actifs, réduisant ainsi les chances de développer des organismes nuisibles résistants. Bien que les bactéries entomopathogènes soient suffisamment efficaces pour la gestion des ravageurs dans l'agriculture biologique; Néanmoins, leur utilisation en rotation et leur combinaison de produits chimiques sont fortement encouragées à réaliser une efficacité et une éco stabilité complètes. Plusieurs études ont signalé la compatibilité mutuelle et les effets synergiques des bactéries entomopathogènes et des substances chimiques (**Morris et al., 1972**).

L'utilisation de bactéries entomopathogènes dans les programmes de lutte antiparasitaire présente de nombreux avantages. Les pesticides biologiques sont non toxiques et non pathogènes lors de leur manipulation, de leur dilution, de leur mélange et de leur application. Cette propriété les rend sûrs pour l'environnement ainsi que pour les travailleurs agricoles. Les agrégats de ces bactéries entomopathogènes et virus gâchent facilement, de sorte qu'il laisse moins de résidus sur les cultures. Par conséquent, ceux-ci peuvent être utilisés même lorsque les cultures sont presque prêtes pour la récolte. Cependant, ils sont faciles à intégrer dans des accords d'agriculture biologiques. Néanmoins, l'efficacité des bio pesticides est généralement obtenue grâce à sa bonne application sur le terrain. À long terme, les pesticides organiques sont plus efficaces que les pesticides chimiques. Par conséquent, il s'avère très utile pour réduire la charge totale de pesticides chimiques sur les cultures de nourriture, d'alimentation ou de fibres (Seleena *et al.*, 1999).

6.2. Inconvénients

Bien que ces bio pesticides aient des avantages différents des pesticides chimiques, leur production de masse est toujours un défi décourageant, car ils nécessitent un substrat spécial et même des insectes hôtes vivants pour se développer. Les procédures spéciales de formulation et de stockage augmentent son coût de production et son temps. Ainsi, cela rend ces bio pesticides plus chers et moins facilement disponibles que les insecticides conventionnels. En raison de laquelle les agriculteurs ayant de grandes zones de culture peuvent avoir du mal à utiliser des bio pesticides en permanence. L'un des avantages des pesticides biologiques est sa spécificité élevée. Cependant, ce principal avantage est également son plus grand désavantage, car si les cultures sont attaquées par des organismes nuisibles non méridés, ils auront une immunité. Cela signifie que plusieurs types de pesticides biologiques peuvent être nécessaires pour contrôler tous les parasites à la fois. Par conséquent, le marché potentiel de ces produits devient restreint. Les pesticides microbiens dépendent des facteurs biotiques et abiotiques environnementaux. Il a une durée de vie limitée. L'efficacité de nombreux pesticides microbiens est réduite par exposition à la chaleur, à la solution ou à un rayonnement ultraviolet. Ainsi, leur efficacité montre une variabilité contre la population de parasites cibles de différentes zones. Par conséquent, le timing correct et une application correcte des bio pesticides sont particulièrement importants. De plus, une exposition fréquente aux toxines met la pression évolutive sur les parasites pour résister à cette toxine. En raison de cela, les organismes développent et augmentent leur résistance contre les traitements de contrôle (**Musser *et al.*, 2009**).



Chapitre 2 : *Bacillus*

thuringiensis



1. *Bacillus*

La bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été le premier microorganisme adopté dans le monde comme bio pesticide. Actuellement, il s'agit du microorganisme le plus utilisé en lutte biologique. Bt appartient à la famille des Bacillaceae faisant partie du groupe *Bacillus cereus* (Bc) qui comprennent : *Bacillus anthracis* (Ba), *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus manliponensis* et *Bacillus bingmayongensis* (Liu *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 *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'*Ephestiakuehniella* (*E. kuehniella*) (Gonzalez *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 *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 *et al.*, 2005). Cette souche s'est révélée toxique sur les moustiques (Goldberg *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.

2. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis est une bactérie aérobie Gram positif en forme de bâtonnet. Elle se caractérise par la production d'un cristal protéique lors de sporulation. Durant sa phase végétative (active), *B. thuringiensis* a une longueur de 5 μm et une largeur de 1 μm et est pourvue de flagelles (**figure 4**). *B. thuringiensis* est une bactérie ubiquitaire, ce qui signifie que l'on peut la retrouver un peu partout dans la nature; que ce soit dans le sol, sur le feuillage, dans l'eau et même dans l'air. Elle fait partie du groupe *Bacillus cereus* qui comprend six espèces dont *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus weihenstephanensis*. C'est d'ailleurs par son inclusion parasporale sous la forme d'un cristal protéique que l'on distingue formellement *B. thuringiensis* de *Bacillus cereus* (**Glare et O'Callaghan 2000**). Ce cristal protéique, essentiellement composé de delta-endotoxines, regroupe les protéines Cry et les protéines Cyt. Ces protéines représentent environ 20 % de la composition en protéines de la bactérie lors de la sporulation (**Aronson, 2002**). Ces protéines, notamment les protéines Cry, possèdent une action cytotoxique spécifique contre certains insectes nuisibles, dont les coléoptères (coccinelles), les lépidoptères (papillons) et les diptères (mouches).

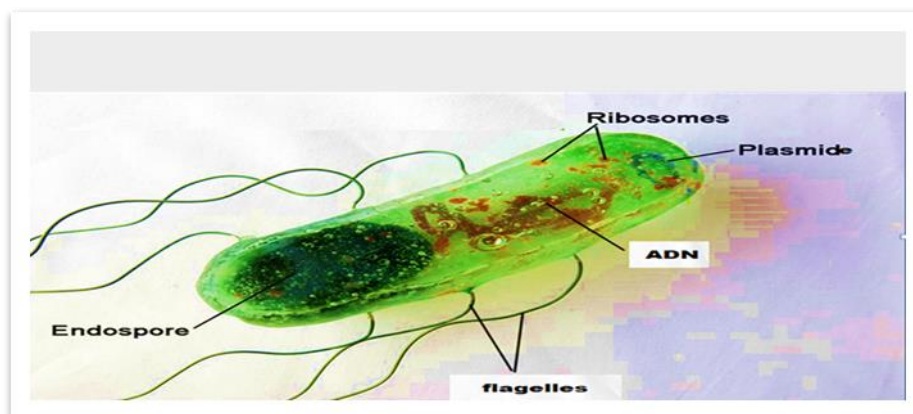


Figure 4: *Bacillus thuringiensis* (Naima, 2020).

3. 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 (**Barjacet *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 (**Barjacet *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) (**Goldberget *al.*, 1977**), les coléoptères (**Krieget *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 (**Tableau2**). La sérologie du cristal a montré qu'un cristal donné peut être produit par un ou plusieurs sérotypes H (**Krywiencyket *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 2**).

Tableau 2 : Classification courante de 67 sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* basée sur leur antigène flagellaire (H) (WHO, 1999).

Antigènes flagellaires	Sous espèces <i>B.thuringiensis</i>	Antigènes flagellaires	Sous espèces <i>B.thuringiensis</i>	Antigènes flagellaires	Sous espèces <i>B.thuringiensis</i>	Antigènes flagellaires	Sous espèces <i>B.thuringiensis</i>
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>osturiensis</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>fukoukaensis</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>andolousiensis</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>novosibisk</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>
8a, 8d	<i>nigeriensis</i>	26	<i>silo</i>	42	<i>jinighongiensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>

9	<i>tolworthi</i>	27	<i>mexicanensis</i>	43	<i>guiyanguesbus</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>navarrensis</i>		

4. 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 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 et al., 1982) qui comprennent (stade I) la formation de filament axial, (phase II) formation de l'inclusion cristalline parasporale et de la préspore, (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**). 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 5**).

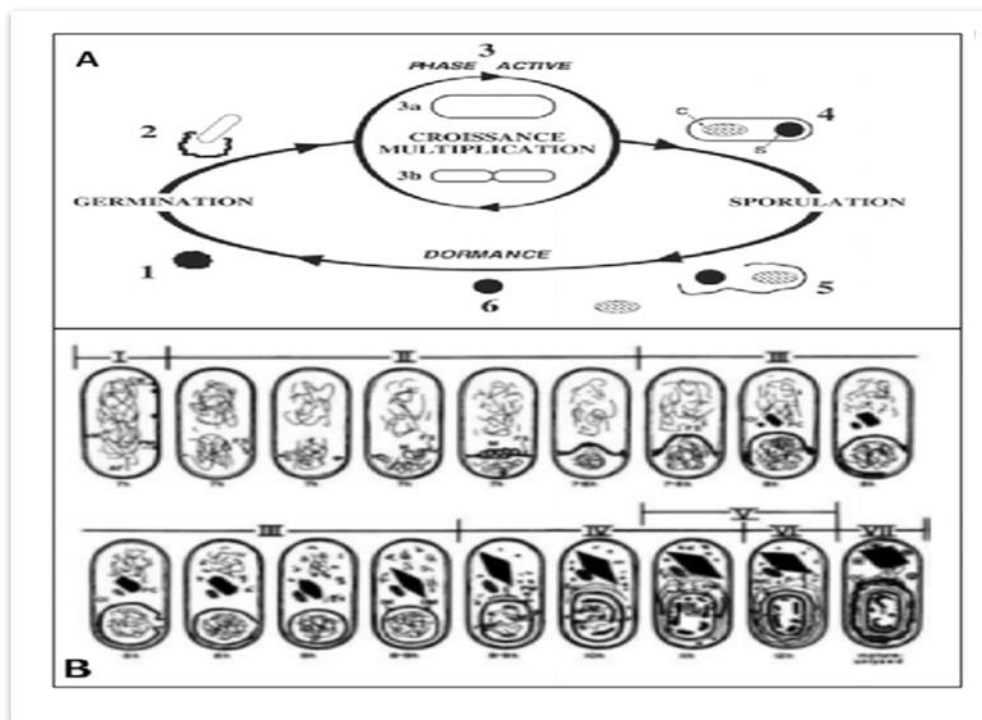


Figure 5:Schéma représentatif du cycle vital de *Bacillus thuringiensis* (Bechtelet *al.*, 1976).

5. Méthodes de caractérisation de *Bacillus thuringiensis*

5.1. Le sérotypage

Avec la découverte de nombreuses nouvelles souches de *B. thuringiensis* servant à la création de nouveaux insecticides, un système de classification vit le jour. Depuis son introduction en 1967, le sérotypage flagellaire de l'antigène H est largement utilisé (**Barjac et Bonnefoi, 1967**). Un certain ordre a pu ainsi être établi entre les différentes souches de *B. thuringiensis* basé sur l'agglutination flagellaire (basé sur l'antigène H). Pas moins de 69 sérotypes et 82 variétés sérologiques (sérovares) ont été caractérisés jusqu'à présent (**Lecadet *al.*, 1999**). De plus, le sérotypage peut réagir avec des souches de *Bacillus cereus* et ainsi fausser les résultats pour l'identification de *B. thuringiensis*. Également, il existe des souches de *B. thuringiensis* n'ayant pas de flagelles, ce qui les rendent non classifiables par sérotypage (**Gaviria et Priest, 2003**).

5.2. Méthodes phénotypiques et biochimique

Les méthodes phénotypiques et biochimiques servant à caractériser des souches de *B. thuringiensis* à travers le genre *Bacillus* sont nombreuses et certaines d'entre elles s'avèrent utiles quoique non discriminatoires. Ces méthodes sont généralement le sérotypage flagellaire de l'antigène H, les réactions biochimiques ; l'utilisation de milieux sélectifs et les bioessais (**Glairé et O'Callaghan, 2000**). Malgré ces procédés, l'identification de *B. thuringiensis* à l'intérieur du groupe *Bacillus cereus* est difficile par ces approches étant donné la proximité génétique entre les espèces de ce groupe. Les tests biochimiques API, couramment utilisés dans l'identification bactérienne, sont insuffisants pour identifier les espèces du groupe *Bacillus cereus* (**Valeroet al., 2002**).

Pour y parvenir, le moyen le plus efficace pour distinguer une souche de *B. thuringiensis* des autres espèces du groupe *Bacillus cereus* est sans contre dit la visualisation du cristal protéique par microscopie puisque ces deux espèces partagent plusieurs caractéristiques biochimiques et phénotypiques (**Glare et O'Callaghan, 2000**). Cependant, l'existence de souches de *B. thuringiensis* sans cristaux protéiques rendent inefficaces la distinction avec *Bacillus cereus* de manière phénotypique et biochimique. C'est pourquoi, au cours des dernières années, la caractérisation de *B. thuringiensis* laisse plutôt la place aux méthodes basées sur la biologie moléculaire.

5.3. Méthodes moléculaire

Le groupe *Bacillus cereus* contient six espèces dont *B. thuringiensis* et *Bacillus cereus* qui sont très rapprochés génétiquement (**Raskoet al., 2005**). En raison du caractère pathogénique de *Bacillus cereus*, plusieurs études ont été menées afin de bien différencier les souches de *B. thuringiensis* par des approches moléculaires. *B. thuringiensis* se distingue des autres bactéries par la présence de protéines cristallines codées par des gènes *cry* de nature plasmidique. L'identification par PCR de ces gènes est un bon moyen d'identifier *B. thuringiensis*. Toutefois, ces plasmides peuvent être transférables. De ce fait, lorsqu'une souche de *B. thuringiensis* perd ces plasmides, elle devient pratiquement impossible à distinguer de *Bacillus cereus* (**Chenet Tsen, 2002**). C'est pour cette raison que plusieurs autres approches moléculaires se basent sur les gènes de nature chromosomiques. Il s'agit entre autres du ciblage de gènes conservés, d'hybridation ADN, du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), la PCR multiplex, l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD-PCR), la réaction en chaîne de la polymérase avec amorce

arbitraire (AP-PCR), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) et le typage par séquençage multilocus (MLST). Certaines de ces méthodes permettent la distinction intra-espèce chez *B. thuringiensis* et *Bacillus cereus* sans toutefois différencier ces deux espèces l'une de l'autre (**Ford et al., 2009**).

De nombreuses recherches avancent même que ces deux espèces ne peuvent être différenciées sur une base génétique (**Ford et al., 2011**). Malgré l'avancé des techniques moléculaires, il demeure difficile de différencier génétiquement *B. thuringiensis* de *Bacillus cereus*, deux espèces dont leur proximité génétique suscite des débats à savoir si elles appartiennent ou non à la même espèce (**Chenet Tsen, 2002**). Bref, l'identification des espèces au sein du groupe *Bacillus cereus* est ardue au point de vue génomique et la présence de plasmides codant pour des toxines particulières telles les protéines Cry rendent la classification de *B. thuringiensis* moins laborieuse.

6. Génome et plasmide de Bt

Bt possède un génome de taille de 2.4 à 5.7 millions de paires de base (**Carlsonet al., 1994**). Des plasmides circulaires et/ou linéaires extra Chromosomiques sont trouvés dans la plupart des souches isolées de Bt (**Carlsonet 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 et al., 1981**). Une même souche peut contenir 1 à 17 plasmides de 2 à 80 MDa (**Aptosoglouet 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 (**Jensenet 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 (**Carltonet al., 1985**). 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).

7. Les δ -endotoxines de *B. thuringiensis* et Leur mode d'action

À ce jour plusieurs centaines de gènes codant pour des δ -endotoxines ont été répertoriées. Chaque protéine Cry possède généralement un spectre d'activité restreint et limité aux stades larvaires d'un petit nombre d'espèces. À l'heure actuelle cette famille de protéines est constituée de 70 classes. La plupart des souches de Bt contiennent généralement plusieurs δ -endotoxines différentes et ce sont les multiples combinaisons possibles, qui déterminent le spectre d'activité insecticide d'une souche donnée. Les δ -endotoxines agissent au niveau des cellules de l'épithélium intestinal. Les cristaux ingérés par les larves d'insectes sont d'abord solubilisés dans la cavité intestinale de la larve, puis la fraction active des δ -endotoxines est libérée par les protéases intestinales des insectes sensibles. Ces deux étapes sont indispensables pour conférer à Bt son activité insecticide. En effet, seules les toxines Cry activées peuvent traverser membrane périthrophique, qui ne laisse passer que de petites molécules, pour ensuite aller se fixer sur des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules épithéliales. La présence de récepteurs spécifiquement reconnus par chacune des δ -endotoxines constitue l'étape essentielle du mécanisme d'action et de spécificité de ces toxines. La toxine induit lors la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales, ce qui aboutit à une destruction rapide et presque totale de l'épithélium intestinal. Au niveau physiologique, l'intoxication se manifeste par une paralysie quasi immédiate du tube digestif qui entraîne une cessation de prise de nourriture. Ceci permet aux spores qui ont été ingérées en même temps que les cristaux, de germer, et aux bactéries issues de cette germination de se multiplier dans l'insecte provoquant une septicémie (**figure 6**) (Sanchis ,2016).

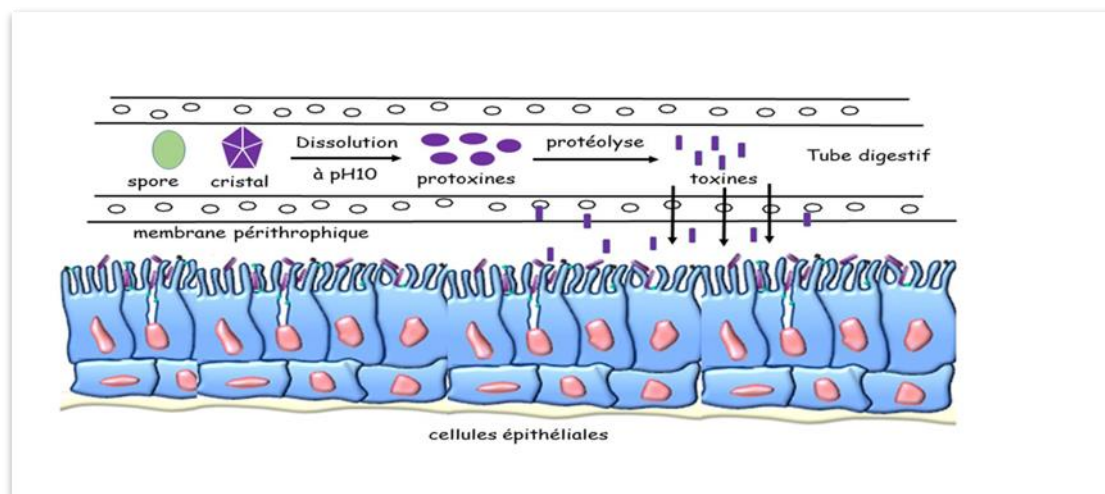


Figure 6: le mode d'action de *Bacillus thuringiensis* dans l'intestin des lépidoptères.

Après ingestion d'un mélange de spores et de cristaux (Sanchis. V ,2016).

8. Utilisations de *B. thuringiensis*

En France, les produits à base de Bt sont autorisés en forêt, vigne, arboriculture, maraîchage, arbres et arbustes d'ornement et en grandes cultures. En forêts, Bt est utilisé pour contrôler la processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa*), la tordeuse grise du mélèze (*Zeiraphera diniana*), la chenille processionnaire du chêne (*Thaumetopoea processionea*) ou le Bombyx cul brun (*Euproctis chrysorrhoea*) un ravageur des forêts de chênes. En vignoble, les préparations de Bt sont homologuées pour lutter contre les vers de la grappe : Eudémis (*Lobesia botrana*) et Cochylis (*Eupoecilia ambiguella*). En arboriculture Bt est utilisé contre la teigne de l'olivier (*Prays oleae*) et contre le carpocapse du pommier et du poirier (*Cydia pomonella*). En cultures maraîchères Bt permet de contrôler plusieurs ravageurs du chou : les piérides du chou (*Pieris brassicae*) et de la rave (*Pieris rapae*) ainsi que la noctuelle du chou (*Mamestra brassicae*) et la teigne des crucifères (*Plutella xylostella*). Bt est également utilisé contre la Noctuelle ipsilon (*Agrotis ipsilon*) et la Noctuelle des moissons (*Agrotis segetum*) qui s'attaquent à un grand nombre de cultures légumières dont la carotte, le céleri, la laitue, l'oignon, la tomate, le poivron, l'aubergine, les choux et autres espèces de crucifères. Bt est également efficace contre la Noctuelle de la tomate (*Helicoverpa armigera*) et contre la mineuse de la tomate (*Tuta absoluta*), un lépidoptère nouvellement introduit en France. Plus récemment, il a également été utilisé pour lutter contre la pyrale du buis (*Cydalima perspectalis*) une espèce envahissante, arrivée récemment en France, et qui provoque des dégâts considérables sur les haies. Enfin, Bt est également largement employé dans la lutte contre les espèces de moustiques des genres *Aedes* et *Culex*, notamment le long du littoral méditerranéen (Sanchis,2016).



Chapitre 3

***Fusarium* et la maladie fusariose**



1. Généralités sur le genre *Fusarium*

Fusarium est un vaste genre de champignons saprophytes communs dans le sol, présent partout dans le monde. La plupart des espèces sont inoffensives et assez abondantes au sein de la communauté microbienne du sol. Néanmoins, certaines espèces de *Fusarium* peuvent avoir des répercussions économiques considérables en raison de leurs impacts dévastateurs sur les cultures. Les espèces de *Fusarium* sont des champignons filamenteux cosmopolites, comprenant des pathogènes opportunistes infectant les plantes du monde entier, mais pouvant également se développer en tant que saprophytes dans diverses zones climatiques (Stępień *et al.*, 2019). On distingue près de 40 espèces largement répandues dans la nature. Certaines sont phytopathogènes et capables de produire de dangereuses toxines contaminant les denrées alimentaires et provoquant ainsi des maladies graves chez les animaux (et parfois chez l'homme) qui les consomment (mycotoxicoses) comme *F. graminearum* (Chabasse *et al.*, 2002). Elles sont aussi largement répandues dans le sol, en particulier le sol cultivé, et sont actives dans la décomposition de matières végétales cellulosiques. Elles sont une des principales causes de pourriture des fruits et des légumes et sont généralement associées aux céréales et aux légumineuses, qu'elles envahissent généralement avant la récolte comme *F. oxysporum* et *F. solani* (Pitt *et al.*, 2009).

2. Evolution taxinomique et classification récente

Le genre *Fusarium* a été décrit pour la première fois en 1809 par Link. Au cours des 100 années suivantes, plus de 1000 espèces ont été décrites. Les premiers travaux majeurs dans la classification du genre *Fusarium* ont été entrepris par Wollenweber et Reinking dans les années 1930 et leur publication ; en 1935 ; a été le point de départ des systèmes taxinomiques modernes de *Fusarium*. Dans cette publication, ils ont organisé le genre en 65 espèces avec 55 variétés et 22 formes sous-spécifiques en 16 sections. Entre les années 1940 et 1950, Snyder et Hansen ont réduit le nombre d'espèces à neuf seulement. Leur système a simplifié l'identification mais il a regroupé ensemble de nombreux génotypes de phénotypes très variables. Au cours des décennies suivantes, plusieurs chercheurs ont publié d'autres systèmes taxinomiques soit en apportant des modifications au système de Snyder et Hansen, soit en créant un système hybride entre les deux systèmes précédents ; notamment Gordon, qui a publié une série d'articles sur *Fusarium* spp. Au Canada dans lesquelles il a décrit 26 espèces, en utilisant des concepts de Wollenweber et Reinking et de Snyder et Hansen. Ou Booth qui a

divisé le genre en 44 espèces dans une publication nommée «The Genus Fusarium» ; en 1971 ; en suivant les concepts de Wollenweber et Reinking (Munkvold, 2017).

Tableau 3 : classification de genre Fusarium (O'Donnell *et al.*, 2015).

phylum	<i>Ascomycota</i>
classe	<i>pezizomycotina</i>
ordre	<i>Hypocreales</i>
famille	<i>Nectriaceae</i>
genre	<i>Fusarium</i>

3. Physiologie du Fusarium

Le Fusarium a un développement optimal sur un milieu à base de pomme de terre (PDA), est cela, vu qu'il se nourrit de la matière végétale. Sa croissance minimale est entre 7°C et 12°C, elle devient optimale entre 21°C et 27,5°C, et elle s'arrête à 37°C. Le champignon peut se développer sur une large gamme de pH, et il a une croissance optimale entre pH 6,0 et pH 7,0 ; ainsi que, le glucose et la peptone, représentent les sources de carbone et d'azote les mieux assimilées (Leslie et Summerell, 2006).

4. Pouvoir pathogène et potentiel toxinogène

De nombreuses espèces de *Fusarium* sont saprophytes mais peuvent être des parasites ou des agents pathogènes de plantes en infectant les fruits, légumes, les céréales et les semences telles que *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*...etc (Aoki *et al.*, 2018). Certaines espèces telles que *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* et *F. equiseti* peuvent produire plusieurs types de toxines dont les plus connues sont la zéaralénone, la fumonisine, la moniliformine et les trichothécènes (toxine T-2 / HT-2, déoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, nivalénol) (Gallotti *et al.*, 2018). Ces mycotoxines contaminent préférentiellement les céréales comme le maïs, l'orge, le riz, le blé et l'avoine. La contamination peut survenir avant la récolte lorsque la plante cultivée est en plein croissance ou après la récolte pendant la transformation. Le stockage des céréales à des températures supérieures à 37 ° C augmente l'humidité ce qui favorise la croissance de moisissures et la sécrétion des mycotoxines (Jimenez *et al.*, 2018). Les mycotoxines fusariennes ont un effet toxique chez l'homme et chez

l'animal. Elles peuvent en fait entraîner des anomalies congénitales, des avortements et même des cancers (**Babadoost, 2018**).

5. Espèces de *Fusarium*

Dans les débuts, un brin de confusion régnait au niveau de la taxonomie, avec plus de 1 000 espèces, variétés et races à classer. Au fil du temps, les gens ont commencé comprendre que les *Fusarium* causaient de graves maladies. Il est donc devenu primordial de créer un système de classification précis. Aujourd'hui, les scientifiques ne s'entendent toujours pas totalement concernant la classification de neuf à environ cinquante espèces, de zéro à vingt-neuf variétés et de zéro à douze formes. En raison de la confusion entourant l'identification de nombreuses espèces de *Fusarium*, le système de classification tient aussi compte de la symptomatologie de la plante. Par conséquent, la plupart des espèces ont été divisées en groupes selon le type de maladie qu'elles causent, par exemple le chancre fusarien (*Fusarium stem canker*), la pourriture fusarienne (*Fusarium foot rot*) et la flétrissure fusarienne (*Fusarium wilt*) (**Fouré et al., 2020**).

5.1. Le groupe du chancre fusarien

Correspond à un champignon tellurique causé par six espèces (*F. sulphureum*, *F. graminearum*, *F. lateritium*, *F. sambucinum*, *F. avenaceum* et *F. culmorum*). Le groupe de la pourriture fusarienne des collets/coutrones et racines désigne un champignon tellurique causé principalement par l'espèce *F. solani*. Finalement, le groupe de la flétrissure fusarienne représente un champignon vasculaire causé principalement par un pathogène qui se retrouve dans le xylème appelé *F. oxysporum*. Dans ce groupe, *F. oxysporum* se présente sous diverses formes spécialisées, aka *forma specialis* (f.sp.), qui infectent une variété d'hôtes et causent diverses maladies. *F. oxysporum f.sp. vasinfectum* et *F. oxysporum f.sp. apii* entraînent la fonte des semis et sont tous deux identiques d'un point de vue morphologique; c'est leur hôte qui diffère et dicte ainsi le nom de la sous-espèce. Il y a toutefois un débat continu entourant le système de classification puisque de nombreux scientifiques suggèrent que *F. oxysporum f.sp. apii* relève du même groupe que *f.sp. vasinfectum*. Ainsi, la caractérisation des sous-groupes plus spécifiques est aujourd'hui fondée sur la génétique des champignons plutôt que sur leur interaction hôte-pathogène (**Lapeyre, 2020**).



Figure 7 : la sporulation de *Fusarium* sur la tige d'une plante de cantaloup (Lapeyre, 2020).

5.1.1. *Fusarium solani* (pourriture fusarienne) est un champignon saprophyte, c'est-à-dire qu'il peut coloniser des tissus végétaux morts ou mourants (Fouré *et al.*, 2020). Ce champignon peut envahir les tiges aux nœuds ou à la ligne du sol, et tirer avantage des blessures de la plante. Ses spores germent durant de longues périodes de forte humidité et de hautes températures.

5.1.2. *Fusarium oxysporum* (flétrissure fusarienne) est aussi un champignon saprophyte qui survit dans le sol entre les cycles de culture, dans des débris de plantes infectées. Le champignon peut survivre sous forme de mycélium ou de l'un ou l'autre de ses trois différents types de spores. Les racines peuvent être infectées directement au niveau de l'apex de la racine ou par une blessure. Une fois qu'il s'imisce à l'intérieur du plant, le mycélium croît dans le cortex racinaire jusqu'à ce qu'il atteigne le xylème, pour ensuite se propager dans le tissu vasculaire de la plante. Ce phénomène réduit l'apport en eau et en nutriments : les feuilles fanent et la plante finit par mourir (Fouré *et al.*, 2020).



Figure 8 : Symptômes de la pourriture racinaire causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici* (Fouré *et al.*, 2020).

6. Fusariose et mécanisme d'invasion des plantes.

La fusariose est une maladie causée par les espèces appartenant au genre *Fusarium* qui vivent généralement dans le sol sous forme de mycélium, de périthèces dans les débris infectés et de chlamydospores (qui peuvent persister jusqu'à quatre ans) puis attaquent de nombreuses plantes (**Caron, 1993**). Ces agents pathogènes infectent les plantes via les racines qu'elles pénètrent directement ou par des blessures d'origine mécanique ou biologique. L'infection commence généralement à partir du sol, touche d'abord les racines et/ou le collet, et peut par la suite, remonter jusqu'aux autres organes telles les tiges et les feuilles, ce qui provoque des modifications du métabolisme des cellules hôtes, la destruction des tissus et, éventuellement, le développement de nombreuses maladies. Une fois, l'agent pathogène forme son mycélium sur la plante infectée et libère ses conidies, ces dernières peuvent être transportées par le vent et/ou la pluie jusqu'à atteindre toute la partie de la plante (**Jeunot et al., 2019**). Les conditions optimales pour le développement de la fusariose dépendent des espèces du *Fusarium*, mais souvent une humidité faible et une température autour de 20°C sont des conditions favorables pour l'apparition de la maladie (**Nasraoui, 2008**).

6.1. Dégâts de la fusariose

Les espèces du genre *Fusarium* sont des pathogènes responsables des pertes économiquement importantes chez la majorité des cultures. Ces agents pathogènes peuvent causer la fonte de semis, la pourriture des racines et du collet (**Pauvert, 1984**). Ils attaquent tous les organes végétatifs et reproducteurs des plantes (**Gargouri, 2003**).

- **Fonte de semis**

La fonte de semis est due à des semences contaminées et elle est fréquente dans les régions humides où la maladie de l'épi prédomine (**Gargouri et al., 2001**). Moins fréquemment, cette maladie peut être causée par l'inoculum présent dans le sol ce qui est généralement le cas des régions arides (**Gargouri, 2003**). La maladie peut se traduire par des manques à la levée. En effet, la germination a eu lieu mais les racines meurent au cours de leur développement ou elles sont partiellement nécrosées. La fonte de semis due au *Fusarium* se manifeste tardivement, elle est localisée dans les zones les plus sèches. Parfois, la maladie se traduit par le dessèchement brutal de jeunes plantules qui restent dressées. Dans le cas d'une infection sévère, les racines latérales avortent ou encore sont détruites dans un stade

assez jeune (Mrabet, 1998). La fonte de semis est responsable d'une réduction de rendement qui peut atteindre 17% (Gargouri, 2003).

- **Pourriture des racines**

La pourriture des racines appelée aussi la pourriture commune est une maladie qui apparaît chez les plantes âgées et se manifeste par une infection des parties souterraines. Elle est due à la présence de l'inoculum dans le sol, aux débris végétaux infectés ainsi qu'aux semences contaminées. L'infestation a lieu dans les régions où la pluviométrie est déficiente (Gargouri *et al.*, 2001). La maladie cause la destruction des tissus des racines, du rhizome et de la partie souterraine de la tige. Les symptômes typiques se caractérisent par une coloration brune ou noire. Ce brunissement peut progresser vers le plateau de tallage et très peu vers la tige. Les symptômes peuvent se traduire, mais moins fréquemment que la pourriture du pied, en des épis blancs prématurés (Gargouri, 2003).

- **Pourriture du pied**

La pourriture du pied est une maladie grave des grandes cultures, céréales et plantes fourragères, dans les régions arides et semi-arides pouvant occasionner des pertes élevées du rendement. Les conditions climatiques de la Tunisie par exemple favorisent le développement de cette maladie (sol sec quand les plantes sont jeunes). Cette maladie est due principalement aux champignons présents dans le sol sous forme de chlamydozoospores, de mycélium et débris végétaux infestés enfouis dans la couche superficielle du sol. Les pathogènes pénètrent par le coléoptile, le rhizome ou les racines secondaires (Burgess *et al.*, 1981). L'infection reste latente et ne se développe que si la plante se trouve dans les conditions de stress hydrique pendant ou juste après la floraison (Gargouri, 2003). Lorsque l'attaque du collet est précoce, le champignon peut attaquer les différentes gaines et détruire la jeune plante.



Figure 9: Symptômes de la fusariose vasculaire de la tige de tomate causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Spiga , 2015).

6.2. Dommages et cycle de la fusariose

Les colonies de *Fusarium* sont habituellement pâles ou de couleur vive (selon les espèces) et peuvent présenter un mycélium aérien à l'aspect cotonneux. Leur couleur varie de blanchâtre à jaune, à brunâtre, à rose et à rougeâtre. Les espèces de *Fusarium* produisent habituellement des spores (appelés macro et microconidies) à des fins de reproduction et de propagation. Les symptômes du chancre fusarien commencent avec une lésion de l'épiderme, suivie de chloroses et de nécroses. Habituellement, le tronc, les branches ou les tiges près de la lésion gonflent, créant un chancre qui peut fendre. Les feuilles des tiges affectées fanent et se nécrosent, sans toutefois tomber de la plante. Ce pathogène peut aussi entraîner la fonte des semis. Si l'on se fie à la symptomatologie de l'hôte, il est facile de confondre la pourriture fusarienne avec le chancre fusarien puisqu'ils peuvent tous deux causer des chancres. Toutefois, le chancre fusarien entraîne une décoloration rougeâtre du xylème tandis que la pourriture fusarienne se distingue par des chancres mous, foncés ou noirs, qui entraînent une décoloration brun foncé au niveau de la tige (*Lapeyre, 2020*).



Figure 10 : symptômes de la flétrissure fusarienne (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) sur les racines de plante de haricot secs (*Lapeyre, 2020*).



Chapitre 04 :

Moyens de lutte contre la fusariose



1. Moyens de lutte contre la fusariose

1.1 .Bio-fongicides

Divers champignons et bactéries ayant une activité de lutte biologique connue contre les agents pathogènes fongiques du sol, y compris des isolats de lutte biologique de *Trichoderma harzianum*, *Pythium oligandrum*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* et d'autres ont été utilisés dans cette étude. *T. harzianum* souche T22 (RootShieldDrench, BioWorks Inc. Genève, NY), *T. harzianum* (Biocont-T WP et Biocont-T Gr, National Ammonia & Chemical Industries, Amman), *Bacillus subtilis* souche QST 713 (Serenade, AgraQuest, Davis, CA), *B. pumilus* souche QST 2808 (Sonata, AgraQuest, Davis, CA), *Pythium oligandrum* (Polyversum, Biopreparáty Ltd., République tchèque) et des micro-organismes naturels (Agralan Revive, Agralan Ltd., Swindon, Royaume-Uni) ont été évalués pour leurs effets sur le développement de la maladie causée par le FORL (Klopper *et al.*, 2004).

1.2. *Bacillus thuringiensis* agent de lutte biologique

Ces dernières années, de nombreuses nouvelles fonctions du Bt ont été découvertes pour protéger les plantes contre les infections par des agents pathogènes. Récemment, *B. thuringiensis* a été utilisé comme agent de lutte biologique capable de supprimer les maladies des plantes. Les activités antagonistes de *B. thuringiensis* AS17 japonensis et AS18 kurstaki contre *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici race 2 (FOL) ont été examinées par la technique de double culture. Il a été confirmé que les souches de *B. thuringiensis* peuvent supprimer le développement des symptômes de flétrissement causés par la FOL dans les plants de tomates. De plus, cette étude a prouvé que les souches de *B. thuringiensis* étaient des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) qui favorisaient la croissance des plantes, la germination et l'allongement des pousses (Zetal., 2000).

Il existe six souches de *B. thuringiensis* (AS15 sotto, AS16 israelensis, AS17 japonensis, AS18 kurstaki, AS19 roskildiensis et AS20 CR371-H). Les six souches de *B. thuringiensis* pourraient supprimer la croissance de la FOL et le développement des symptômes de flétrissement dans les plants de tomates. En traitant les racines de tomates avec une suspension de *B. thuringiensis*, la maladie du flétrissement causée par la FOL a été supprimée de manière significative. Mais l'activité suppressive pourrait ne pas être causée par la compétition pour l'espace, les nutriments et les niches écologiques entre *B. thuringiensis* et FOL. *B. thuringiensis* produit généralement plusieurs composés, tels que des substances

antimicrobiennes qui comprennent des b-exotoxines, des antibiotiques, des enzymes dégradantes, des bactériocines et une molécule signal dans le système de détection du quorum bactérien (**Cherif *et al.*, 2003 ; Dong *et al.*, 2002**).

Pour mieux comprendre le mécanisme de la résistance induite par *B. thuringiensis* à *Fusarium oxysporum*, il sera important d'identifier les substances spécifiques présentes dans la FC qui peuvent induire une résistance à *Fusarium oxysporum* chez la tomate. Il est intéressant de noter que les composés volatils et les lipopeptides produits par *Bacillus* spp. ont été identifiés comme éliciteurs dans l'ISR (**Ryu *et al.* 2004**). Par conséquent, la caractérisation des substances capables d'induire une résistance aux maladies fournira de nouvelles informations pour une évaluation plus approfondie de l'aspect pratique de *B.thuringiensis* en tant qu'agent de lutte biologique efficace.



Conclusion



Conclusion :

Depuis longtemps *Bacillus thuringiensis* s'est affirmé comme étant un microorganisme d'intérêt pour la lutte microbiologique contre les ravageurs, du fait de la facilité de sa production et de sa spécificité, entre autres. L'apport des biotechnologies ouvre des voies jusqu' alors inaccessibles et laisse entrevoir de nouvelles utilisations, comme celle de pouvoir traiter des ravageurs qui ne pourraient pas être maîtrisés par des pulvérisations, insecticides classiques.

Il faut cependant surveiller l'apparition de populations d'insectes résistants à *Bacillus thuringiensis*, et envisager de contrarier cette éventuelle résistance par l'utilisation de produits divers. Cependant toutes les potentialités de cette bactérie ne sont sans doute pas encore connues et de nombreux chercheurs, dans le monde, s'emploient soit à découvrir de nouvelles activités contre différents invertébrés soit encore à améliorer les souches déjà utilisées. De ce fait, *B. thuringiensis* présente de réelles perspectives de développement.



Référence bibliographique



Référence bibliographique

Site web: (<https://www.anses.fr/fr/system/files/DPR2013sa0039.pdf>)

1. **Agrawal, N., P. Malhotra, and R.K. Bhatnagar, (2002).** "Interaction of genecloned and insect cellexpressed aminopeptidase N of Spodoptera litura with insecticidal crystal protein Cry1C." *Appl Environ Microbiol* 68(9): 4583-92
2. **Akman L, Yamashita A, Watanabe H et al (2002)** Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat Genet* 32:402–407
3. **Anand AAP, Vennison SJ, et al.** Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J Insect Sci.* 2010; 10:107.
4. **Aptosoglou, S. G., A. Sivropoulou, and S.I. Koliais, (1997).** "Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* strains and isolates." *Microbios* 91(368-369): 203-14.
5. **Augustyniuk-Kram A, Kram KJ.** Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). In: *Forest Ecosystems – More than Just Trees*. Ed. Juan A. Blanco. 2012. p265–294.
6. **Barke J, Seipke RF, et al.** A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol.* 2010; 8:109.
7. **Baumann P, Clark MA, Baumann L, Broadwell AH (1991)** *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiol Rev* 55:425–436
8. **Bechtel DB, B. L. (1982).** "Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation." *J Ultrastruct Res* 79: 121-32.
9. **Becker N. 2000.** Bacterial control of vector-mosquitos and black flies. See Ref. 20a, pp. 383–98
10. **Beegle CC, Yamamoto T. 1992.** History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.*124:587–616
11. **Beegle, C. C., T. Yamamoto, (1992).** "History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research an development." *Can Ent* 124: 587-616.
12. **Brousseau, R., A. Saint-ange, et al. (1993).** "Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains." *Applied and environmental microbiology* 59(1): 114-119.

13. **Brune A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. Nature. 2014;**
12:168–180.
14. **Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, et al. (1980).** "Ultrastructure, physiology, and
biochemistry of *Bacillus thuringiensis*." *Critical reviews in microbiology* 8(2): 147-
204.
15. **Burkhead KD, Schisler DA, Slininger PJ (1994)** Pyrrolnitrin production by
biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized
wounds of potatoes. *Appl Environ Microbiol* 60:2031–2039
16. **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.
17. **Chen, M. L. and H. Y. Tsen (2002).** "Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus*
thuringiensis with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of
their annealing sites." *Journal of applied microbiology* 92(5): 912-919.
18. **Davidson EW, Singer S, Briggs JD (1975)** Pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain
SSII-1 infections in *Culex pipiens quinquefasciatus* (¼ *C. pipiens fatigans*) larvae. *J*
Invertebr Pathol 25(2):179–184
19. **de Barjac, H. and A. Bonnefoi (1967).** "[Classification of strains of *Bacillus*
thuringiensis]." *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des*
sciences. Serie D: Sciences naturelles 264(14): 1811-1813.
20. **de Maagd RA, Bosch D, Stiekema WJ.1999.** *Bacillus thuringiensis* toxin mediated
insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4:9–13
21. **Engel P, Moran NA.** The gut microbiota of insects – diversity in structure and
function. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37:699–735.
22. **Evans JD, Aronstein K, Chen YP et al (2006)** Immune pathways and defence
mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15:645–656
23. **Feitelson JS, Payne J, Kim L. 1992.** *Bacillus thuringiensis*: insects and
beyond. *Bio/Technology* 10:271–75
24. **Ford, C. H., V. J. Richardson, et al. (1989).** "Comparison of tetrazolium colorimetric
and [3H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing." *Cancer chemotherapy*
and pharmacology 24(5): 295-301.
25. **Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E (1997)** *Xenorhabdus* and
Photorhabdus spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol* 51:47–72

26. **Fuxa JR, Tanada Y. Epizootiology of insect diseases.** Wiley-Interscience. 1987. 576p.
27. **Gaviria Rivera, A. M. and F. G. Priest (2003).** "Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR" *Systematic and applied microbiology* 26(2): 254-261.
28. **Glare, T. R, O'Callaghan, M. (2000)** "*Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety" Chichester; New York: John Wiley, U.S.A., pp. 2-80
29. **Goldberg, L. J. and J. Margalit (1977).** "Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles-Sergentii*, *Uranotaenia-Unguiculata*, *CulexUnivitattus*, *Aedes-Aegypti* and *Culex-Pipiens*." *Mosquito News* 37(3): 355-361.
30. **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.
31. **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.
32. **Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, et al. 2000.** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2627–30
33. **Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P et al (2002)** Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* 296:733–735
34. **Hurst MRH, Beard SS, Jackson TA, Jones SM (2007)** Isolation and characterization of the *Serratia entomophila* antifeeding prophage. *FEMS Microbiol Lett* 270:42–48
35. **Ishiwata, S. (1901).** "On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1)." *Rep Sericult Assoc Jpn*, 114: 1-5.
36. **Janisiewicz WJ, Roitman J (1988)** Biological control of blue mold and gray Mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78:1697
37. **Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE et al (2004)** Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J Infect Dis* 190:783–792
38. **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.

39. **Kellner RL, Dettner K.** Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia*. 1996; 107:293–300.
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.
41. **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.
42. **Lecadet, M. M., E. Frachon, et al. (1999).** "Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*." *Journal of applied microbiology* 86(4): 660-672.
43. **Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006).** *The Fusarium Laboratory Manual*. In *The Fusarium Laboratory Manual*. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
44. **Marshall SDG, Hares MC, Jones SA et al (2012)** Histopathological effects of the Yen-Tc toxin complex from *Yersinia entomophaga* MH96 (Enterobacteriaceae) on the *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larval midgut. *Appl Environ Microbiol* 78:4835–4847
45. **Martin PAW, Gundersen-Rindal D, Blackburn M, Buyer J (2007)** *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:993–999
46. **Miyoshi S, Shinoda S (2000)** Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2:91–98
47. **Morris ON (1972)** Susceptibility of some forest insects to mixtures of commercial *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides, and sensitivity of the pathogen to the insecticides. *Can Entomol* 104:1419–1425
48. **Munson MA, Baumann P, Kinsey MG (1991)** *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte associated, primary endosymbionts of aphids. *Int J Syst Bacteriol* 41:566–568
49. **Musser FR, Nyrop JP, Shelton AM (2009)** Integrating biological and chemical controls in decision making: European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) control in sweet corn as an example. *J Econ Entomol* 99:1538–1549
50. **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.

51. **Nirma C, Eparvier V, et al.** Antibacterial ilicicolinic acids C and D and ilicicolinal from *Neonectria discophora* SNBCN63 isolated from a termite nest. *J Nat Prod.* 2015; 78:159–162.
52. **Nirma C, Eparvier V, et al.** Antifungal agents from *Pseudallescheria boydii* SNB-CN73 isolated from a *Nasutitermes* sp. termite. *J Nat Prod.* 2013; 76:988-991.
53. **Paroles d'experts** - Jardins de France 639 - Janvier-février 2016
54. **Paroles d'experts** - Jardins de France 639 - Janvier-février 2016
55. **Piel J.** A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99:14002–14007.
56. **Pigott CR, Ellar DJ (2007)** Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:255–281
57. **Priest FG. 2000.** Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria. See Ref. 20a, pp. 1–16
58. **Rai, A. R., S. U. Meshram, et al. (2009).** "Optimization of RAPD-PCR for discrimination of different strains of *Bacillus thuringiensis*." *Romanian Biotechnological Letters* 14(2): 4308-4313.
59. **Rasko, D. A., M. R. Altherr, et al. (2005).** "Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms." *FEMS microbiology reviews* 29(2): 303-329
60. **Rathod NP, Vala GS, Dudhat AS, Kachhadiya NM (2014)** Field efficacy of bio-pesticides alone and in combination with newer insecticides against *Helicoverpa armigera* of pigeonpea. *Int J Plant Prot* 7:128–131
61. **Seipke RF, Barke J, et al.** A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One.* 2011; 6:e22028.
62. **Seleena P, Lee HL, Chiang YF (1999)** Compatibility of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis and chemical insecticides for the control of *Aedes* mosquitoes. *J Vector Ecol* 24:216–223.
63. **Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M et al (2000)** Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature* 407:81–86
64. **Sorres J, Nirma C, et al.** Tyroscherin and tyroscherin analogs from *Pseudallescheria boydii* SNB-CN85 isolated from termite *Termes* cf. *hispaniolae*. *Phytochem Lett.* 2017, 22:142–144.

65. **Toh H, Toh H, Weiss BL et al (2006)** Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res* 16:149–156
66. **Tourasse, N. I. E. Helgason, et al. (2011)**. "Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data." *Food microbiology* 28(2): 236-244.
67. **Valero, M., L. A. Hernandez-Herrero, et al. (2002)**. "Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests." *Food microbiology* 19(5): 491-499.
68. **Vallet-Gely I, Lemaitre B, Bocard F (2008)** Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol* 6:302–313.
69. **Vega FE, Meyling NV, et al.** Fungal entomopathogens. In: *Insect Pathology*. Ed. Fernando E. Vega and Harry K. Kaya. 2012. p171–220
70. **Vodovar N, Vinals M, Liehl P et al (2005)** *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11414–11419
71. **Waterfield NR, Bowen DJ, Fetherston JD et al (2001)** The *tc* genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends Microbiol* 9:185–191
72. **Wong LJ, H'ng PS, et al.** Termite digestome as a potential source of symbiotic microbiota for lignocelluloses degradation: a review. *Pak J Bio Sci.* 2014; 17:956–963.
73. **Zhang CX, Yang SY, Xu MX et al (2009)** *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis chongmingensis* (Rhabditida:Rhabditidae). *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1603–1608
74. **Zhang J, Hodgman TC, Krieger L et al (1997)** Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J Bacteriol* 179:4336–4341