



UNIVERSITE DE TUNIS EL MANAR  
FACULTE DES SCIENCES DE TUNIS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



**MEMOIRE DE MASTERE DE BIOCHIMIE ET DE  
TECHNOBIOLOGIE**

Présenté par :

***M<sup>lle</sup> Nihed MAJDOUB***

Intitulé :

**Isolement et identification des souches de  
*Bacillus thuringiensis* à activité bio-insecticide  
contre *Ceratitis capitata***

Soutenu le 15 décembre 2010 devant le jury composé de :

Président : Mr. Aly RAIES

Membres : Mr. M'hamed EL CAFSI

Mr. Omrane BELHADJ

Année universitaire 2009-2010

---

Travail réalisé au Laboratoire de Biochimie et de Technobiologie à la Faculté des Sciences de  
Tunis, sous la direction du Pr. Omrane BELHADJ

# DEDICACES

## *A mon très cher père Mohamed*

*Tu m'as toujours appris le sens de la responsabilité, de la raison, du devoir et de la confiance en soi.*

*Aucune dédicace ne peut exprimer mon profond amour, ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance pour les sacrifices que tu as consentis.*

*Je te dois beaucoup et je ferais de mon mieux pour rester un sujet de fierté à tes yeux.*

## *A ma chère Mère Najoua*

*Pour tous les sacrifices que tu as consentis à mon égard et dont je suis à jamais redevable, pour ton grand amour, ta tendresse et tes encouragements.*

*Sans ton aide, ce travail n'aurait jamais vu le jour.*

*Je t'aime et ce mémoire ne peut jamais exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi.*

*Que Dieu te garde et t'accorde longue vie et bonheur.*

## *A mon cher frère Jihed ainsi que sa femme Ines*

*A ma petite sœur Loua*

*A notre petit ange Molka*

*A tous mes amis*

*Je dédie ce mémoire.*

# REMERCIEMENTS

**J**e tiens à remercier Monsieur Le Professeur Omrane BELHADJ, pour son encadrement, sa patience, son assistance et ses judicieux conseils durant la réalisation de ce travail. Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de m'accueillir dans votre laboratoire et dirigé ce travail de recherche. Vos qualités scientifiques et votre rigueur m'ont profondément marqué.

**M**es remerciements s'adressent également à monsieur Aly RAIES pour l'intérêt qu'il a accordé à ce travail en acceptant de le juger et de présider le jury.

**J**e remercie Monsieur M'hamed EL CAFSI. Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici, le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**J**e tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail :

**M**es remerciements les plus vifs vont également à Mr Yassine MABROUK pour ses conseils, sa disponibilité et ses encouragements. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma gratitude et de mon grand respect.

**Je** tiens à remercier tous les membres du laboratoire de biochimie et de Technobiologie qui ont participé à la réalisation de ce travail dans une ambiance de fraternité et d'amitié.

**Je** remercie sincèrement les membres du laboratoire de radio pharmaceutique et les membres du laboratoire des mouches stériles au sein du Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires à Sidi Thabit, pour votre gentillesse, votre patience et votre aide quotidienne tout au long de la réalisation de ce travail.

**Que** ce dernier soit un modeste témoignage de ma gratitude et de mon respect.

**A** tous ceux que j'ai omis par simple oubli

**Merci** pour votre aide.

## **Introduction générale**

## **Introduction générale**

L'agriculture actuelle doit faire face à de nombreux ravageurs de plus en plus résistants aux traitements « ordinaires ». De plus, les insecticides synthétiques ont montré des effets néfastes pour la santé publique et l'environnement expliquant leur retrait progressif du marché. D'où la nécessité de parvenir à une protection à la fois efficace, d'un coût raisonnable, respectueuse de l'environnement et réalisable d'un point de vue socio-économique. Pour cela l'utilisation de microorganismes contre les insectes ennemis des cultures, est une méthode alternative à la lutte chimique à développer. Dans ce cas les bio-insecticides sont des insecticides préparés à partir de microorganismes vivants. Les bio-insecticides sont très spécifiques, chacun n'est actif que contre un nombre limitée d'espèces. Ils respectent donc les autres espèces de l'écosystème et notamment la faune dite auxiliaires, qui participe au contrôle des populations de ravageurs.

En Tunisie, l'évaluation économique des dégâts dus à la Cératite (Driouchi, 1990) indique que les pertes s'élèvent annuellement à l'équivalent de quatre millions de Dollars américains. Et c'est pendant la période d'été que l'on enregistre le maximum de dégâts. Parmi les fruits hôtes, les agrumes sont les plus touchées concernant 38% des pertes annuelles directes pour l'économie Tunisienne. Il existe diverses méthodes pour lutter contre la cératite, notamment l'emploi d'insecticides chimiques, l'épandage d'appâts empoisonnés et la technique du lâcher de mâles stérilisés. En outre, la lutte biologique est le meilleur moyen d'éviter un recours excessif aux insecticides dont l'utilisation à grande échelle serait néfaste tant pour la santé humaine que pour l'environnement.

*Bacillus Thuringiensis* est une bactérie qui fait naturellement partie de la flore du sol possédant la capacité de tuer des insectes. Cet effet entomopathogène est dû aux cristaux protéiques que la bactérie synthétise. Elle produit des spores, ingérées par l'insecte, ces cristaux libèrent des toxines qui détruisent les cellules de son tube digestif. Provoquant rapidement un arrêt de sa consommation alimentaire puis sa mort.

L'objectif de ce projet est d'isoler des nouvelles souches de *B. thuringiensis* présentant une activité bio-insecticide contre des cératites capitata.

## **Etude bibliographique**



## **1. Les insectes ravageurs *Ceratitis capitata***

*Ceratitis capitata*, wiedmann; est une espèce qui a été décrite sous plusieurs noms depuis le début du XIX<sup>ème</sup> siècle. Elle a porté le nom de *Trypeta capitata* en 1824 par wiedmann, *Petalophora cap itata* Macepi en 1825, *Trypeta citriperda* Mac leay en 1829; *Trypeta hispanica* de Brème en 1842; puis *Ceratitis flexuosa* walk en 1856; et *Pardalaspis asparagi* Bezzi en 1942. D'après Balachowsky et Mesnil (1935), le nom qui a été retenu est *Ceratitis capitata* wiedmann 1829. Dans le langage commun, l'espèce se nomme Cératite ou encore mouche méditerranéenne des fruits, "med fruit fly" pour les anglo-saxons. C'est un Diptère qui appartient au groupe des Schizophora, à la famille des Tephritidae et à la tribu des Ceratitidini (White and Elson-Harris, 1992).

### **1.1. Cycle de développement de la cératite**

Le cycle de développement de la cératite comporte deux phases essentielles la première est constituée par la ponte et l'incubation des œufs et le développement larvaire constitue la deuxième phase (Figure 1).

#### ***1.1.1. Ponte et incubation***

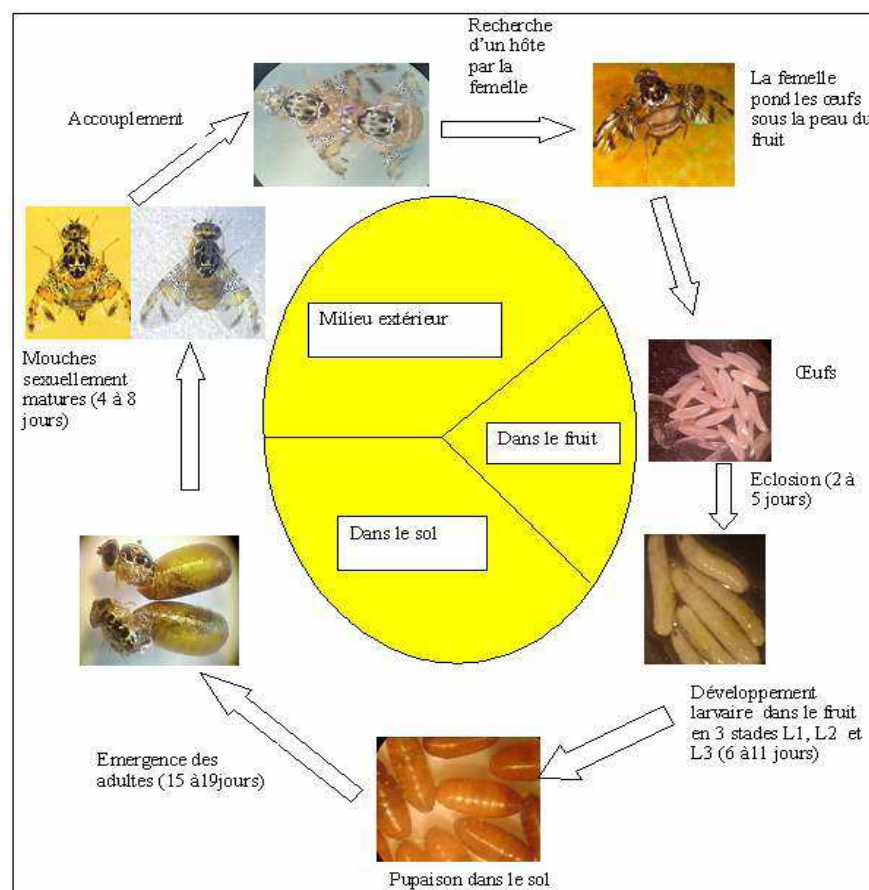
Les femelles font pénétrer leur ovipositeur jusqu'à une profondeur d'approximativement deux millimètres. Elles déposent entre 5 et 10 œufs par fruit. De plus, elles sont capables d'effectuer plusieurs pontes jusqu'à ce que le nombre total d'œufs pondus atteigne 300 à 400 œufs. Le trou de ponte est facile à remarquer sur quelques fruits (agrumes et abricots) (Praloron, 1971). L'incubation des œufs est de 2 à 5 jours en été et plus de 20 jours en hiver (Delassus *et al.* 1931).

#### ***1.1.2. Développement larvaire***

La durée du développement larvaire, qui comprend trois stades (L1, L2 et L3), peut varier fortement pour une espèce donnée en fonction du fruit de l'hôte (Carey, 1984; Zucoloto, 1993). La larve de troisième stade « asticot » quitte le

fruit par une brusque détente. Elle retombe sur le sol dans lequel elle s'enfonce pour se nymphoser, donnant alors une puppe. Cette transformation ne dure que 3 à 4 heures (Chrystenson and Foote 1960). De cette puppe émerge un adulte qui recommence le cycle à nouveau.

Les males de cette espèce se rassemblent en groupes sur les plantes, ou ils émettent, ensemble, une phéromone sexuelle attirant les femelles. Après l'accouplement débute la ponte qui est fortement influencée par l'intensité lumineuse (Quilici, 1999). D'après Delrio (1985) la durée du cycle de développement de la cératite dans la zone méditerranéenne, varie de 20 jours en été et à 2 ou 3 mois en hiver.



**Figure 1 : Cycle de développement de *C. capitata***

## **1.2. Les plantes hôtes et les dégâts de la Cératite**

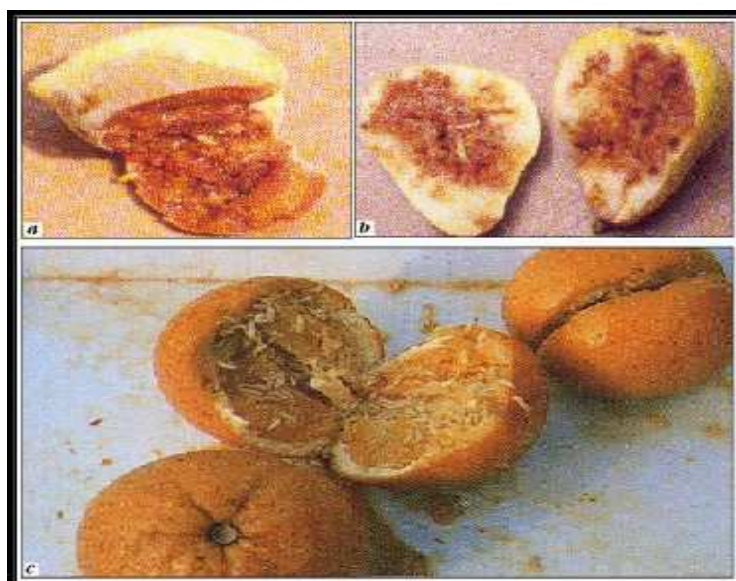
La Cératite est connue par sa large gamme d'hôtes, elle est connue comme un ravageur polyphage, le plus dangereux des régions tropicales et subtropicales. A partir de son aire d'origine, l'Afrique de l'Ouest; elle a pu s'adapter et coloniser plusieurs régions tels que le bassin méditerranéen, l'Amérique centrale et du sud et l'Australie de l'ouest, s'attaquant à 353 plantes hôtes (Liquidó *et al.* 1991).

La Cératite affecte des intérêts économiques dans plusieurs pays à travers le monde. Ainsi par son infestation de plusieurs variétés de fruits, elle cause une réduction considérable dans la production et la qualité des récoltes. Et si on ajoute les dépenses de montants substantiels d'argent sur les méthodes de contrôle de la mouche des fruits, et sur les traitements de la récolte lorsque le fruit est destiné à l'exportation, ces pertes peuvent s'élever à des millions de dollars américains. La mouche méditerranéenne des fruits est l'un des principaux obstacles à la production de fruits sains et à leur exportation (Oukil *et al.* 2002). Elle affecte le secteur agricole à partir des dommages résultants des attaques occasionnées aux cultures fruitières

Pour la Tunisie, Cheikh *et al.* (1975), indiquent que la Cératite s'attaque à tous les fruits d'hiver et d'été, particulièrement le Bigaradier, l'Oranger, le Mandarinier, le Clémentinier, l'Abricotier, le Néflier du Japon, le Pêcher, le Prunier, le Figuier, le Pommier, le Poirier et la Figue de Barbarie (Figure 2 et 3). Sans oublier les espèces sauvages considérées comme hôtes secondaires (Soria, 1962b).



**Figure 2 : Piqûres de la Cératite sur des citrus Citron (a) et Orange (b).**



**Figure 3 : Fruits infestés par la Cératite Pêche (a) ; Poire (b) ; Orange(c).**

### **1.3. Méthodes de lutte**

Pour limiter les dégâts occasionnés par ce ravageur, notamment sur les agrumes, plusieurs procédés de lutte ont été développés principalement, la lutte chimique (insecticide de contact), qui est parfois appliquée avec un attractif alimentaire de type hydrolisat de protéines. Ce système de lutte est souvent peu

efficace, il peut induire des résistances et s'avère polluant si les fréquences de traitement sont trop élevées. De plus, sa gestion est difficile car les seuils de populations pour le déclenchement des traitements restent à définir.

Actuellement des recherches approfondies ont été effectuées, en vue de substituer aux insecticides, d'autres moyens tels que la lutte biologique et la lutte en utilisant des techniques d'annihilation des mâles et des lâchers d'insectes stériles. L'annihilation des mâles utilise l'attraction des mâles par les leurres chimiques et cette technique a été utilisée à Hawaii où elle a eu un certain impact sur les effectifs des populations (Cunningham, 1989c). La technique des insectes stérilisés aux rayons gamma implique un lâcher de millions de mouches stériles parmi la population sauvage, afin qu'il y ait une forte probabilité d'accouplement entre femelles sauvages et mâles stériles (Gilmore, 1989). Cette technique a été utilisée contre *C. capitata* au Costa Rica, en Espagne, aux Etats-Unis (California, Hawaii), en Italie, au Mexique, au Nicaragua, au Pérou, et en Tunisie (Gilmore, 1989). Le plus ambitieux de ces programmes est en cours dans le sud du Mexique (Programa Mosamed), il est destiné à arrêter la dissémination de la mouche vers le nord et son but ultime est l'éradication du ravageur de l'Amérique Centrale (Schwarz *et al.* 1989). Cette technique dépend de la capacité à produire en masse des millions de mouches. Les inconvénients de ces deux méthodes sont qu'elles sont coûteuses et nécessitent de grands moyens. D'où la nécessité de parvenir à une protection à la fois efficace, d'un coût raisonnable, respectueuse de l'environnement et réalisable d'un point de vue socio-économique.

L'évolution que connaît l'Europe dans le cadre de la lutte biologique contre les entomophages nuisibles, nous incite à la recherche d'une méthode de lutte spécifique pour l'établissement de zones exemptes de la mouche méditerranéenne de fruits. La lutte microbiologique de la cératite par les toxines

produites par *Bacillus thuringiensis* (Bt) constituerait une méthode de lutte biologique alternative qui respecte l'environnement (Aboussaid *et al.* 2009).

Des exemples de produits incorporant delta-endotoxines de *B. thuringiensis* (Annexe 3).

## **2. La Bactérie *Bacillus thuringiensis***

Le nom *Bacillus thuringiensis* a été introduit en 1911 par le biologiste allemand E. Berliner, pour désigner la bactérie pathogène trouvée dans les pupes d'insectes familiers des silos à graine en Thuringe (Schnepf *et al.* 1998; Young *et al.* 1998). Depuis plus de 40 ans, elle est utilisée comme insecticide biologique et représente de nos jours plus de 90% du marché total des biopesticides (Vassal, 2004).

### **2.1. Description**

*B. thuringiensis* est une bactérie Gram positive, aérobie facultative, sporulante, ayant des propriétés de résistance à la chaleur et à la déshydratation. Ceci lui confère un caractère ubiquiste dans des environnements naturels et une répartition cosmopolite; Il est aisément isolé du sol, d'eau, de feuillage des végétaux, des arbres conifères, des herbes et des habitats d'insectes (Ben-Dov *et al.* 1997; Benhard *et al.* 1997; Bobrowski *et al.* 2002 ; Damgaard *et al.* 1997; Ichimatsu *et al.* 2000; Uribe *et al.* 2003; Vilas-Bôas and Lemos 2004; Frederiksen *et al.* 2006). Des études biochimiques comparant l'arsenal enzymatique de *Bacillus subtilis*, bactérie modèle du sol, avec *B.thuringiensis* ont montré que celui-ci était différent entre les deux bactéries (Helgason *et al.* 2000).

A l'état végétatif, *B. thuringiensis* à la forme d'un bâtonnet de 5µm de long sur 1µm de large, elle est pourvue de courts flagelles ciliés (Sara Hernandez *et*

al. 2004). Elle se distingue de *Bacillus cereus* et de *Bacillus anthracis*, par sa capacité de produire, au cours de la sporulation, des inclusions cristallines parasporales (Figure 4) dotées de pouvoir entomopathogène (Schnepf *et al.* 1998). En fait, la particularité de Bt par rapport aux autres membres du groupe est qu'elle est capable de synthétiser, lors de la phase sporulante, une inclusion cristalline présentant des propriétés entomopathogènes (Andrews *et al.* 1987). Cette inclusion est composée d'une ou plusieurs toxines de nature protéique appelées Cry (pour crystal) ou Cyt (pour cytotoxique) selon leurs effets. Ces toxines sont également appelées delta endotoxines par opposition à d'autres toxines sécrétées durant la phase végétative.

## **2.2. Cycle de croissance**

Au cours de leur croissance, les bactéries de *B. thuringiensis* sont présentes sous deux formes. La première est la forme végétative, elle est observée lorsque les conditions environnementales sont favorables à la multiplication des bacilles. Lorsque les conditions environnementales sont défavorables (carences nutritionnelles), la bactérie entame le processus de sporulation qui aboutit à la forme « dormante » résistante, la spore. Les spores constituent une forme de résistance particulière capable de survivre à la chaleur, à la dessiccation et à de nombreux agents chimiques elles représentent par conséquent un moyen de dissémination très efficace (Höfte et Whiteley 1989).

Lorsque la spore, corpuscule équivalent à la graine d'une plante permettant la survie de la bactérie lors de conditions défavorables, se retrouve dans un milieu de croissance approprié, elle se réhydrate et germe pour donner naissance à une cellule végétative en forme de bâtonnet qui constitue la phase active ou de multiplication du cycle vital. Au cours de cette période de division et de croissance, les bactéries sécrètent des enzymes qui dégradent des sources

nutritives favorisant ainsi leur absorption à partir du milieu. Après cette phase, les bactéries peuvent se mettre à sporuler. Certaines produiront alors une cellule déshydratée et encapsulée contenant une copie du matériel génétique de la bactérie, la spore, qui ne croît plus et qui sera capable de résister aux diverses conditions extrêmes du milieu. Au cours de cette phase, une inclusion cristalline composée de plusieurs protéines de différents poids moléculaires est conjointement formée, et vers la fin de chaque cycle (germination-développement-sporulation), la spore et le cristal sont libérés dans le milieu lors de l'autodestruction de la cellule végétative (Höfte et Whiteley 1989). Après une période de dormance, une partie de ces spores peuvent alors redémarrer le cycle si les conditions environnementales sont favorables (Höfte et Whiteley 1989) (Figure 4).

Diverses études indiquent qu'en nature le *B. thuringiensis* persiste dans le sol surtout sous forme de spores et ne démontre que très peu de multiplication des cellules végétatives (West *et al.* 1985; Akiba 1986). Les cellules végétatives ne peuvent se développer dans un environnement à pH élevé mais que cet environnement alcalin est cependant indispensable à l'activation des toxines. Chez les organismes affectés, la paralysie, les changements biochimiques (comme la baisse du pH vers la neutralité; *i.e.* pH =7) et la perforation de la paroi intestinale, permettent donc à la spore de se retrouver dans un milieu riche en éléments nutritifs où la germination, la croissance et la multiplication peuvent prendre place. Sans cette structure cristalline, le *B. thuringiensis* serait donc incapable de coloniser le tractus digestif d'un insecte en santé et de se reproduire aisément (Meadows, 1993).



## **2.3. Toxines de Bt**

### ***2.3.1. Classification des delta-endotoxines de B thuringiensis***

*B. thuringiensis* est unique dans sa capacité de produire des inclusions cristallines pendant sa sporulation. Pendant une longue période de temps, ces inclusions cristallines ont causé la grande controverse dans la classification des bactéries différentes. Heimpel et Angus (1958) ont conclu que des essais précédentes pour la taxonomie des bactéries, formantes des cristaux, présentaient une confusion; ainsi ils ont proposé une classification basée sur des ressemblances avec le groupe de *B cereus* en fournissant une nouvelle désignation d'espèce pour le Bt. Leurs critères ont été basés sur des caractéristiques biochimiques et morphologiques traditionnels.

Un an plus tard, Toumanoff et Corroller (1959) ont proposé un plan dans lequel le groupe de nature cristallope a été différencié en se basant sur l'hôte de qui l'organisme a été isolé. En fait, Ils ont reconnu des caractéristiques différentes selon l'hôte et ont suggéré que *B. thuringiensis* reste dans le Groupe *B cereus*. Heimpel (1967) a présenté une autre statue taxonomique proposant une distinction de variété basée sur la toxicité. Une classification en sérotypes, proposée par de Barjac et Bonnefoi (1968) et de Barjac *et al.* (1988) fondée sur la composition des antigènes flagellaires ou antigènes H.

Jusqu'à maintenant 84 sous-espèces appartenant à 71 H-sérotypes ont été isolés et identifiés (khyami-Horani *et al.* 2003; Lecadet *et al.* 1999). Bien que les sérotypes reflètent seulement une caractéristique de l'espèce, c'est la méthode de classification la plus utilisée dans le monde entier (Roh *et al.* 2007). Cependant, les sérotypes flagellaires ont des limitations prouvant des incertitudes pour la prédiction des activités insecticides, bien que la technique ait énormément aidé la classification des isolats (Roh *et al.* 2007).

Comme exemple, le sérotype *B. thuringiensis* sous-espèce *morrisoni* (H8a8b) inclut des isolats actifs contre les lépidoptères, les coléoptères et des insectes diptères et même inclut des isolats qui ne sont pas actifs (Park *et al.* 1998). En outre, le spectre d'activité de H-antisera a été augmenté contre 27 serovars et plusieurs nouvelles souches ont été isolées ayant des gènes Cry innés que l'on n'a pas connus précédemment de la même serotype de souche (Lee *et al.* 2001; Li *et al.* 2002).

Ces résultats ont aussi démontré que le H-serotypage ne pourrait pas être assez pour représenter les caractéristiques moléculaires des souches (Lee *et al.* 2001).

Le *B. thuringiensis* produit un corps d'inclusion parasporal de nature cristalline durant la sporulation. Ce cristal est constitué de protéines. Un grand nombre de protéines cristallisées apparentées ont été identifiées, et un cristal peut renfermer plusieurs types de protéines. Pour dénouer une situation aussi confuse, Höfte et Whiteley (1989) ont proposé un système de classification des protéines cristallisées et des gènes codant leur synthèse. Cette classification repose sur la structure des protéines cristallisées et sur la gamme d'hôtes, (Schnepf *et al.* 1998). Plus de 14 gènes codant la synthèse de protéines cristallisées distinctes ont été décrits, et d'autres protéines présentant des propriétés insecticides ont été identifiées récemment (Lereclus *et al.* 1993).

Les gènes codent pour la synthèse d'une famille de protéines apparentées présentant des propriétés insecticides (Cry) et sont répartis dans quatre grandes classes, selon que la spécificité des protéines s'exprime à des Lépidoptères, des Lépidoptères et des Diptères, des Coléoptères ou des Diptères seulement, (Höfte et Whiteley 1989). Les delta-endotoxines de *B. thuringiensis* encore appelées Cry (venant de cristal) ont été classifiées selon leurs spécificités insecticides en quatre groupes par Höfte et Whiteley (1989)

- CryI, ce sont des toxines spécifiques aux Lépidoptères; les cristaux ont une forme bipyramidale (Bernhard *et al.* 1997).
- CryII, les toxines sont spécifiques aux Lépidoptères et aux Diptères; les cristaux ont une forme cubique (Armengol *et al.* 2007).
- CryIII, spécifiques aux Coléoptères, les cristaux sont rhomboédriques
- CryIV, les toxines ont pour cibles les Diptères et les cristaux ont une forme sphérique

Deux autres groupes ont été ajoutés pour les toxines actives contre les Nématodes (Feitelson *et al.* 1992)

- CryV et Cry VI les cristaux ont une forme bipyramidale. Chaque classe est divisée en un certain nombre de sous-classes possédant des propriétés insecticides et structurales propres. Crickmore *et al.* (1998) ont révisé la nomenclature des delta-endotoxines en prenant en compte, en plus de leur spécificité, l'homologie des séquences en acides aminés des protéines donc un nouveau système de classification fondé uniquement sur l'identité des acides aminés a été proposé. Cette nouvelle classification permet de regrouper les toxines étroitement apparentées et élimine la nécessité de soumettre chaque nouvelle toxine à des essais biologiques contre une série sans cesse croissante d'organismes.

Ce système a fourni une structure utile pour classier les genes. Cependant, les incohérences ont existé dans le plan original en raison des essais pour classier les gènes qui étaient fortement homologues aux genes connus, mais n'ont pas codé la toxine avec le même spectre insecticidal.

Pour contourner ces problèmes, Crickmore a proposé une nomenclature pour les genes Cry et les genes Cyt de Bt qui sont deux familles non partageantes des similaires séquences significatives (Guerchicoff *et al.* 2001).

Une protéine Cry est une inclusion parasporale protéinique de *B thuringiensis* qui provoque expérimentalement des toxicités sur les organismes cibles ou n'importe quelle protéine qui a la similitude avec une protéine cry connue. De même une protéine Cyt est une inclusion parasporale protéinique qui provoque une activité hemolytique, ou n'importe quelle protéine qui a la similitude avec une protéine Cyt connue, (Gill and Hornung 1987).

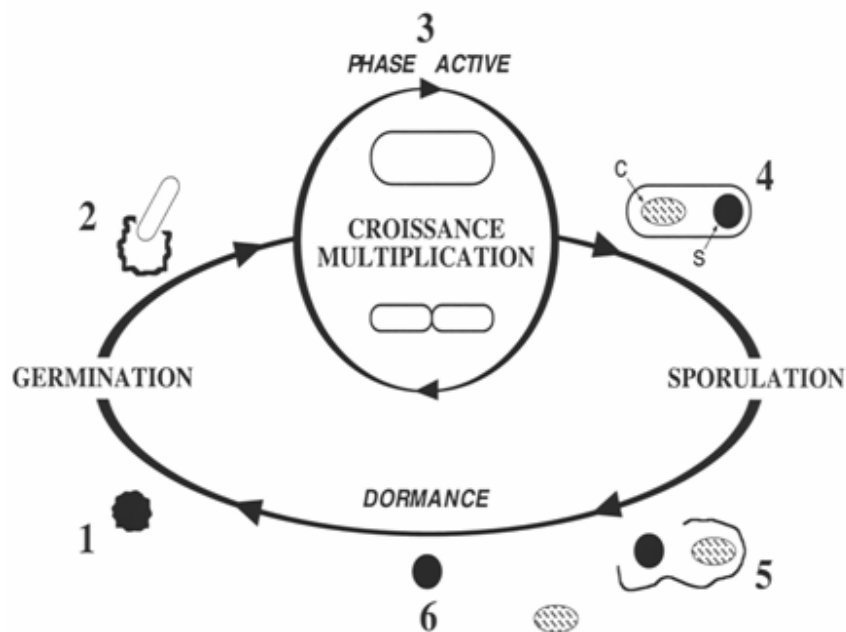
Cette nouvelle nomenclature établie par Crickmore en 1998 a été plus rationnelle. (Annexe 1) (Crickmore *et al.* 1998). Basée uniquement sur le pourcentage d'identité de structure primaire des genes, cette nomenclature a abandonné l'annotation romaine au profit du système arabe (par ex. CryIVA est devenue Cry4A). Les alignements de séquence montrent la présence de cinq blocs relativement bien conservés au sein du groupe. Chaque toxine est caractérisée par son appartenance à une classe, une sous-classe, selon le degré d'identité qu'elle présente avec les autres.

### **2.3.2. Structures des delta-endotoxines**

L'étude de la structure primaire des toxines Cry a révélé la présence de cinq blocs d'acides aminés conservés dans le cœur actif de la toxine (Rajamohan, 1998). Dans la classification révisée par Schnepf *et al.* (1998), trois blocs supplémentaires sont trouvés à l'extérieur du cœur toxique actif dans la moitié terminale carboxylique. (Figure 5). La structure tertiaire de delta-endotoxine est resté incertaine jusqu'à la publication de Li *et al.* (1991) qui a publié la structure de cristal Cry3A, une toxine de scarabée.

Jusqu'à présent, les structures d'encore deux protéines cristales, Cry1Aa et Cyt2A, ont été résolues par la cristallographie des rayons X, (Grochulski *et al.* 1995; Li *et al.* 1996). Ces auteurs ont proposé que les autres protéines Cry puissent adopter le même plan de structuration, puisque la plupart des protéines Cry connues contiennent cinq blocs de séquences fortement conservées et que

ces blocs composent le cœur de structure de Cry3A. Il a été démontré que Cry3A et Cry1Aa partagent l'identité de séquence des acides aminés d'environ 36% (Crickmore *et al.* 1998). Cette similitude est reflétée dans leurs structures tridimensionnelles comme les domaines correspondants peuvent pratiquement être en surimpression.



**Figure 4: Schématisation du cycle vital d'un *B. 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 de l'inclusion cristalline (c), 5) autodestruction, 6) Dormance. Source Dr. J. O. Lacoursière et Dr. J. Biosvert, Université du Québec à Trois-Rivières.

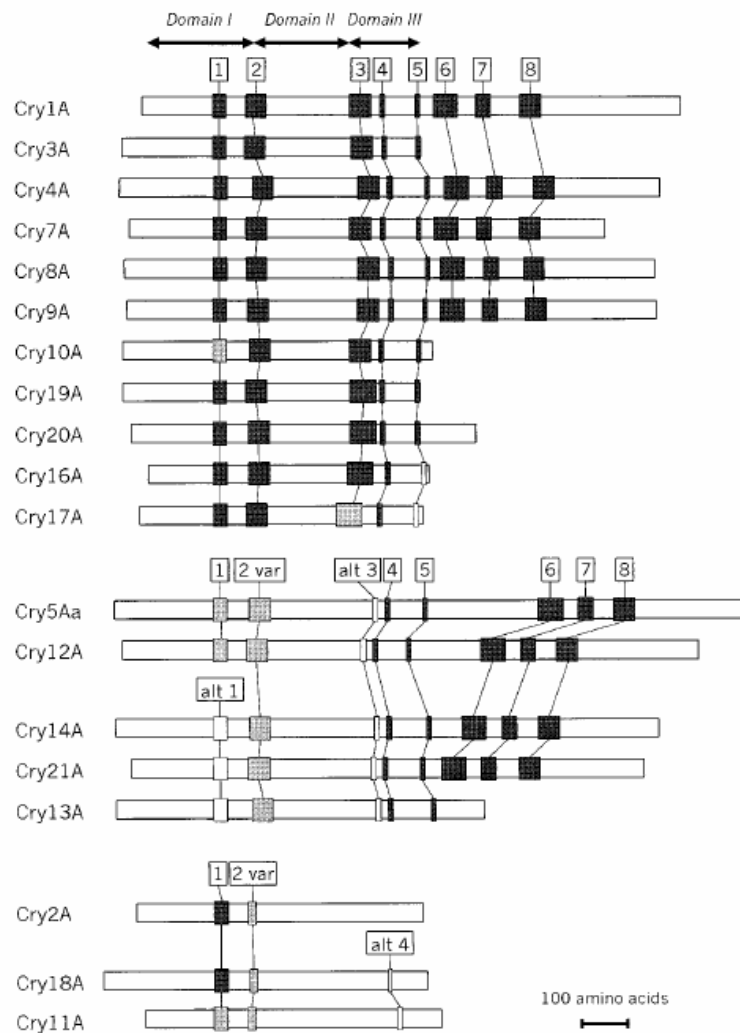
### **2.3.3. Interprétation de la relation structure-fonction des protéines Cry**

Les toxines Cry ont montré un haut degré de similitude structurelle 3D complète, consistant de trois domaines distincts, chacun avec une fonction spécifique

Le domaine I est composé d'un paquet de sept hélices alpha, dont six hélices amphipatiques entourant l'hélice du coeur central (Cannon *et al.* 1996). Ce domaine N-terminal est responsable de l'insertion dans la membrane de l'intestin et la formation du pore (Li *et al.* 1991; Grochulski *et al.* 1995; Morse *et al.* 2001).

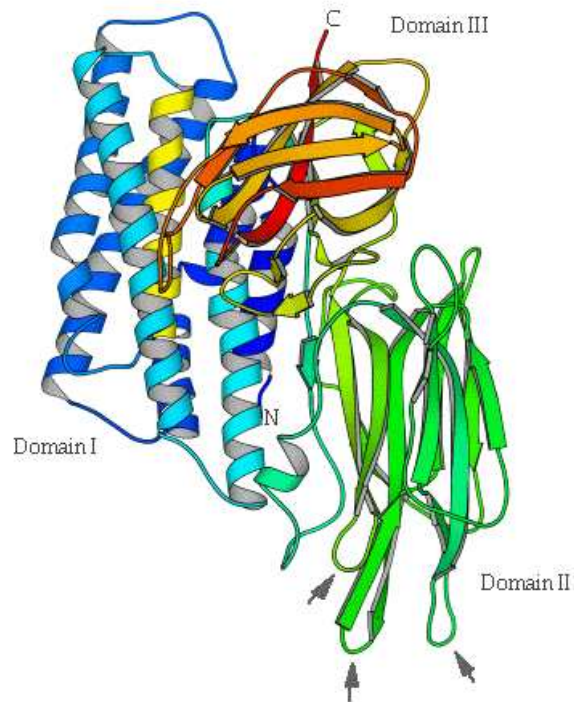
Le domaine II est composé de trois feuillets bêta antiparallèles qui sont empaquetées autour d'un coeur central hydrophobique formant une structure nommée le prisme bêta, chaque feuillet s'est terminé dans une boucle à l'apex de la molécule (Li *et al.* 1991; Grochulski *et al.* 1995). Ce domaine participe à la reconnaissance des récepteurs de la membrane épithéliale de l'intestin de l'insecte et de la spécificité d'insecte (Smedley and Ellar 1996; Rajamohan *et al.* 1996; Ballester *et al.* 1999; Jurat-Fuentes and Adang 2001).

Le domaine III est caractérisé par une structure « bêta sandwich » qui est formé de deux feuillets bêta antiparallèles. Le rôle de ce domaine C-terminal est toujours peu clair, bien qu'il ait été impliqué dans le repliement et la structure tridimensionnelle de la protéine active (Dean *et al.* 1996), dans la perméabilisation des membranes (Schwartz *et al.* 1997; Masson *et al.* 2002), ou dans la liaison aux récepteurs pouvant influencer la spécificité d'insecte (Lee *et al.* 1995; de Maagd *et al.* 1996; Burton *et al.* 1999). (Figure 6 et 7).

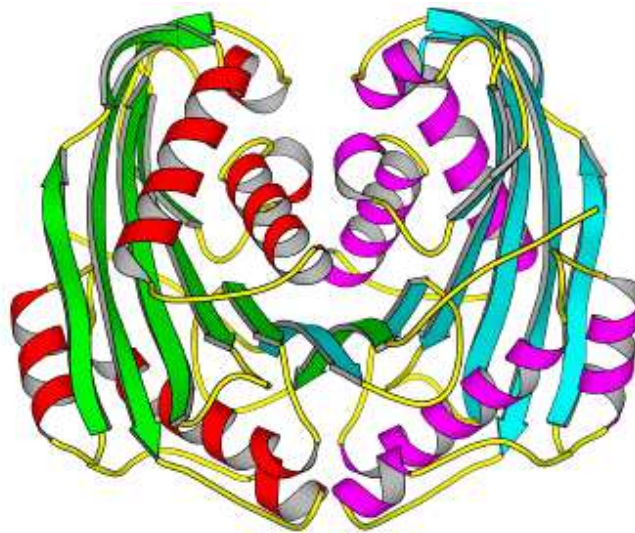


**Figure 5 : Les positions des blocs conservés parmi les protéines Cry.**

Le Figure montre l'arrangement de séquence sur chaque toxine holotype. Les blocs de séquences sont montrés comme gris foncé, gris clair, ou blanc pour indiquer haut, des degrés modérés, ou bas degrés de similitude, respectivement, pour les séquences consensus de chaque bloque conservé; var Des séquences variables conformant aux séquences consensus des groupes fortement conservés avec 50 à 75% de positions; alt des blocs alternés dérivent des groupes de protéines ayant une séquence conservée qui diffère du séquences hautement conservée correspondante avec plus que la moitié de ses positions. (Schnepf *et al.* 1998).



**Figure 6 : Structure 3D de Cry 3A (Li *et al.* 1991)**



**Figure 7 : Structure de Cyt 2A (Li *et al.* 1991)**



## **2.4. Activation de la toxine**

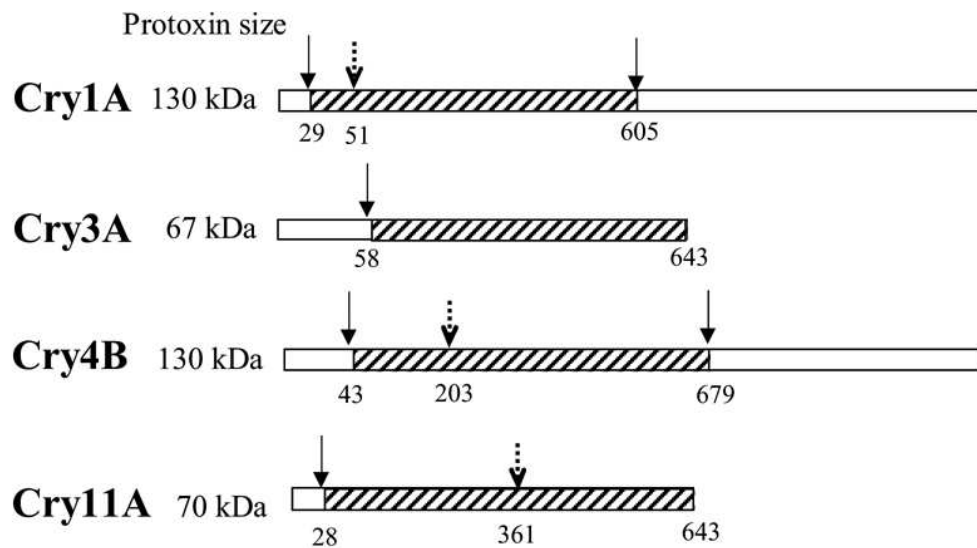
Les inclusions cristallines produites par les cellules de *B. thuringiensis* contenant un ou plusieurs types de protéines cibles. Selon leur composition en protoxine, les cristaux ont des formes diverses bipyramidale (Cry1), cuboïdale (Cry2), rectangulaire (Cry3A), irrégulière (Cry3B), sphérique (Cry4A et Cry4B) et rhomboïdale (Cry11A). Le cristal doit être solubilisé pour devenir biologiquement actif. Ainsi, la solubilisation du cristal est normalement portée *in vivo* par l'exposition à l'environnement fortement alcalin dans l'intestin des larves susceptibles.

Les caractéristiques de la structure et de la solubilité d'un cristal dépendent de plusieurs facteurs comme la structure secondaire de la protoxine, l'énergie des pont-disulfures. Après la solubilisation, beaucoup de protoxines sont clivées par des protéases présentes dans l'intestin de l'insecte pour devenir des toxines actives (Lecadet and Dendonder 1967). Milne and Kaplan (1993) ont formulé une hypothèse que les majeures protéases des intestins des Lépidoptères ont été semblables aux trypsines et chymotrypsine ceci est confirmé par Johnston *et al.* (1995); Novillo *et al.* (1997). Les protoxines du Cry1A ont été digérées à des protéines de 65kDa. Ce clivage est séquentiel commençant au C-terminal et finissant à, ou près de la position d'acide aminé 623 (Bietlot *et al.* 1989). Un clivage supplémentaire a été produit à l'extrémité N-terminal de la protoxine, il s'agit d'un enlèvement des 29 premiers acides aminés. Une fois activée, la toxine est relativement stable et résistante aux autres digestions enzymatiques (Aronson *et al.* 1986; Choma *et al.* 1990; Bravo *et al.* 2005). (Figure 8).

Pour les autres toxines dont la taille ne dépassant pas 70 à 80 kDa, le fragment de 60 kDa est généré après protéolyse d'une petite partie C-terminale (*cry2*) et N-Terminale (*cry3*). Ces résultats suggèrent que la partie active des delta-endotoxines réside dans le domaine N-terminale. Ceci est supporté par

l'homologie des séquences nucléotidiques entre les gènes de classes *cry2*, *cry3*, *cry4C* et *cry4D* avec la séquence correspondante au domaine N-terminale de la protéine *cry1* (Höfte et Whiteley, 1989). La partie C-terminale, est hautement conservée, riche en cystéine est non essentielle pour la toxicité. Elle intervient dans le phénomène de cristallisation (Pajncapel-Messai, 1993).

L'activité protéolytique agissant sur des toxines Cyt a été décrite par Chilcott et Ellar (1988). Knowles et al ont identifié en 1992 une protéine Cyt de 25kDa comme une protoxine dans l'inclusion cristalline de *B. thuringiensis kyushuensis*. Cette protéine n'a pas montré d'activité cytolytique qu'après son clivage protéolytique donnant ainsi des résidus de 22-23 kDa qui étaient toxiques aux moustiques et aux Lépidoptères.



**Figure 8 : Les longueurs relatives de quatre classes des protoxines Cry et les positions des digestions par les proteases.** Les rectangles blancs représentent les protoxines et les rectangles rayés représentent les toxines activées, les flèches complètes montrent les sites de clivages terminaux du côté N et C-terminal des toxines activées, les flèches en pointillés montrent les clivages intramoléculaires, Clivage de Cry1A à un résidu de 51kDa résulte de la perte de spirale  $\alpha$ -1 et la formation de pore, le clivage de Cry4B a abouti à deux fragments de 18 et 46 kDa, tandis que Cry11A a abouti à deux fragments de 34 et 32 kDa.

## **2.5. Mode d'action des delta-endotoxines de *B. thuringiensis***

### ***2.5.1. Mode d'action des toxines Cry***

Les delta-endotoxines ne sont pas des insecticides de contact (Vassal, 2004). C'est suite à une ingestion par les insectes sensibles que la toxine agit (Heckel *et al.* 1997; Kamrin, 1997). D'après plusieurs études physiologiques et immunologiques, les cellules de la paroi de la portion médiane du tractus digestif constituent le site initial de l'action toxique (de Barjac, 1978; Hofmann et Lüthy 1986). Plusieurs étapes sont nécessaires avant que la toxine acquière son pouvoir insecticide (Bravo *et al.* 2007)

#### *Solubilisation et activation*

Comme on a vu précédemment, une fois ingérées les protéines cristallines sont solubilisées dans l'intestin de l'insecte à un pH basique (10-12). Les protéines libérées sont par la suite transformées en toxines actives après une lyse partielle par les enzymes du tube digestif (Whalon et McGauchey 1998; Bravo *et al.* 2005). (Figure 9).

#### *Liaison sur le site récepteur*

La toxine activée traverse la membrane péri-trophique et elle se fixe sur des récepteurs spécifiques, présents à la surface des microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'insecte (Schnepf *et al.* 1998).

#### *Formation des pores*

L'interaction toxine-récepteur aboutit à un changement de conformation du récepteur et ainsi formation d'un pore dans la cellule cible (Bravo *et al.* 2005) Cela entraîne une perturbation des échanges ioniques, une modification du pH intestinal, puis la lyse de la cellule épithéliale de l'intestin. Cette lyse provoque une paralysie du tube digestif de l'insecte qui cesse de s'alimenter (Gill *et al.* 1992) et meurt affamé un à trois jours après l'ingestion du cristal. Finalement, l'insecte meurt de la famine, de septicémie ou bien de la combinaison entre les

deux (Juarez-Perez and Ferrandis 1997). La mort résulte à donc des effets combinés de famine et des tissus endommagés (Whalon et McGauhey 1998).

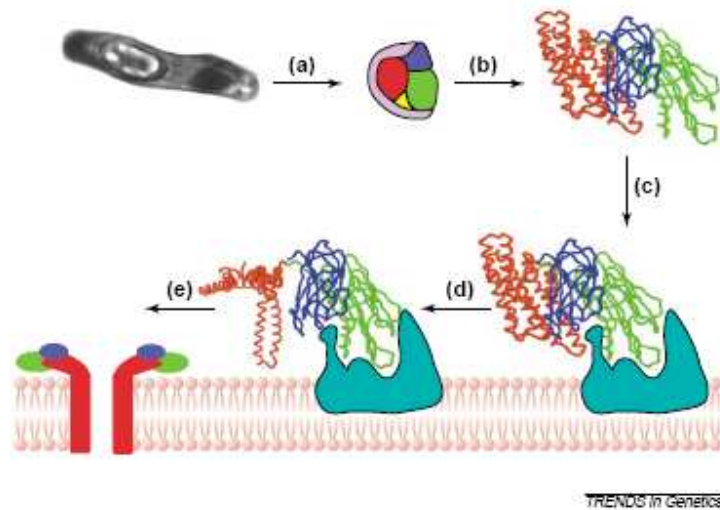
### **2.5.2. Mode d'action des toxines Cyt**

Comme les endotoxines *Cry*, les endotoxines *Cyt* se forment pendant la sporulation et sont associées aux inclusions cristallines. Elles sont aussi, synthétisées sous forme de protoxines qui doivent passer par une étape de solubilisation en milieu alcalin pour donner des dimères et subir ensuite un clivage sous l'effet de la protéinase K pour que leurs sites actifs soient dégagés (Koni et Ellar 1994). L'endotoxine *Cyt* activée se lie aux phospholipides insaturés de la membrane des cellules épithéliales de l'intestin moyen (Gill *et al.* 1987; Promdonkoy and Ellar 2003).

Il existe deux théories pour expliquer son mode d'action subséquent

- Une formation d'agrégats de toxine qui produisent des pores spécifiques aux cations (Knowles *et al.* 1989).
- Ou un effet comparable à celui d'un détergent ouvrant dans la double couche de lipides de larges failles non spécifiques (Butko, 2003).

Peu importe le modèle retenu, le déséquilibre osmotique qui en découle conduit à la lyse des cellules et à la mort de l'hôte. Outre, leurs propriétés insecticides anti-moustiques, les endotoxines *Cyt* présentent un large spectre d'activité cytolytique contre toute une gamme de cellules eucaryotes et d'érythrocytes (Knowles *et al.* 1989).



**Figure 9 : Mode d'action des delta-endotoxines de *B. thuringiensis*.**

**a** Solubilisation des cristaux protéiques ; **b** Activation des delta-endotoxines ; **c et d** Fixation des toxines activées sur le site récepteur ; **e** Formation de pores transmembranaires. Source (RUUD *et al.* 2001).

## 2.6. Autres facteurs pathogéniques de Bt

En plus des toxines Cry et Cyt, certaines souches de *B. thuringiensis* produisent en phase stationnaire de croissance, un autre facteur insecticide la  $\beta$ -exotoxine (de Barjac and Dedonder 1965). C'est un composé thermostable, analogue d'un nucléotide. Il agit en inhibant le fonctionnement de l'ARN polymérase, par compétition avec l'ATP (Sebesta and Horska, 1981; Glare and O'Callaghan 2000). Mis à part de son spectre d'action peu spécifique, ce composé est très peu utilisé en lutte biologique à cause de sa toxicité pour la plupart des organismes testés. D'autres types de toxines insecticides sont également produits par *B. thuringiensis*. Il s'agit des protéines Vip. Les toxines Vip (Vegetative Insecticidal Proteins), découvertes en 1996, sont synthétisées dès la phase exponentielle de croissance. Ces protéines sont classées en trois sous-familles Vip1, Vip2 et Vip3 (Estruch *et al.* 1996). Les protéines Vip1 et Vip2 sont des toxines binaires spécifiques des coléoptères, tandis que les

protéines Vip3 sont actives contre les lépidoptères insensibles aux toxines Cry (Donovan *et al.* 2001).

### **3. Résistance des insectes aux insecticides**

En 1985, le premier rapport sur la résistance d'insecte à Bt a été publié (McGaughey, 1985), autrement, beaucoup d'enquêteurs ont cru par erreur que les insectes ne développeraient pas de résistance à *B. thuringiensis*. Depuis, beaucoup plus de tels cas ont été annoncés incluant d'autres ordres d'insectes. Il apparaît maintenant que la résistance à Bt peut se développer rapidement sous les situations de pression de sélection extrême, dans le laboratoire ou dans le champ. (Stone *et al.* 1989; Tabashnik *et al.* 1990; Meng *et al.* 2004).

McGaughey (1985) a étudié le premier cas de résistance à Bt dans la mite alimentaire originaire d'inde (*Plodia interpunctella*). Plusieurs générations de larves de *Plodia interpunctella* ont été exposées aux quantités intensives de Dipel (un produit commercial formulé à partir de Bt var. *kurstaki*, Btk). Ainsi en 15 générations, les individus survivants étaient 100 fois plus résistants que les témoins. De plus, après 36 générations de sélection, la résistance s'est étendue à 250 fois. Par la suite d'autres cas de résistance ont été signalés chez des Lépidoptères, des Coléoptères et des Diptères (Nester *et al.* 2002).

Le premier cas de résistance dans la nature a été détecté au sein d'une population de *Plutella xylostella*, Teigne des crucifères, sur l'île de Hawaii. La résistance observée après plus de 50 pulvérisations de DIPEL® en plein champ était de l'ordre de 25 à 30 fois (Tabashnik, 1990). Ensuite d'autres cas ont été observés chez la même espèce en Floride, en New York, en chine, en Japon, aux Philippines, en Thaïlande et en Malaisie (Tabashnik *et al.* 1990; Ferre *et al.* 1991; Tanaka and Kimura 1991; Shelton *et al.* 2000; Sayyed, 2001).

Plusieurs rapports de résistances des insectes ont été documentés pour des toxines Bt. En 1998, Ramachandran *et al.* ont alimenté les larves de *P. xylostella* résistants à cry1A avec des feuilles de canola (colza de printemps) transgéniques par Cry1Ac. Les larves ont été développées également sur les feuilles transgéniques que normales. La sélection d'un *Spodoptera exigua* avec Cry1Ca a abouti aux facteurs significatifs de résistance à Cry1Ca (à 850) et d'une résistance croisée aux Cry1Ab et Cry2Aa (Moar, 1994). Le ravageur des feuilles de pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*) sélectionné à partir d'adultes rassemblés de champs pulvérisés avec des formulations de Bt contenant Cry3Aa a abouti à un facteur de résistance à 293 fois, quand il est soumis à la sélection aux conditions du laboratoire avec des formulations Cry3Aa pour 29 générations (Rahardja and Whalon 1995).

Dans des expériences de sélection utilisant des toxines individuelles ou des combinaisons de toxines individuelles de *B. thuringiensis israelensis* sur une colonie de laboratoire de *Culex quinquefasciatus*, les degrés de résistances étaient inversement corrélés avec le nombre de toxines constitutives dans l'agent de sélection. Ainsi, la présence de Cyt1Aa supprime le développement de résistance contre les toxines Cry4/Cry11 (Georghiou and Wirth 1997; Wirth and Georghiou 1997). En effet, en combinant Cyt1Aa avec des protéines Cry4 ou Cry11 a rétabli la toxicité de Cry4 et Cry11 contre des colonies *C. quinquefasciatus* résistantes contre ces toxines (Wirth *et al.* 1997). La présence de Cyt1A facilite l'insertion de protéines Cry4/Cry11 dans les membranes des intestins des larves résistantes.

#### **4. Mécanismes de résistance**

En réponse à l'action nocive des insecticides, plusieurs mécanismes de résistance ont été développés par les insectes (Rodriguez *et al.* 1993; French-Constant *et al.* 1998).

##### **4.1. Modification du comportement**

Dans ce cas, l'insecte devient résistant en évitant simplement les produits. Peu d'informations existent sur le déterminisme de ce mécanisme (Roush et Tabashnik 1990).

##### **4.2. Modification de la cible**

Elle empêche l'intégration de la substance active dans le processus de transfert de l'information nerveuse (Berrada *et al.* 1994; Head *et al.* 1998). Selon Plapp (1986), elle serait due à des mutations dans un gène donné. Heckel *et al.* (1997) confirment cette affirmation et attribuent la modification du canal sodium à une mutation du gène KDR (Knock Down Resistance). En effet, la majorité des études sur la résistance montrent une modification de l'affinité des toxines pour la bordure en brosse des intestins moyens chez des larves d'espèces résistantes avec ou sans modification du nombre de sites de fixation, traduisant ainsi une altération qualitative des récepteurs (Ferre et Van Rie, 2002). Par exemple, les cadhérines présentent souvent des mutations et des délétions responsables de phénomènes de résistance aux toxines Cry (Jurat-Fuentes et Adang 2006).

##### **4.3. Métabolisation des produits dans l'organisme ou détoxification**

Elle altère la structure de la substance active et la rend inoffensive pour l'insecte (Head *et al.* 1998). Les enzymes impliquées dans ces réactions sont des estérases, des mono-oxygénases et les glutathions-transférases (Guillet, 1997;



Denhold *et al.* 1997). Si l'activité d'une de ces enzymes augmente, cela peut entraîner le développement d'une résistance (Gunning *et al.* 1999). Dans certains cas, un défaut d'activation des protoxines par le système enzymatique de l'appareil digestif peut être la cause de résistance (Candas *et al.* 2002; Loseva *et al.* 2002). Par exemple, des extraits d'intestins moyens de larves de *Plodia interpunctella* ont montré une activité protéolytique diminuée chez une souche résistante liée à une perte de l'expression d'une protéase nécessaire à l'activation de la toxine Cry1Ac (Oppert *et al.* 1997). D'autres études montrent également des cinétiques d'activation ou de dégradation des protoxines respectivement diminuées ou augmentées conduisant à des résistances chez des larves de *H. virescens* (Forcada *et al.* 1999).

Néanmoins, les mécanismes décrits dans la majorité des cas sont directement reliés aux événements se produisant au niveau de la membrane des tissus cibles (Jurat-Fuentes et Adang 2006; Morin *et al.* 2003; Wang *et al.* 2007). Ainsi la modification du site d'action et la détoxification sont les deux mécanismes les plus importants de la résistance des insectes aux insecticides (Traore, 1997; Ru *et al.* 1998).

## **Objectifs**

L'objectif de cette étude est d'isoler des nouvelles souches de *B. thuringiensis* présentant une activité bio-insecticides contre des larves de cératites. Pour atteindre cet objectif l'isolement et la purification des souches de *B. thuringiensis* ont été réalisés en utilisant des échantillons des boues prélevés de Sebket Sijoumi à Tunis. Une identification des souches de *B. thuringiensis* isolées grace à des observations macroscopique et microscopique a été effectuée. Ensuite, l'étude de l'effet des souches de *B. thuringiensis* sur des larves de cératites a été réalisé *in vitro* dans des boites de Petri en utilisant les cultures de différentes souches et les extraits des protéines cristales pour sélectionner les souches less plus efficaces. Enfin une analyse du profil protéique a été réalisée pour vérifier la diversité des souches de *B. thuringiensis* sélectionnées.

## **Matériel & Méthodes**

## **Matériel**

### **1. Milieux de culture**

**TCS (Trypto-Caseine de Soja)** dont la composition est 15 g de peptone de caséine, 5 g peptone de soja et 5 g de chlorure de sodium pour 1 litre d'eau distillée.

**TCS/Agar** est constitué d'un litre de milieu TCS liquide additionné de 20 g d'agar.

**LB (Lauria Bertani)** est composé de 10 g NaCl, 10 g de Bactopeptone et de 5g Extrait de levure par litre d'eau distillée.

**LB/Agar** est constitué d'un litre de milieu LB liquide additionné de 20 g d'agar.

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 100°C pendant 20 minutes sous une pression de l'ordre de 2 bar. En effet, ils sont utilisés pour l'isolement, l'étude morphologique des souches de *Bacillus thuringiensis* ainsi que l'étude de la production des  $\delta$ -endotoxines.

### **2. Tampons**

#### **2.1. Tampon de l'extraction des suspensions spore-cristal**

Tampon phosphate saline (PBS), pH 7.4 contenant 0,005% Triton X-100.

Le tampon PBS est composé de NaCl 8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.9 g, KCl 0.2 g et eau distillée q.s.p. 1 L. Ce tampon est utilisé pour l'extraction des suspensions spore-cristal des différentes souches de Bt.

#### **2.2. Tampons de gel SDS-PAGE**

Solution d'acrylamide 29,2%, bis acrylamide 0,8%, H<sub>2</sub>O qsp 100ml.

Tris-HCl 1M, pH 6.8.

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.

APS (ammonium persulfate) 10%

TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Tampon de migration Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%.

Tampon de l'échantillon Tris-HCL (pH 6.8) 0.2 M,  $\beta$ - mercaptoéthanol 10 mM, glycérol 20%, SDS 10% et bleu de bromophénol 0.05% .

### **3. Colorants**

**Violet de Gentiane** 1g de violet de cristal, 10ml d'alcool absolu et 90 ml eau phéniquée à 1%.

**Lugol** 0,08 M I<sub>2</sub> et 3,2 M KI.

**Fuchsine** composée de 10 ml de solution de fuchsine saturée dans l'alcool ajustée avec 90 ml d'eau distillée.

Le violet de Gentiane, le lugol et la Fushine ont été utilisés lors de la coloration gram.

Le **vert de Malachite** a été utilisé pour la coloration des spores.

Le **Safranine** a été utilisé pour la coloration des corps parasporaux.

Une solution de bleu de Coomassie 0,133% bleu de Coomassie R 250 dans 50% acide acétique pour la coloration des corps parasporaux.

Une solution de bleu de Coomassie R 250 pour la révélation des gels de polyacrylamide composé d'éthanol 45%, acide acétique à 10% et 0.5 g de bleu de Coomassie.

### **4. Milieu d'élevage des larves de cératite**

Le milieu artificiel d'élevage de la Cératite utilisé au laboratoire d'Entomologie du CNSTN est à la base du son de blé. Le milieu est composé du son de blé 28%, sucre 14%, Acide chlorhydrique 1%, Benzoate de sodium 0.2%, Levure Torula et 50% d'eau.

### **5. Matériel biologique**

### **5.1. Souches bactériennes**

Une collection de souches bactérienne de *Bacillus thuringiensis* isolées et identifiées au Laboratoire, ont fait l'objet du présent travail.

### **5.2. Les larves**

Des larves de Cératite de fruit (*Ceratitis capitata*), fournies par l'unité pilote de mouche stérile au Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires ont été utilisés pour tester l'activité bio-insecticide sur des souches de *Bacillus thuringiensis*.

## **Méthodes**

### **1. collection des échantillons**

Vingt échantillons des boues contenant des cadavres d'insectes ont été collectés des endroits différents à Sebket Sijoumi à Tunis. Les échantillons ont été prélevés de 2 à 5 cm au dessous de la surface et conservés dans des sacs plastiques stériles à 4°C (Reena *et al.* 2009).

### **2. Isolement des souches de Bt**

L'isolement des souches de Bt a été effectué selon la méthode sélective décrite par Travers *et al.* (1987). En effet, un gramme de chaque échantillon a été mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée stérile après, 1 ml de chaque suspension est ajouté à 10 ml de bouillon nutritif LB (Luria Bertani) tamponé par l'acétate de sodium à 0.25 M, pH 6.8. En fait, l'addition de l'acétate de sodium empêche la germination des spores de *B. thuringiensis* contenues dans l'échantillon et favorise la germination des autres spores. Les suspensions ont été incubées à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 4h et ensuite chauffées

à 80°C pendant 3 min. Par la suite, une série de dilution a été effectuée ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). 100 µl de chaque dilution ont été étalés sur milieu TCS gélosé (Trypto Caséine Soja) et les boîtes obtenues ont été incubées à 30°C pendant 48h. Après la croissance bactérienne plusieurs repiquages ont été effectués sur TCS solide (TCS /Agar) pour purifier d'avantage les souches de Bt. les isolats sont considérées pure lorsque les cultures étant axéniques comme indique l'observation par l'œil nu et par le microscope optique (Carozzi *et al.* 1991). Les souches bactériennes pures ont été conservées dans le glycérol à 25% et stockées à -20°C et à -80°C.

### **3. Identification des différents isolats par microscopie**

#### **3.1. Par microscope optique**

##### ***3.1.1. Coloration Gram***

Les colonies obtenues ont été identifiées morphologiquement par coloration Gram suivie d'une observation au microscope optique à immersion. Cette coloration nous permet de différencier les bactéries selon la forme (bâtonnet ou sphérique), la taille, la disposition des bactéries et l'affinité pour les colorants (Gram positif ou Gram négatif). En effet, la technique de coloration se fait en trois étapes après avoir fixé le frottis

1. La lame a été colorée par le violet de Gentiane pendant 1 minute ensuite rincée à l'eau distillée. Le violet de Gentiane est un colorant puissant. Il traverse les parois et les membranes des bactéries et se fixe dans leurs cytoplasmes. Ainsi à cette étape toutes les cellules sont colorées en violet.
2. Le lugol (comme mordant) a été étalé sur la lame et laissé pour agir pendant 1 minute ensuite décoloré à l'alcool 90°. La décoloration est effectuée en versant l'alcool goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement. Le lugol renforce le violet de Gentiane contenu dans le



cytoplasme des bactéries et l'alcool 90° est utilisé pour chasser le violet. Cette étape est cruciale car elle permet de distinguer entre les bactéries gram négative celles gram positive. Le principe est le suivant une bactérie gram positive possède une paroi riche en peptidoglycane, composant qui empêche l'alcool d'emporter le violet de Gentiane celui-ci restant dans le cytoplasme. La bactérie n'est donc pas décolorée.

3. La lame a été recolorée à la fuschine pendant 30 secondes, ensuite lavée doucement à l'eau distillée et séchée 10 à 15 minutes.

La lame est ensuite observée au microscope optique à immersion généralement à l'objectif x100. Toutes les bactéries colorées en violet sont dites "*GRAM +*" et celles colorées en rose sont "*GRAM -*" (Eswarapriya *et al.* 2010).

### ***3.1.2. Coloration différentielle des spores et des cristaux***

La présence des corps parasporaux et des spores a été observée sous un microscope optique à l'objectif Gx100 avec de l'huile à immersion (Reena *et al.* 2009).

### ***3.1.3. Coloration avec le vert de malachite et le safranine***

Ces colorations mettent en valeur les spores et les cristaux. L'observation par microscopie optique montre que les spores sont colorées en vert et les cristaux sont en rose. En effet, la technique de coloration se fait en deux étapes après avoir fixé le frottis (Ejiofor and Johnson 2002). La lame a été couverte par le vert de malachite et incubée à 55°C pendant 20 min puis rincée à l'eau distillée. Ensuite la lame a été recolorée avec le safranine pendant 5 min puis rincée à l'eau distillée. Une fois sèche, la lame a été observée au microscope optique à immersion.

### **3.1.4. Coloration avec le bleu de Coomassie**

La coloration des spores et des cristaux est effectuée à l'aide de bleu de coomassie selon les méthodes décrites par Reena *et al.* (2009) et Rampersad and Ammons (2005). Les frottis sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie (0,133 % bleu de Coomassie dans 50% acide acétique) pendant 5 minutes, lavés à l'eau distillée, séchés et observés au microscope. Avec cette méthode, les cristaux sont colorés en bleu et se distinguent facilement des spores qui sont incolores.

## **3.2. Par microscope à contraste de phase**

Après observation au microscope optique les mêmes préparations que celles des colorations différentielles des spores et des cristaux des souches de *B. thuringiensis* retenues ont été observées au microscope à contraste de phase, car les corps parasporaux sont nettement distinguable au microscope à contraste de phase (Bravo *et al.* 1998; Rampersad et Ammons 2002).

## **4. Activité insecticide de Bt**

Dans le but de tester l'effet des bio-insecticides, des souches de Bt sur des larves de Cératite au stade larvaire 1et 3, nous avons utilisé la culture de différentes souches ou les extraits protéiques de ces souches. Le test d'activité a été réalisé dans des boîtes Petri.

### **4.1. Effet de différentes souches de Bt sur des larves de cératites**

#### **4.1.1. Préparation des cultures des souches de Bt**

Après identification par coloration spécifique du corps parasporal et vérification que les souches bactériennes ont été différentes, les souches de Bt isolées ont été mis en culture jusqu'à une sporulation maximale. Ainsi, les

colonies de Bt ont été inoculées dans 1 ml TCS stérile et ont été incubées à 30°C pendant 8 à 15 h sous une agitation de 150 rpm. Par la suite ces pré-cultures ont été transférées dans 100 ml TCS stérile et ont été incubées à 30°C pendant 3 jours sous une agitation de 150 rpm. Aux moins 90% des cellules bactériennes ont été lysées libérant ainsi les spores et les cristaux (Aboussaid *et al.* 2009).

#### ***4.1.2. Préparation du milieu d'élevage des larves de Cératite***

Le milieu artificiel d'élevage de la Cératite utilisé au laboratoire d'Entomologie de CNSTN est à la base du son de blé. Ainsi, pour réaliser le test de l'activité bio-insecticide une quantité du milieu d'élevage des larves a été préparée à raison de 30 g par boîte de Petri.

#### ***4.1.3. Traitement des larves par les cultures des souches de B. thuringiensis***

Le test consiste à préparer un lot de boîtes de Pétri (9cm de diamètre) contenant chacune 30g de milieu d'élevage et 20 larves de Cératite au stade larvaire 3. Les boîtes de Petri ont été trouées à la face supérieure permettant ainsi l'aération du milieu à l'intérieur des boîtes.

La méthode consiste à imprégner les larves dans leur milieu d'élevage avec 20 ml des cultures de toxines déjà préparées de Bt ou avec 20 ml d'eau distillée pour le témoin. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche ainsi que pour le témoin. Après 48 h d'exposition aux toxines de Bt, les larves mortes sont comptées pour déterminer les taux de mortalités larvaires. Lorsque le taux de mortalité est > à 30%, une extraction de spore-cristal a été effectuée.

## **4.2. Effet des suspensions spore-cristal purifiées des différentes souches de Bt sur des larves de cératites**

### ***4.2.1. Purification des suspensions des cristaux et des spores***

Les souches de *Bacillus thuringiensis* isolées, ont été inoculées dans 100 ml de LB. Après incubation à 30°C pendant 72 h sous agitation de 150 rpm, les spores et les cristaux ont été rassemblés dans les culots après centrifugation pendant 15 min à 15 000 G et à 4°C. Les culots obtenus ont été lavés trois fois avec un tampon phosphate saline (PBS) contenant 0,005 % Triton X-100 dans le but de favoriser l'éclatement des cellules bactériennes. Par la suite les culots ont été conservés pendant une nuit à -80°C pour la lyophilisation. Une fois lyophilisés, le test des activités insecticides est effectué (Weathersbee III *et al.* 2006).

### ***4.2.2. Traitement des larves par le mélange spore-cristal***

Vingt larves de *Ceratitis capitata* au 3ème stade ont été placées dans des boîtes de Petri (9cm de diamètre) contenant du papier filtre noir imprégné avec la solution de toxines ou avec de l'eau distillée pour le témoin, avec 3g du milieu d'élevage des larves (Aboussaid *et al.* 2009). Une gamme de dose croissante des delta-endotoxines des souches de *B. thuringiensis* a été appliquée (25mg, 50mg, 75mg et 100mg) (Hassani et Gaouar Benyelles 2008). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche ainsi que pour le témoin. Après 48h d'exposition, le taux de mortalité est noté.

## **5. Profil protéique de différentes souches de *B. thuringiensis***

### **5.1. Extraction des protéines des différents isolats**

L'extraction des protéines a été effectuée à l'aide d'un réactif « Bug Buster » fournie par Novagen. Des cultures bactériennes des souches isolées ont été effectuées dans 3 ml TCS à 30°C sous une agitation de 150 rpm pendant 48h. Les cultures obtenues ont été centrifugées à 10000 g et à 4°C pendant 15 min (Centrifugeuse Hettich, Univesal 32R, rotor 1620A) et les culots ont été resuspendus dans 300µl de réactif d'extraction « Bug Buster ». Les suspensions ont été incubées à température ambiante pendant 1h sous agitation. Après cette incubation, les suspensions ont été centrifugées à 10000 g, à 4°C pendant 15min. Les surnageants contenant les protéines ont été récupérés et stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

### **5.2. Séparation des protéines su gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE**

L'analyse du profil protéique de différentes souches de Bt isolées a été effectuée sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS PAGE) à 10% selon la méthode de Laemmli (1970). La séparation des protéines a été réalisée à l'aide d'un système vertical Biorad. Les protéines ont été mises sur la même ligne à l'aide d'un gel de concentration (4%) ensuite une migration différentielle des protéines selon la taille est faite sur un gel de séparation à 10%. La polymérisation des deux gels de séparation et de concentration a été effectuée entre deux plaques en verre en ajoutant une solution de temed et de persulfate d'ammonium. Après polymérisation des gels, 15 µl d'extraits protéiques de différentes souches isolées et 4µl de tampon de charge ont été déposés dans les puis formées pour l'analyse du profil protéique de différentes souches étudiées.

La migration des protéines est faite à 100 V pendant 1 h en utilisant un tampon Glycine. A la fin de migration les protéines ont été révélées à l'aide d'une solution de coloration de bleue de coomassie.

La composition des gels de séparation et de concentration

- ❖ **Gel de séparation (10%)** avec 12,3 ml d'eau distillé; 7,5ml de 1,5 Tris-HCl (pH8, 8) ; 0,15ml SDS ; 6,9ml acrylamide/bis-acrylamide (30%/0,8% W/V), 0,15ml 10%(w/v) ammonium persulfate (APS), 0,02 TEMED.
- ❖ **Gel de concentration (4%)** 3,075ml d'eau; 1,25ml 0,5M Tris-HC 1 (pH6, 8) ; 0,025ml SDS ; 0,67ml acrylamide/bis-acrylamide (30%/0,8% W/V).

## **Résultats**

## Résultats

### 1. Isolement des souches de Bt

L'étude de l'aspect macroscopique des colonies permet de classer les bactéries isolées dans le groupe *Cereus*. Toutefois, les bactéries du groupe *Cereus* présentent un aspect macroscopique similaire. Les colonies de Bt et Bc présentent une forme arrondie de consistance crémeuse et dont le diamètre est de 4,5 mm. La morphologie des colonies ne permet pas distinguer les *B.cereus* et *B.thuringiensis*, donc les colonies montrant la morphologie typique de *B.cereus* et *B.thuringiensis* ont été choisies. Des repiquages successifs des colonies choisies sur TCS /Agar ont été effectués dont le but de purifier les isolats. Les isolats présentant que des colonies homogènes avec les mêmes aspects ont été considéré pure.



**Figure 10 : aspect macroscopique des colonies de *Bacillus thuringiensis* isolées**



## **2. Identification de différents isolats par microscopie**

### **3.1. Observation au microscope optique**

#### **2.1.1. Coloration Gram**

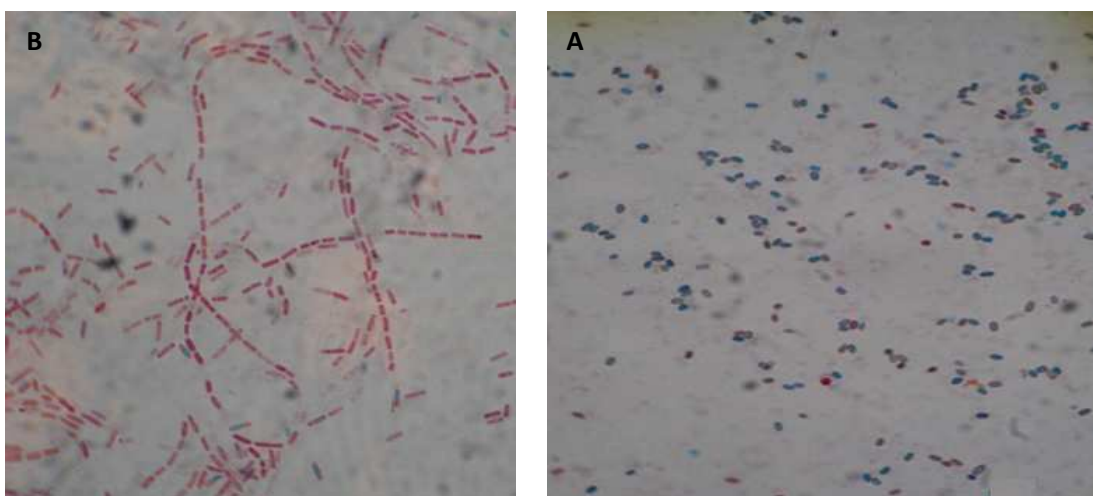
Une coloration gram des souches bactériennes isolées a été effectuée, suivie d'une observation au microscope optique. Selon l'affinité au colorant, la disposition des bactéries, la forme et la taille, la nature de gram a été déterminée. Une collection de 100 isolats a été examinée et les résultats ont montré que la collection étudiée est formée par souches de groupe *B.cereus*. Ces dernières sont toutes Gram positives, de 1µm de largeur et de 5 µm de longueur avec des formes rectangulaires aux extrémités arrondies et sont disposées en forme de tige.

#### **2.1.2. Coloration différentielle des spores et des cristaux**

L'étude des souches du groupe *Cereus* par microscope optique après coloration, permet de mettre en évidence la présence du corps d'inclusion parasporal qui n'est présent que chez *B. thuringiensis*.

##### **3.1.2.1. Avec le vert de malachite et le safranine**

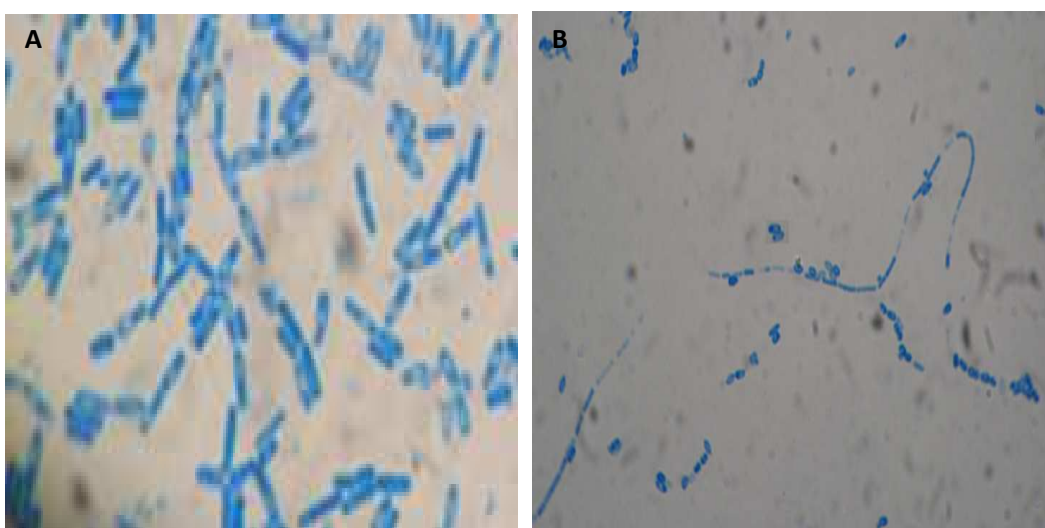
Cette coloration met en valeur les spores et les cristaux. En effet, l'observation par microscopie optique après une coloration avec le vert de malachite montre que les spores sont ovales à position centrales et colorées en vert tandis que les cellules et les cristaux sont colorés en rose (Figure10). Ces caractéristiques rappellent celles de *Bacillus thuringiensis*. Les résultats de cette étude ont permis d'identifier 70 souches de *B. thuringiensis* parmi 100 souches de la collection étudiée.



**Figure 11 : Observation microscopique (Gx100) : A Souche 9 et B souche 48**

### ***3.1.2.2. Avec le bleu de Coomassie***

La Figure 12 montre qu'en observation microscopique Gx100 avec huile à immersion des frottis bactériens colorés avec le bleu de coomassie, les spores se distinguent facilement des cristaux. Les cellules et les cristaux sont colorés en bleu tandis que les spores sont ovales, centrales et incolores.



**Figure 12 : Observation microscopique (Gx100) A souche 16 et B souche 9**

### 3.2. Observation au microscope à contraste de phase

En changeant le contraste, l'observation microscopique montre la présence des spores qui se manifestent par des zones claires transparentes et des cristaux protéiques parasporales opaques visualisées en grossissement 10 x 100. Ces cristaux protéiques caractérisent les souches de *Bacillus thuringiensis* (Figure 13).

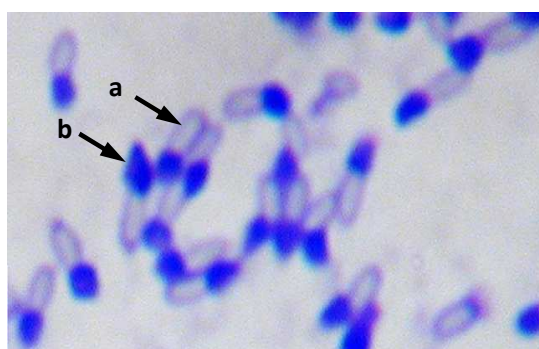


Figure 13 : Observation au microscope Contraste de Phase (Gx100) : a : spore ; b : cristal

## 4. Test biologique

### 4.1. Activité insecticide de *B. thuringiensis* : traitement des larves par les cultures sporulées des différentes souches de Bt

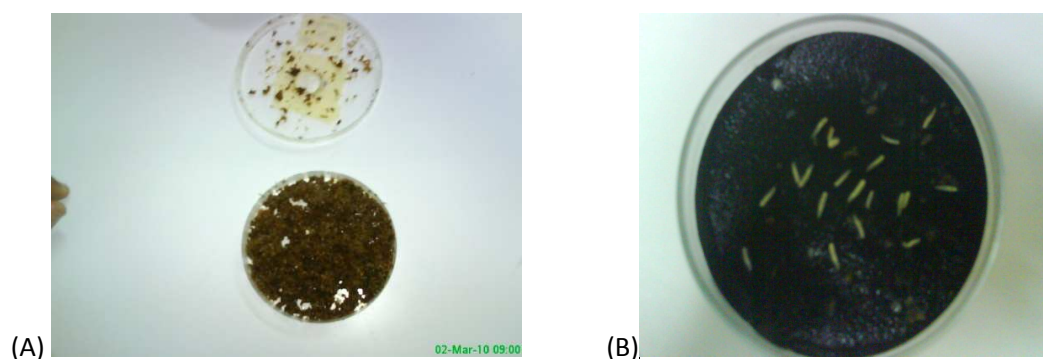


Figure 14 : Effet des souches de *B. thuringiensis* sur des larves de *C. capitata*. (A) milieu de son de seiche; (B) papier Wattman.

Des testes préliminaires avec les 70 isolats ont été effectués, permettant de sélectionner les souches de *Bt* ayant une activité insecticide contre les larves de cératite et causant au moins 30% de mortalité. Les résultats résumés dans le tableau montrent des effets variables sur la mortalité des larves selon les souches testées (Figure 15). Parmi les 70 souches testées 15 ont montré des taux de mortalité > à 30%. Six souches (Bt 15, Bt 16, Bt 2, Bt9 et Bt 25) ont montré un effet toxique très important sur les larves de cératites, cette toxicité est marquée par des taux de mortalité dépassant les 50% (Figure 15).

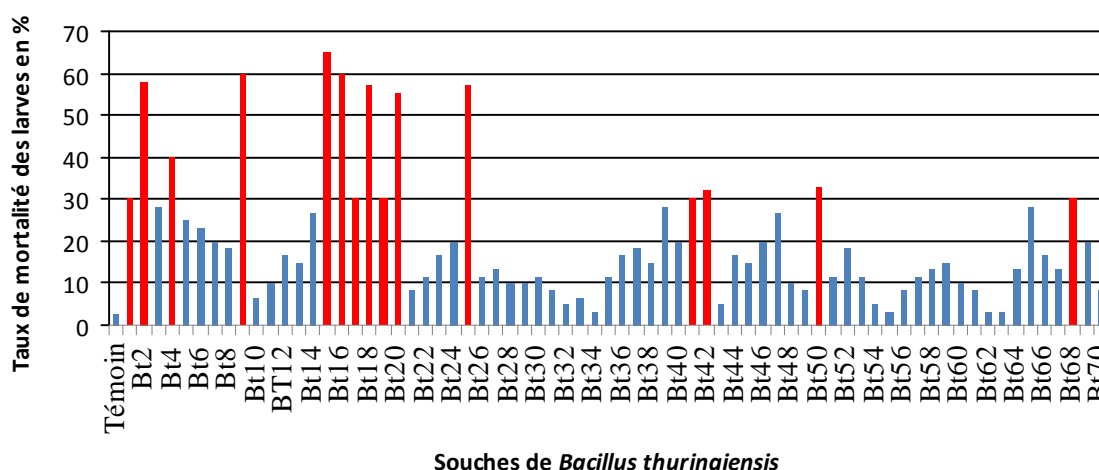


Figure 14 : Effet des souches de *Bacillus thuringiensis* sur le taux de mortalité larvaire de *C. capitata*.

#### 4.2. Activité insecticide de *B. thuringiensis* : traitement des larves par le mélange spore-cristal

L'analyse des résultats résumés dans le tableau 2, montre que l'application des endotoxines des *B. thuringiensis* affecte le développement larvaire des cératites. Après 24 heures d'application des endotoxines, certaines larves ont été retrouvées mortes, les autres se sont transformées en pupes.

**Tableau 1 : Effet des endotoxines des différentes souches de *B. thuringiensis* sur le taux de mortalité larvaire de *C. capitata***

Dose (mg) \ Souches de Bt	0	25	50	75	100
	Taux de mortalité en %				
<b>Bt 1</b>	3	5	18,33	28,33	50
<b>Bt 2</b>		23,33	58,33	73,33	90
<b>Bt 4</b>		8,33	20	36,66	60
<b>Bt 9</b>		33,33	61,66	75	90
<b>Bt 15</b>		35	63,33	81,66	95
<b>Bt 16</b>		36,66	65	83,33	95
<b>Bt 17</b>		8,33	15	26,66	53
<b>Bt 25</b>		26,66	53,33	65	90
<b>Bt 33</b>		6,66	13,33	25	52
<b>Bt 37</b>		11,66	23,33	40	75
<b>Bt 41</b>		8,33	18,33	25	50
<b>Bt 42</b>		10	16,66	28,33	53
<b>Bt 50</b>		13,33	23,33	36,66	55
<b>Bt 64</b>		10	21,66	35	55
<b>Bt 68</b>	6,66	20	26,66	50	

Les résultats obtenus après l'application des delta-endotoxines des souches de *B. thuringiensis* à des doses croissantes montrent que les taux de mortalité des larves de cératite sont variables d'une souche à l'autre et ces taux s'élèvent avec les doses croissantes. La gamme de doses utilisées varie du 25mg à 100mg et les taux les plus élevés ont été observés avec 100mg d'endotoxines pour toutes les souches testées. Les taux de mortalités les plus élevés observés varient de 75% avec les souches (Bt 37), 90% pour les endotoxines isolées des souches (Bt 2, Bt 9 et Bt 25) et 95% pour les souches (Bt15 et Bt16) en comparaison avec le témoin dont le taux de mortalité est 3% (Tableau 1). La dose 100 mg a été choisie pour vérifier la reproductibilité des résultats de notre étude.

La comparaison des effets de l'application des cultures des souches de *B. thuringiensis* avec l'application des suspensions spores-cristal lyophilisées sur des larves de cératites a montré que les taux de mortalités demeurent plus élevés que ceux déterminés à partir des cultures sporulées de *B. thuringiensis*. Ainsi, la purification du mélange spore-cristal a entraîné une augmentation de l'efficacité des endotoxines de chaque souche de *B. thuringiensis*.

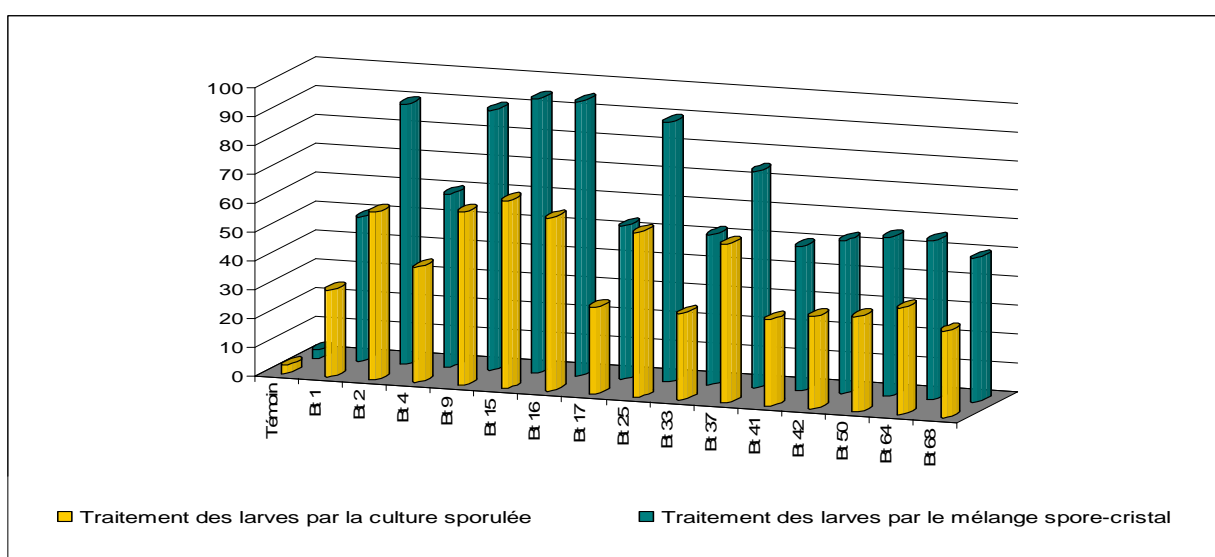
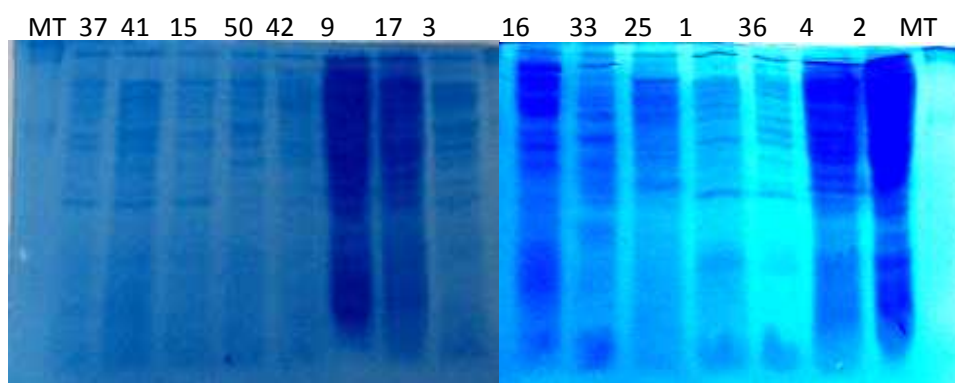


Figure 15 : Activité insecticide des différentes souches de *B. thuringiensis*

## 5. Vérification de la différence des isolats

L'analyse des protéines, extraites des différentes souches de *B. thuringiensis* isolées, sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante montre des profils différents. Ainsi, Les résultats montrent des différences au niveau des tailles et des nombres des bandes des protéines caractéristiques de

chaque souche. Ceci indique que les 15 souches montrant une activité insecticide contre les larves de cératite sont différentes entre elles.



**Figure 16 : Analyse des protéines des souches de *B. thuringiensis* sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.**

## **Discussion et conclusions**



## **Conclusions et Discussion**

Dans le cadre des activités de recherche du Laboratoire de Biochimie et de Technobiologie nous nous sommes intéressés à la recherche d'une forte activité bio-insecticide chez des souches de *B. thuringiensis* isolées à partir de différentes origines sol, eaux stagnantes, larves mortes et boues. La recherche de nouvelles activités bio-insecticides est très importante vu leurs intérêts dans la lutte biologique contre les larves d'insectes. Plusieurs chercheurs se sont intéressés à ce phénomène de lutte biologiques (Shnepf *et al.* 1998; Lambert et Peferoen, 1992), vu les effets potentiellement néfastes de l'utilisation massive d'insecticides chimiques pour l'environnement (Morris *et al.* 1993). L'utilisation de microorganisme entomopathogène comme *B. thuringiensis* a été considérée comme une alternative aux méthodes de luttés chimiques (Rodrigo-Simon *et al.* 2005). Ce genre de Bacillus présente des caractéristiques plus avantageuses que d'autres bactéries, grâce à leur capacité de former des endospores dans des conditions extrêmes d'une part et la production d'une protéine cristallisée durant la sporulation d'autre part (Shnepf *et al.* 1998).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'isolement et la purification des souches de *B. thuringiensis* à partir de sebkhet Sijoumi à Tunis et l'étude de leurs effets sur des larves de cératites.

Durant cette étude, nous avons optimisé une méthode d'isolement des *Bacillus* du groupe *cereus* qui donne un bon rendement. Cette méthode est basée sur l'utilisation de l'acétate de sodium comme facteur sélectif d'isolement de *B. thuringiensis*. L'acétate de sodium a permis l'élimination de la plupart des autres bactéries génératrices de spores et tous les organismes non générateurs de spores dans l'échantillon du sol. Cette méthode bloque la germination de spores des bactéries non désirées non éliminées par le traitement thermique. L'utilisation de l'acétate de sodium présente un effet similaire que celui des antibiotiques

(ampicilline-polymixine B). Des observations similaires ont été signalées dans des travaux antérieurs (Travers *et al.* 1987).

Cette étude nous a permis d'isoler 100 souches identifiées comme souches appartenant au groupe *Bacillus cereus* grâce à leurs propriétés morphologiques. La morphologie coloniale ne permet de distinguer entre les souches de *B. thuringiensis* et le *B. cereus*. Donc les colonies montrant la morphologie typique de ces dernières espèces ont été choisies (De Respinis *et al.* 2006). Les résultats d'isolement ont montré que les colonies sont entièrement blanches, avec des marges régulières rappelant les observations décrites par De Respinis *et al.* (2006) des *B. thuringiensis* et *B. cereus*.

Après coloration Gram et observation au microscope optique des cultures de 12 à 18 heures, ont montré que toutes les souches isolées sont Gram positives ainsi chaque isolat absorbe le violet de Gentiane et ne se décolore pas indiquant ainsi un organisme Gram positif, des observations similaires ont été décrites par Eswarapriya *et al.* (2010). Cette technique indique que les parois cellulaires sont composés de peptidoglycannes et que les cellules sont disposées en chaîne formant des tiges, en cellules doubles ou isolées, ces résultats sont conformes a ceux présentés par Eswarapriya *et al.* (2010). Ces observations correspondent à la phase végétative de croissance bactériennes, pendant la quelle les cellules de *B. thuringiensis* se multiplient de façon exponentielle, par scissiparité (Shnepf *et al.* 1998).

L'étude des 100 souches isolées appartenant au groupe *cereus*, par microscope optique après coloration des frottis bactériens réalisés à partir des cultures de 48 heures, permet de mettre en évidence la présence du corps d'inclusion parasporal dans 70 souches. Par conséquent, ces 70 souches sont des classées comme *B. thuringiensis*, ces résultats sont comparables à ceux de Reena

*et al.* (2009). Ces auteurs ont rapporté que les isolats ont été identifiés pour être des *B. thuringiensis* sur la base de la présence des protéines cristallines.

Les colorants, quelque soit le bleu de Coomassie, le vert de malachite et le Safranine, ont offert une résolution améliorée sur le contraste de phase permettant la visualisation de très petits corps parasporales ce qui a été démontré aussi par Rampersad and Ammons (2002). Quelques cristaux ne sont pas bien colorés cependant le contraste entre les spores et les cristaux était suffisant pour différencier les deux facilement, même que la morphologie de cristal est proche de celle de spore. Les résultats des observations par le microscope à contraste de phase ont confirmé la classification des 70 souches comme des *B. thuringiensis*. Ces observations ont montré que les souches contenant toutes des spores ovales, centrales, réfringentes à la lumière et des inclusions parasporales opaques. Les cristaux sont plus petits que les spores et apparaissent ainsi en corps plus foncés attachés avec les spores sous forme d'un "cap" chez les jeunes cultures, et qui persiste après la sporulation. Ces résultats sont comparables à ceux présentés par Aboussaid *et al.* (2009) et Rampersad and Ammons (2005).

Pour les vieilles cultures (24 heures ou plus), les spores sont libres après la lyse de la cellule. Dans ce sens, les travaux menés par Douey et Lugovaz (2003) ont démontré que les couches de *B. thuringiensis* produisent généralement des cristaux protéiniques soit sous forme de cristaux libres, soit sous forme de corps d'inclusion parasporal dans l'exosporium. En effet, simultanément à la sporulation, chaque bactérie produit un ou plusieurs cristaux protéiques composés d'une ou plusieurs delta-endotoxines, produits des gènes cry (Jaoua *et al.* 1996). Les inclusions parasporales différencient les bactéries appartenant à cette espèce et la distinguent des espèces apparentés (Gordon *et al.* 1973). Les résultats de notre étude ont confirmé la classification des 70 souches

de *B. thuringiensis* grace à des observations par le microscope à contrast de phase.

La mouche méditerranéenne de fruits *Ceratitis capitata* Wied (Diptère Tephritidae est le plus grand ennemi de l'arboriculture, On le "Signale presque dans tous les pays ayant un climat tempéré, grâce à sa grande polyphagie. Dans le monde, il attaque plus de 353 variétés de fruits cultivés ou sauvages (Liquido *et al.* 1991). Nos résultats ont montré que les taux de mortalité des larves de cératite sont doses dépendant, la dose la plus efficace était de 100mg. Ces résultats sont conformes avec ceux de Hassani and Gaouar (2008) qui ont testé des doses croissantes de *B. thuringiensis israelensis* sur le même genre d'insecte, *C. capitata*. Des résultats similaires ont été observés sur plusieurs larves des Diptères (Margalith and Ben-Dov 2000).

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail montre que parmi 70 souches de *B. thuringiensis*, 15 ont présenté une activité insecticide contre les larves de cératites dont 5 souches (Bt 15, Bt 16, Bt 2, Bt 9 et Bt 25) causent plus que 90% de mortalité chez les larves du parasite étudié. Ces résultats cocordent avec les résultats présentés par d'autres chercheurs pour plusieurs cas d'insectes. Les travaux menés par Reena *et al.* (2009) ont démontré que parmi 23 isolats de Bt, seulement un isolat, l'isolat 2 possède une activité larvicide élevée contre *Aedes aegypti* (Diptère). Alvarez *et al.* (2009) ont démontré que à partir de 14 isolats seulement 3 produisent des taux de mortalité entre 53 et 100. Patel *et al.* (2009) ont montré que l'isolat 4 possède un taux de mortalité élevé > 90 % parmi les 7 isolats qui sont toxiques aux larves de stade L2 de *Heliothis armígera* avec des taux moins importants. Nos résultats sont similaires à ceux présenté par Patel *et al.* (2009), ainsi les deux souches B15 et B16 causent des taux de mortalité égales à 95% tandis que les autres souches sont moins efficaces contre les larves de *Ceratitis capitata*.

La purification du mélange spore-cristal a entraîné une augmentation de l'efficacité des endotoxines de chaque souche de *B. thuringiensis* contre les larves de cératite. Aucune activité d'exotoxines n'a été observée chez toutes les souches étudiées. L'activité insecticide des souches de *B. thuringiensis* étudiées semble liée aux endotoxines. Cette étude a confirmé la possibilité de trouver des bio-insecticides naturels à base de Bt qui peuvent être toxiques contre les larves nuisibles pour les cultures des agrumes.

L'analyse du profil des protéines des souches de *B. thuringiensis* productrices d'activité bio-insecticide contre des larves de cératite sur gel SDS-PAGE révèle une diversité de ces souches. Des résultats similaires ont été décrits par Gough *et al.* (2005). Ces chercheurs ont montré une variabilité en se basant sur le profil protéique entre 16 isolats de *B. thuringiensis* efficaces contre *Lucilia cuprina*, et qui ont été isolées des échantillons du sol provenant de différentes régions australiennes. D'autres chercheurs ont utilisé l'analyse des profils protéiques pour déterminer les similarités entre les souches bactériennes (Costas, 1990; Costas, 1992). Patel *et al.* (2009) ont rapporté aussi que tous les isolats étudiés sont significativement différentes entre eux. De plus Alvarez *et al.* (2009) ont démontré que l'analyse des protéines totales des cellules sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a permis la différenciation des souches de *B. thuringiensis*.

Pour conclure, notre étude a permis l'isolement de 70 souches de *B. thuringiensis* vérifiées après observation macroscopique et microscopique. Parmi lesquelles, 15 souches ont présenté des activités bio-insecticides significatives contre des larves de *Ceratitis capitata*. Les souches (Bt 15, Bt 16, Bt 2, Bt 9 et Bt 25) ont présenté plus de 90% de mortalité des larves de cet insecte. Donc ces 5 souches présenteraient un intérêt biotechnologique important dans la lutte biologique contre la cératite, ravageur de plusieurs plantes en Tunisie.

## **Perspectives**

Dans la présente étude nous avons identifié des souches de *B. thuringiensis* productrices d'activités bio-insecticides contre des larves de cératite de fruit. Les résultats préliminaires sont encourageants et nous laissent penser à poursuivre ce travail par des études approfondies.

Il serait souhaitable de réaliser des tests avec ces souches sur d'autres types d'insectes pour étaler notre étude sur d'autres ravageurs des cultures ou vecteur de maladies. Pour valoriser les résultats de cette étude il serait intéressant de purifier et caractériser cette activité bio-insecticides des souches *B. thuringiensis* sélectionnées regardant leurs intérêts important dans la lutte biologique de cet insecte ravageur de plusieurs plantes en Tunisie.

Une caractérisation moléculaire de ces souches en effectuant des analyses comparatives des gènes cry à l'aide des techniques moléculaires est envisageable pour mieux comprendre les mécanismes d'action de ces souches et pour constituer des souches recombinantes de *B. thuringiensis* à effet multiples contre plusieurs larves d'insectes.

## **Références bibliographiques**



**Aboussaid, H., Elmassoussi, S. et Oufdou, K.** (2009). Activité insecticide d'une souche marocaine de *Bacillus thuringiensis* sur la mouche méditerranéenne: *Ceratitis capitata* (wied.) (Diptera: Tephritidae). *Afrique Sci.* **5**:160-172.

**Akiba, Y.** (1986). Microbiol ecology of *Bacillus thuringiensis*: VI. Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in the soil. *App. Entomol. Zool.* **21**: 76-80.

**Alvarez, A., Licia, M., Pera. Flavia, L., Eduardo, G., Virla. Mario, D., Baaigori** (2009). Insecticidal cristal proteins from native *Bacillus thuringiensis*: numerical analyses and biological activity against *Spodoptera frugiperda*. *Biotechnol. Lett.* **31**:77-82.

**Andrews, R. E., Jr., Faust, R. M., Wabiko, H., Raymond, K. C. and Bulla, L. A., Jr.** (1987). The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **6**: 163-232.

**Armengol, G., Escobar, M.C., Maldonado, M.E., Orduz, S.** (2007). Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *Appl. Microbio.* **102**: 77-88.

**Aronson, A. I., Beckman, W., and Dunn, P.** (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**: 1-24.

**Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B. E., Malvar, T. and Ferre, J.** (1999). Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2503-2507.

**Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinal, R., Manasherob, R., Khamaraev, A., Troitskaya, E., Dubitky, A., Berezina, N., Margalith, Y.** (1997). Extended screening by PCR for seven cry-groups genes from field-

collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4883-4890.

**Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H. G.** (1997) Nature isolates of *Bacillus thuringiensis*: World wide Distribution, Characterization, and Activity against Insect Pests. *J. invertebr. Pathol.* **70**: 59-68.

**Berrada, S., Fournier, D., Cuany, A. and Nguyen , T. X.** (1994). Identification of resistance mechanisms in a selected laboratory strain of *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae): altered acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Pest. Biochem. Physiol.* **48**: 41-47.

**Bietlot, H. P., Carey, P. R., Pozsgay, M. and Kaplan, H.** (1989). Isolation of carboxyl-terminal peptides from proteins by diagonal electrophoresis: Application to the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Anal. Biochem.* **181**: 212-215.

**Bobrowski, V. L., Pasquali, G., Bodanese-Zanettini, M. H., Pinto, L. M. N., Fiuza, L. M.** (2002). Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control.* **25**: 129-135.

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

**Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M.** (2005). *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use. 175-206. 175–206. *In* **L. I. Gilbert, S. S. Gill, and K. Latrou [eds.]**, Comprehensive Molecular Insect Science. Vol. **6**. Elsevier. Madrid, Spain.

**Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J. and Derbyshire, D. J.** (1999). N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is

recognized by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* **287**: 1101-1122

**Butko, P.** (2003). Cytolytic toxin *Cyt1A* and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2415-2422.

**Candas, M., Francis, B. R., Griko, N. B., Midboe, E. G., and Bulla, L. A. Jr.** (2002). Proteolytic cleavage of the developmentally important cadherin BT-R1 in the midgut epithelium of *Manduca sexta*. *Biochem.* **41**: 13717-13724.

**Cannon, R. J. C.** (1996). *Bacillus thuringiensis* use in agriculture : A molecular perspective. *Biol. Rev.* **71**: 561-636.

**Carey, J.R.** (1984). Host specify demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* Wied. *Ecol. Entomol.* **9** : 161-270.

**Carozzi, N.B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. and M. Koziel.** (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3057-3061.

**Cheikh, J. M., Howell J.F., Harris E.J., Ben Salah H. and Soria F.** (1975) Suppression of the Mediterranean fruit fly in Tunisia with released sterile insects. *J.Econ. Entomol.* **68**: 237-243.

**Chilcott, C. N., and Ellar, D. J.** (1988). Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2551-2558.

**Choma, C. T., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Pozsgay, M., Raynor, T., and Kaplan, H.** (1990). Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis* structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**: 523-527.

**Chrystenson L.D. and Foote R.D.** (1960). Biologie des mouches a fruits. *Rev. Ann.Entomol* . 171- 491.

- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Rie, J. V., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H.** (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.
- Cunningham, R. T.** (1989c). Control; insecticides; male annihilation. In: World crop pests 3(B). Fruit flies; their biology, natural enemies and control (Ed. By Robinson, A. S.; Hooper, G.), pp 345-351. Elseviers Amsterdam, Pays-Bas.
- Damgaard, P. H., Hansen, B. M., Pedersen, J. C., Filenberg, J.** (1997). Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *Appl. Microbio.* **82**: 253-258.
- De Barjac, H. and Bonnefoi, A.** (1968). A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.* **11**: 335-347.
- De Barjac, H.** (1978). Étude cytologique de l'action de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larves de moustiques. *Compt. R. de l'Acad Sci (Paris)*. **286** : 1629-1632.
- De Barjac, H. and Dedonder, R.** (1965). Isolement d'un nucléotide identifiable à la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *Berliner* \_ C.R. Acad. Sci. **260**: 750-7052.
- De Barjac, H., Thiery, I., Cosmao-Dumanoir, V., E., Laurent, P., Charles, J. F., Hamon, S. and Ofori, J.** (1988). Another *Bacillus sphaericus* serotype harboring strains very toxic to mosquito larvae :serotype H6. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **139**: 363-377.
- De Maagd, R. A., van der Klei, H., Bakker, P. L., Stiekema, W. J., and Bosch, D.** (1996). Different domains of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Appl. Enviro. Microbiol.* **62**: 2753-2757.

- De Respinis, S., Demarta, A., Patocchi, N., Luthy, P., Peduzzi, R. and Tonolla, M.** (2006). Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystem. *Lett. App. Microbiol.***43**: 495-501.
- Dean, D. H., Rajamohan, F., Lee, M. K., Wu, S. J., Chen, X. J., Alcantara, E., and Hussain, S. R.** (1996). Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis. *Minirev. Gen.* **179**: 111-117.
- Delassus M., Bricchet J., Balachowsky A. and Lepigne A.** (1931). Les ennemis des cultures fruitières en Algérie et les moyens pratiques de les combattre. Ed. Recher. Agro. Algérie. pp : 53 – 62.
- Delrio G.** (1985). Tephritid pests in citriculture. CEC/Proc. Experts meeting. Acireal; Balkema. Rotterdam. Integrated pest control in citrus. Ed. Recher. CAVALORO and DIMARTINO. pp: 135-149.
- Denholm, I., Pickett, J. A. and Devonshire, A. L.** (1997). Insecticide resistance: from mechanism to management. CAB! publishing, ISBN 0-85199-367-2, 121 p.
- Denovan, W. P., Donovan, J. C., Engleman, J. T.** (2001). Gene Knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *Invertebr. Pathol.* **78**: 45-51.
- Douey, D. and Aizawa, K.** (2003). Isolation et numération de *Bacillus cereus* dans les aliments. Direction Générale des produits de santé et des aliments. *Ottawa MFLP*. P13.
- Driouchi A.** (1990). Evaluation économique des pertes causées par la mouche méditerranéenne des fruits: Cas de l'économie agricole Tunisienne Rapport de mission d'un expert consultant AIEA/FAO. Division de l'assistance technique et de la coopération, 22p.

- Ejiofor, A. O., and Johnson, T.** (2002). Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *Indust. Microbiol. Biotech.* **28**: 284 – 290.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, G. J., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G.** (1996). Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activity against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 5389-5394.
- Eswarapriya, B., B.Gopalsamy, B. Kameswari, B., Meera, R., Devi P.** (2010). Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* IBT- 15Strain against *Plutella xylostella*. *Internat. Pharm.Tech. Research.* **2**: 2048-2053.
- Feitelson, J. S., Payne, J., and Kim, L.** (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technol.* **10**: 271-275.
- Ferre, J., and Van Rie, J.** (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 501-533.
- Ferre, J., Real, M. D., Ric, J. V., Jansens, S., and Peferoen, M.** (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **88**: 5119-5123.
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M. D., Tato, A. and Martinez, R.** (1999). Resistance to bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin in three strains of heliothis virescens: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **42**: 51-63.
- Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jorgensen, K. and Wilcks, A.** (2006). Occurrence of natural contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis* based insecticides on fresh fruit and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3435–3440.

- French-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A. and Antony, N.**(1998). Why are they so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* **353**: 1685-1693.
- Georghiou, G. P., and Wirth, M. C.** (1997). Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quiquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1095-1101.
- Gill, S. S, Cowles, E. A., and Pietrantonio, P. V.** (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Ent.* **37** : 615-636.
- Gill, S. S., Hornung, J. M.** (1987). Cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* proteins to insect and mammalian cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **50**: 16-25.
- Gilmore, J. E.** (1989). Control; sterile insect technique (SIT); overview. In: World crop pests 3 (B). Fruit flies; their biology, natural enemies and control (Ed. By Robinson, A. S., Hooper, G.), pp 353-363. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas.
- Glare, T. R., and O'Callaghan, M.** (2000). *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and safety. Wiley, Chichester. 311-316.
- Gordon, R. E., Hayens, W. C. et Pang, C. H. N.** (1973). The Genus *Bacillus* (Agricultural handbook no. 427). *Washington DC: U.S.Department of agriculture* .
- Gouch, J.M., Kemp, D.H., Akhurst, R. J., Pearson, R.D., Kongsuwan K.** (2005). Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *J. Invertebr. Pathol.* **90**:39-46.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J-L., Brousseau, R. and Cygler, M.** (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a)

insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**: 447-464.

**Guerchicoff, A., Delecluse, A., Rubinstein, C. P.** (2001). The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *App Environ. Microbiol.* **67**: 1090-1096.

**Guillet P.** (1997). La détection de la résistance aux insecticides chez les moustiques. *Actes des journées coton du CIRAD-CA*, 132-137.

**Gunning, R. V., Moores, G. D. and Devonshire, A. L.** (1999). Esterase's inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australien *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae). *Pest. Biochem. Physiol.* **63**: 50-62.

**Hassani, F. and Gaouar, B. N.** (2008). Application of *Bacillus thuringiensis* (*Bti*) struggling microbiological control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (wied) (Diptera: Tephritidae). *Sci.* **3**: 10-13.

**Head, D. J., Mccaffery, A. R and Callaghan, A.** (1998). Novel mutations in the parahomologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* **7**: 191-196.

**Heckel, D. J., Galan, L. J., Gould, F., Daly, J. c., and Trowell, S.** (1997). Genetics of Heliothis and Helicoverpa resistance to chemical insecticides and to *Bacillus thuringiensis*. *Pest. Sci.* **51**: 251-258.

**Heimpel, A. M.** (1967). A taxonomic Key proposed for the species of the « crystalliferous bacteria ». *J. Invertebr. Pathol.* **9**: 364-373.

**Heimpel, A. M. and Angus, T. A.** (1958). The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. *Can. J. Microbiol.* **4**: 531-541.



- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., and Kolsto, A. B.** (2000). *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis--one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2627-2630.
- Hofmann, C. and Lüthy, P.** (1986). Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. *Arch. Microbiol.* **146**: 7-11.
- Höfte, H. and Whiteley, H. R.** (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
- Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishmura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., Ohba, M.** (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh water of Japan. *Curr. Microbiol.* **40**: 212-217.
- Jaoua, S., Zouari, N., Tounsi, S., et Ellouz. R.** (1996). Study of particular delta-endotoxins produced by three recently isolated strains of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol.lett.* **145**: 349-354.
- Johnston, K. A., Lee, M. J., Brough, C., Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R. and Gatehouse, J. A.** (1995). Protease activities In the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 375-383.
- Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J.** (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **92**: 166-171.
- Jurat-Fuentes, J.-L. and Adang, M. J.** (2001). Importance of Cry1  $\delta$ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 323-329.
- Jurez-Perez, V. M. and Ferrandis, M. D.** (1997). PCR-Base approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2997-3002.

- Kamrin, M. A.** (1997). Pesticide profiles: toxicity, environmental impact and fate. *CRC. Boca Raton. FL*: 535-539.
- khyami-Horani, H., Hajaj, M., Charles, J.F.** (2003). Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. Jordanica (SerotypeH71), a novel serovarety isolated in Jordan. *Curr. Microbiol.* **47**: 26-31.
- Knowles, B. H., Blatt, M. R., Tester, M., Horsnell, J. M., Carroll , J., Menestrina, G. et Ellar, D. J.** (1989). A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation selective channels in planar lipid bilayers. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**:259-262.
- Knowles, B. H., White, P. J., Nicholls, C. N. and Ellar, D. J.** (1992). A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *Kyushuensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **248**: 1-7.
- Koni, P. A. and Ellar, D. J.** (1994). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic  $\delta$  -endotoxins. *Microbiol.* **140**:1869-1880.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacyeriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lambert, B. and Peferoen, M.** (1992). Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Biosci.* **42**: 112-122.
- Lecadet, M-M. and Dedonder, R.** (1967). Enzymatic hydrolysis of crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* I. Preparation and fractionation of the lysates. *J. Invertebr. Pathol.* **9**:310-321.
- Lecadet, M-M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thiery, I.** (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. appl. Microbiol.* **86**: 660-672.
- Lee, I. H., Je, Y. H., Chang, J. H., Roh, J. Y., Oh, H. W., Lee, S. G., Shin, S. C., and Boo, K. S.** (2001). Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*. *Curr. Microbiol.* **43**: 284-287.

- Lee, M. K., Young, B. A. and Dean, D. H.** (1995). Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 306-312.
- Lereclus, D., Delécluse, A., and Lecadet, M.-M.** (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. 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. pp. 37-69.
- Li, J., Carroll, J. and Ellar, D. J.** (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*.**353**:815-821.
- Li, J., Koni, P. K. and Ellar, D. J.** (1996). Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**: 129-152.
- Li, M. S., Je, Y. H., Lee, I. H., Chang, J. H., Roh, J. Y., Kim, H. S., Oh, H. W., and Boo, K. S.** (2002). Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new  $\delta$ -endotoxin gene. *Curr. Microbiol.* **45**: 299-302.
- Liquido N. J., Shinoda L. A., Cunningham R. T.** (1991). Host plant of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world rev. – USDA Misc. Publ. N° 77. 52 p.
- Loseva, O., Ibrahim, M., Candas, M., Koller, C. N., Bauer, L. S., and Bulla, L. A., Jr.** (2002). Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **32**: 567-577.
- Margalith, Y. and Ben-Dov, E.** (2000). Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In *Insect Pest Management, Techniques for Environmental Protection*. F. E. Rechcigl et N. A. Rechcgil (Ed.). CRC Press LLC. USA, 243-301.

- Masson, L., Tabashnik, B. E., Mazza, A., Prefontaine, G., Potvin, L., Brousseau, R. and Schwartz, J.-L.** (2002). Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 194-200.
- McGaughey, W. H.** (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Sci.* **229**: 193-195.
- Meadows, M.** (1993). *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessmen. pp. 193-220 In *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice ed. Entwistle, P. F., Corys, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S. Chichester: John Wiley and Sons Ltd.
- Meng, F., Shen, J., Zhou, W., and Cen, H.** (2004). Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Maneg. Sci.* **60**: 167-172.
- Milne, R., and Kaplan, H.** (1993). Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristonenra fumiferana*) responsible for the activation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**: 663-673.
- Moar, W. J., Trumble, J. T., Hice, R. H., and Backman, P. A.** (1994). Insecticidal activity of the CryIIA protein from NRD-12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* in a leaf-colonising strain of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 896-902.
- Moraga EQ. Trovar E. G., Garcia, P. V., and Alvarez, C. S.** (2004). Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soil in spain. *Microbial. Res.* **159**: 59-71.

- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Carriere, Y., et al.** (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA*. **100**: 5004-5009.
- Morris, P. M., Rosenfeld, A. et Bellinger, M.** (1993). What Americans think about agrichemicals. *Public Voice for Food and Health Policy, Washington, DC*.
- Morse, R. J., Yamamoto, T. and Stroud, R. M.** (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Struct. (Camb.)*. **9**:409-417.
- Nester, E. W., Thomashow, L. S., Metz, M., and Gordon, M.** (2002). 100 Years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. *American Acad. Microbiol.*
- Neuhoff, V., Arnold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant blue G-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Novillo, C., Castanera, P. and Ortego, F.** (1997). Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **36**: 181-201.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D. and McGaughey, W. H.** (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* **272**: 23473-23476.
- Oukil, S., Bues, R., Toubon, J. F., and Quilici S.** (2002) : Allozyme polymorphism in populations of *Ceratitis capitata* from Algeria, the north western Mediterranean coast and Reunion Island. *Fruit.* **57**: 183- 191.
- Pajncapel-Messai, J.** (1993). *Bacillus thuringiensis*, les insecticides font de la résistance. *Biofuture.* 33-38.

- Park, H. W., J. Y. Roh, Y. H. Je, B. R. Jin, H. W. Oh, H. Y. Park, and S. K. Kang.** (1998). Isolation of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain belonging to serotype H8a8b. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 62-66.
- Patel, H. K., Jani, J. J., Vyas, H. G.** (2009). Isolation and characterization of Lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis*. *Integrat. Biol.* **6**: 3-121.
- Plapp, F. W.** (1986). Genetics and biochemistry of insecticide resistance in Arthropods: prospects for the future. Pesticide Resistance: Strategies and tactics for management. *Natl. Acad. Pres., Washington, D.C.* 75-86.
- Praloran, G.** (1971). Les agrumes. Techniques agricoles et production tropicale. Ed. Maison neuve et Lanos, Paris. 556p.
- Prokopy R.J., Miller N.W., Duan J.J. and Vargas R.** (2000). Local enhancement of arrivals of *Ceratitis capitata* females on fruit mimics. *Entomol. Experiment. Appl.* **97**: 211–217.
- Promdonkoy, B., Ellar, D. J.** (2003). Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem.* **374**: 255-259.
- Quilici, S.** (1999). La mouche mediterraneenne des fruits ou ceratite *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), CIRAD.
- Rahardja, U. and Whalon, M. E.** (1995). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis CryIII A  $\delta$ -endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **88**: 21-26.
- Rajamohan, F., Hussain, S. R., Cotrill, J. A., Gould, F. and Dean, D. H.** (1996). Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb  $\delta$ -endotoxins suggest loop3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* **271**: 25220-25226.

**Rajamohan, F., Lee, M. K. and Dean, D. H. (1998).** *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog. Nucleic Acid Res. J. Mol. Biol.* **60**: 1-27.

**Ramachandran, S., Buntin, G. D., All, J. N., Tabashnik, B. E., Raymer P. L., Adang, M. J., Pulliam, D. A., and Stewart, C. N. (1998).** Survival development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.* **91**: 1239-1244.

**Rampersad, J. and Ammons, D. (2002).** Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *J. Inverteb. Pathol.* **79**: 203-204.

**Rampersad, J., and Ammons, D. (2005).** A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol.* 5-52.

**Reena, J., Sreeramanan, C. M. and Lee Y. W. and Xavier, R. (2009).** Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Guning Jerai forest (Malaysia) with insecticidal activity against lepidopteran and dipteran insects. *Internat. J. Engineering Technol.* **1**: 1793-8236.

**Rodrigo-Simo, A., de maagd, A., Avilla, C., Bakke, L., Molthoff, Gonzalez-Zamora, J. et Ferré, E. J. (2006).** Lack of Detrimental Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins on the Insect Predator *Chrysoperla carnea*: a Toxicological, *Histopathological, and Biochemical Analysis.* *Appl .Environ Microbio.***72**: 1595-1603.

**Rodriguez, M., Ortiz, E., Bisset, J. A., Hemingway, J. and Saledo, E. (1993).** Changes in malathion and pyrethroid resistance after cypermethrin selection of *Culex quinquefasciatus* field population of Cuba. *Med. Vet. Entomol.* **7**: 117-121.

- Roh, J. Yul, J. Y. Choi, M. S. Li, M.S., B. R. Jin, and Y. H. Je.** (2007). *Bacillus thuringiensis* as a Specific, safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 547-559.
- Roush, R. and Tabashnik, T.** (1990). Pesticide resistance in Arthropods. *Chapman and Hall, New York, and London*, 58-75.
- Ru, L., Wie, C., Zhao, J. Z. and Liu, A.** (1998). Differences in resistance to fenvalerate and cyhalothrin and inheritance of knockdown resistance to fenvalerate in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pest. Biochem. Physiol.* **61** : 79-85.
- Ruud, A., Bravo, A., and Crickmore N.** (2001). *How Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize insect world. *Trend in Genetic* vol. 17.N04. April2001.
- Sara, H. C., Andrew R., Bel, Y., et Ferré, J.** (2004). Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J. Invertebr. Pathol.* **88** : 8-16.
- Sayed, A. H., and Wright, D. J.** (2001). Cross-resistance and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth (*Plutella xylostella* L) from lowland Malaysia. *Pest Mgt. Sci.* **57**: 413-421.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Dean, D. H.** (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol.mol. Biol. Rev.* **62**: 775-806.
- Schwartz, J.-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R. and Masson, L.** (1997). Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**: 397-402.



- Sebesta, K., Farkas, J., Horska, K. V.** (1981). Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, in Burges, H. D., Microbiol control of pests and plant diseases, 1970-1980. Acad. New York. 249-281.
- Shelton, A. M., Sances, F. V., Hawley, J., Tang, J. D., Boune, M., Jungers, D., Collins, H. L. and Farias, J.** (2000). Assessment of insecticide resistance after the outbreak of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in California in 1997. *J. Econ. Entomol.* **93**:931-936.
- Smedley, D. P. and Ellar, D. J.** (1996). Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal, toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiol.* **142**:1617-1624.
- Soria F. (1962b)** - Plantes hôtes secondaires de *Ceratitis capitata* wied en Tunisie. *Ann.de l'INRAT.* **35**: 5 1-72.
- Stone, T. B., Sims, S. R., and marrone, P. G.** (1989). Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 228-234.
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N., and Johnson, M. W.** (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: *Plutellidae*). *J. Econ. Entomol.* **83**: 1671-1676.
- Tanaka, H., and Kimura, Y.** (1991). Resistance to Bt formulations in diamondback moth, *Plutella xylostella* L., on watercress. *Jap. J. App. Entomol. Zool.* **35**: 253-255.
- Toumanoff, C. et Corroller, L.E.** (1959). Study of crystallophorous strains of *Bacillus cereus* Frank and Frank pathogenic for lepidopterous larvae. *Ann. Institut. Pasteur (Paris)* **96**: 680-688.

- Traore, D.** (1997). La résistance des insectes aux pesticides: une réalité à prendre en compte dans la mise en place d'une lutte intégrée en culture cotonnière. *Publications scientifiques des chercheurs*, 241-251.
- Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF.** (1987) Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1263–1266.
- Uribe, D., Martinez, W., Ceron, J.** (2003). Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Invertebr. Pathol.* **82**: 119-127.
- Vassal, J. M.** (2004). *Bacillus thuringiensis*: mode d'action et résistance. *Atelier projet Gerico du 06 au 10 décembre 2004.*
- Vilas-Boas, G. T., Lemos, M. V. F.** (2004). Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from brazil. *Canadien J. Microbio.* **50**: 605-613.
- Wang, P., Zhao, J. Z., Rodrigo-Simon, A., Kain, W., Janmaat, A. F., Shelton, A. M., Ferre, J., and Myers, J.** (2007). Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1199-1207.
- Weathersbee III, A.A., Lapointe, S.L., Schatters, R. G.** (2006). Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates against *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist.* **89**: 441-448.
- West, A. W., Burges, H. D., Discon, T. J. and Wyborn, C. H.** (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spores inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Bilo. Biochem.* **17**: 657-665.
- Whalon, M. E. and McGauchey, W. H.** (1998). *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management. Insecticide with novel mode of action. Spring. Ver.106-137.

- White I.M. and Elson-Haris M.M.** (1992). Fruit Flies of Economic Significance: their identification and bionomics. *C.A.B. ACIAR*. pp : 12-601.
- Wirth, M. C. and Georghiou, G. P.** (1997). Cross-resistance among CryIV toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* **90**: 1471-1477.
- Wirth, M. C. Georghiou, G. P. and Federici, B. A.** (1997). CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **94**: 10536-10540.
- Young, J. M., Chicott, C. N., Broadwell, A., Wicley, P. J. and Lecadet M. M.** (1998). Identification of serovars of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 in New Zeland. *New Zeland J. Crop. Horticul. Sci.* **26**: 63-68.
- Zucoloto F. S.** (1993). Acceptability of different Brazilian fruits to *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae) and fly performance on each species. *Brazilian J. M Biol. Res.* **26**: 291-298.

## Table des matières

Introduction générale .....	1
Etude bibliographique.....	4
1. Les insectes ravageurs <i>Ceratitis capitata</i> .....	5
1.1. Cycle de développement de la cératite.....	5
1.1.1. <i>Ponte et incubation</i> .....	5
1.1.2. <i>Développement larvaire</i> .....	5
1.2. Les plantes hôtes et les dégâts de la Cératite.....	7
1.3. Méthodes de lutte.....	8
2. La Bactérie <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	10
2.1. Description.....	10
2.2. Cycle de croissance.....	11
2.3. Toxines de Bt.....	13
2.3.1. <i>Classification des delta-endotoxines de B thuringiensis</i> .....	13
2.3.2. <i>Structures des delta-endotoxines</i> .....	16
2.3.3. <i>Interprétation de la relation structure-fonction des protéines Cry</i> .....	18
2.4. Activation de la toxine.....	21
2.5. Mode d'action des delta-endotoxines de <i>B. thuringiensis</i> .....	23
2.5.1. <i>Mode d'action des toxines Cry</i> .....	23
2.5.2. <i>Mode d'action des toxines Cyt</i> .....	24
2.6. Autres facteurs pathogéniques de Bt.....	25
3. Résistance des insectes aux insecticides.....	26
4. Mécanismes de résistance .....	28
4.1. Modification du comportement.....	28
4.2. Modification de la cible .....	28
4.3. Métabolisation des produits dans l'organisme ou détoxification.....	28
Objectifs .....	30
Matériel & Méthodes.....	32
Matériel.....	33
1. Milieux de culture .....	33

2. Tampons .....	33
2.1. Tampon de l'extraction des suspensions spore-cristal .....	33
2.2. Tampons de gel SDS-PAGE .....	33
3. Colorants .....	34
4. Milieu d'élevage des larves de cératite .....	34
5. Matériel biologique .....	34
5.1. Souches bactériennes .....	35
5.2. Les larves .....	35
Méthodes .....	35
1. collection des échantillons .....	35
2. Isolement des souches de Bt .....	35
3. Identification des différents isolats par microscopie .....	36
3.1. Par microscope optique.....	36
3.1.1. Coloration Gram .....	36
3.1.2. Coloration différentielle des spores et des cristaux .....	37
3.1.3. Coloration avec le vert de malachite et le safranine .....	37
3.1.4. Coloration avec le bleu de Coomassie.....	38
3.2. Par microscope à contraste de phase .....	38
4. Activité insecticide de Bt .....	38
4.1. Effet de différentes souches de Bt sur des larves de cératites.....	38
4.1.1. Préparation des cultures des souches de Bt .....	38
4.1.2. Préparation du milieu d'élevage des larves de Cératite .....	39
4.1.3. Traitement des larves par les cultures des souches de Bt .....	39
4.2. Effet des suspensions spore-cristal purifiées des différentes souches de Bt sur des larves de cératites.....	40
4.2.1. Purification des suspensions des cristaux et des spores .....	40
4.2.2. Traitement des larves par le mélange spore-cristal .....	40
5. Profil protéique de différentes souches de <i>B. thuringiensis</i> .....	41
5.1. Extraction des protéines des différents isolats.....	41
5.2. Séparation des protéines su gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE....	41
Résultats.....	43

1. Isolement des souches de Bt .....	44
2. Identification de différents isolats par microscopie .....	45
3.1. Observation au microscope optique .....	45
2.1.1. Coloration Gram .....	45
2.1.2. Coloration différentielle des spores et des cristaux .....	45
3.1.2.1. Avec le vert de malachite et le safranine .....	45
3.1.2.2. Avec le bleu de Coomassie .....	46
3.2. Observation au microscope à contraste de phase .....	47
4. Test biologique .....	47
4.1. Activité insecticide de Bt Traitement des larves par les cultures sporulées des différentes souches de Bt .....	47
4.2. Activité insecticide de Bt Traitement des larves par le mélange spore-cristal .....	48
5. Vérification de la différence des isolats .....	50
Discussion et conclusions .....	52
Références bibliographiques .....	60

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 Cycle de développement de <i>C. capitata</i> .....	6
Figure 2 Piqûres de la Cératite sur des citrus Citron (a) et Orange (b).....	8
Figure 3 Fruits infestés par la Cératite Pêche (a) ; Poire (b) ; Orange(c).....	8
Figure 4 Schématisation du cycle vital d'un <i>B. thuringiensis</i> . .....	17
Figure 5 Les positions des bloques conservés parmi les protéines Cry. ....	19
Figure 6 structure 3D de Cry 3A (Li <i>et al.</i> 1991) .....	20
Figure 7 Structure de Cyt 2A (Li <i>et al.</i> 1991).....	20
Figure 8 les longueurs relatives de quatre classes des protoxines Cry et les positions des digestions par les proteases.....	22
Figure 9 Mode d'action des delta-endotoxines de <i>B. thuringiensis</i> .....	25
Figure 10 aspect macroscopique des colonies de <i>Bacillus thuringiensis</i> isolées.....	44
Figure 11 Observation microscopique (Gx100) A Souche 9 et B souche 48.....	46
Figure 12 Observation microscopique (Gx100) A souche 16 et B souche 9 .....	46
Figure 13 Observation au microscope Contraste de Phase (Gx100) .....	47
Figure 14 (A) effet des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur des larves de <i>C. capitata</i> .....	47
Figure 15 Effet des souches de <i>Bacillus thuringiensis</i> sur le taux de mortalité larvaire de <i>C. capitata</i> .....	48
Figure 16 Activité insecticide des différentes souches de <i>B. thuringiensis</i> .....	50
Figure 17 analyse des protéines des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. ....	51

## TABLEAU

Tableau : Effet des endotoxines des différentes souches de <i>B. thuringiensis</i> sur le taux de mortalité larvaire de <i>C. capitata</i> .....	49
--	----



## LISTE DES ABREVIATIONS

Bc : *Bacillus cereus*.

Beta-exotoxine :  $\beta$ -exotoxine.

Bt : *Bacillus thuringiensis*.

*Bti* : *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

*Btk* : *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*.

Cry : cristal.

Cyt : cytotoxique.

delta-endotoxine :  $\delta$ -endotoxine.

KDR: Knock Down Resistance.

*Plutella xylostella* : *P.xylostella*.

TCS : Trypto-Caseine de Soja.

Vip : Vegetative Insecticidal Proteins.

rpm : rotation par minute

mg : Milligramme

## **Isolement et identification des souches de *Bacillus thuringiensis* à activité bio-insecticide contre *Ceratitis capitata***

### **Résumé :**

Le présent travail consiste à étudier l'effet des toxines (delta-endotoxine) extraites à partir des souches de *Bacillus thuringiensis* sur la mouche *Ceratitis capitata*, ravageur des agrumes et des arbres fruitier. Les souches de *B. thuringiensis* ont été isolées de la boue provenant de Sebkhath Séjoui. Parmi les 70 isolats testés, 15 ont révélé une activité insecticide significative dans lesquelles 5 souches présentent des taux de mortalités  $\geq 90\%$ . Ces taux de mortalités sont causés par les endotoxines de *B. thuringiensis*. L'analyse des profils protéiques de différentes souches de *B. thuringiensis* sélectionnées a révélé une variabilité entre elles. Cette variabilité peut expliquer la différence d'activité bio-insecticide observée chez les souches testées. Les résultats préliminaires encourageant de cette étude nous nous laissent penser à caractériser l'activité insecticide produite par des souches de *B. thuringiensis* pour une application à grande échelle.

**Mots clés :** *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticide, endotoxines, *Ceratitis capitata*

## **Isolation and identification of some *Bacillus thuringiensis* strains with insecticidal activity against *Ceratitis capitata***

### **Abstract:**

The aims of the present work is to study the effect of toxins (delta-endotoxins), extracted from different strains of *Bacillus thuringiensis* on *Ceratitis capitata*, a devastating of citrus and fruit trees. Strains of *B. thuringiensis* were isolated from the mud of Sebket Sejoui. Among 70 isolates tested, 15 showed a significant insecticidal activity in which 5 isolates led to mortality rates  $\geq 90\%$ . These mortality rates are caused by endotoxins of *B. thuringiensis*. Analysis of proteins profiles of different isolates of *B. thuringiensis* revealed variability between them. The preliminary results of this study encourage us towards the characterization of the insecticidal activity produced by *B. thuringiensis* strains for large scale application.

**Key words:** Bioinsecticide, *Bacillus thuringiensis*, *Ceratitis capitata*, endotoxins.