

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de BLIDA -1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du Diplôme de Master 2 en Biotechnologie
Option : Biotechnologie Microbienne

**Applications biotechnologiques de *Bacillus thuringiensis* en
agroécologie**

Réalisé par :

BOUROUBA Yasmine Ferial

KARA Fatima Zohra

Soutenu le : 12 /07/2021

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme SABRI K.	MAA	univ Blida 1
Examinatrice :	Mme BENSALID F.	MAA	univ Blida 1
Promoteur :	Mr BENCHABANE M.	Professeur	univ Blida 1
Co – promotrice:	Dr Mekhaldi D.	MAB	univ Blida 1

Année Universitaire : 2020 / 2021

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH, le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir guidés et donné la force et la volonté pour atteindre notre objectif.

Nous remercions profondément notre promoteur

BENCHABANE MESSAOUD

Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida -1- pour sa disponibilité, ses précieux conseils et motivations qui nous ont gardés sur le droit chemin, et mis à notre disposition sa compétence et ses conseils constructifs afin de réaliser ce modeste travail.

Nous tenons également à remercier notre Co-promotrice docteur **MEKHALDI DALAL**.

Nos remerciements sont aussi adressés au président et aux membres du jury, qui nous honorent par leur présence.

Nous sommes très honorées par la présence de **Mme SABRI K**, maitre assistante A à l'université de BLIDA -1-, pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de notre mémoire, qu'elle trouve ici nos vifs remerciements.

Nos remerciements sont aussi adressés à **Mme BENSALIM F**, maitre assistante A à l'université de BLIDA -1-, qui nous a fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail et qu'elle accepte ici nos sentiments de gratitude.

On adresse nos plus sincères remerciements à nos familles, nos proches et amis, qui nous ont accompagnés, aidés, soutenus et encouragés tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Enfin, nous tenons à exprimer notre reconnaissance et nos respects à tous les enseignants du département biotechnologie, qui ont contribué à notre formation.

Dédicace

À mon père, à qui je dois tout, en témoignage de l'effort qu'il a déployé pour mes études, pour sa foi inébranlable dans ma réussite. Que dieu te préserve en bonne santé et te prête longue vie afin que je puisse à mon tour te combler.

À ma mère, les mots sont incapables de traduire toute ma reconnaissance et tout mon amour. À celle qui a sacrifié toute sa vie pour nous. Que tu veuilles bien accepter ce modeste travail comme témoignage de ma profonde gratitude et affection. Puisse dieu te garder en bonne santé et te procurer longue vie.

À mon frère Nassim, mes sœurs Sihem et Meriem et son époux Rabeih, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études puisse ils trouver l'expression de mes sentiments les sincères.

À mes chers neveux Yanis et Nassim, mes anges et ma source de bonheur, que dieu vous bénisse et vous protège.

À l'âme de ma grande-mère, que dieu te garde dans son vaste paradis.

À tous mes amis Chaouki, Yasmine, Khadidja, Chaima pour leur soutien incessant, conseils, aides et encouragements.

Je dédie ce mémoire.

Fatima.

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que je dédie cette thèse de master a :

*Ma source de bonheur et d'encouragement, d'Amour et de tendresse, à ma chère **MAMAN**, tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leur étude, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation de long de ces années, Que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.*

*Mon **Père**, ma source de joie et de bonheur, la personne la plus digne de mon estime et de mon respect, qui ne cesse constamment de m'enrichir de son expérience et de me prodiguer ses conseils. Que dieu te garde toujours à côté de moi.*

*Mes chères sœurs **MOUNIRA**, **SARAH** et son époux **NOUREL ISLEM**, mon petit ange **MOHAMED HAITHEM**, ma chère cousine ma troisième sœur **AMIRA**, que dieu les laissent pour moi.*

*A mon fiancé **SEIF EDDINE** l'homme de ma vie, et toutes ma belle-famille **SEDDIK**,*

*A Ma chère binôme **FATIMA ZOHRÀ** qui a partagé avec moi le chemin du savoir, et pour sa compréhension et sa patience.*

*Mes meilleures amis **NOUSAIBA** et **LINDA**, et mes collègue **CHAOUKI**, **KHADIDJA**, **AMIRA**, et a toute la section de biotechnologies microbiennes.*

A tous mes enseignants tout au long de mes études.

*MERCI à vous... ! **Yasmine.***

Résumé

Applications biotechnologiques de *Bacillus thuringiensis* en agroécologie

L'utilisation abusive des produits chimiques, des pesticides et des fertilisants pour améliorer la productivité agricole, provoque de sérieux problèmes et des risques pour l'environnement et la santé humaine. La biotechnologie microbienne a orienté de nombreuses approches et techniques comme alternative potentielle pour réduire les méfaits de ces produits chimiques, L'une de ces stratégies est l'utilisation de souches bactérienne comme bioinsecticide pour le contrôle des insectes. L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence l'intérêt biotechnologique de *Bacillus thuringiensis* en agriculture, et analyser leurs gènes impliqués dans la virulence pour certains ravageurs de plantes. Dans ce mémoire, nous avons signalé le potentiel biotechnologique microbien dans le domaine agricole, les protéines bioinsecticides, telles que les cristallines (*cry*), cytolytiques (*cyt*) et les protéines végétatives insecticides (*Vip*) de différentes souches de *Bacillus thuringiensis*, ainsi que leurs mécanismes d'action et leurs cas d'applications. Nous avons également analysé *in silico* deux gènes de la famille des δ -endotoxines (*cyt1Aa*, *cry4Ba*) afin de déterminer leurs effets synergétiques fonctionnels. Les principaux résultats acquis confirment que le *Bacillus thuringiensis* est l'exemple le plus courant d'une bactérie pathogène aux insectes qui porte des métabolites secondaires impliquées dans la lutte biologique.

Mots clés : biotechnologie, *Bacillus thuringiensis*, agroécologie, bioinsecticides, gènes (*Vip*, *Cry*, *Cyt*), *in silico*.

Abstract

Biotechnological applications of *Bacillus thuringiensis* in agroecology

The misuse of chemicals, pesticides and fertilizers to improve agricultural productivity causes serious problems and risks for the environment and human health. Microbial biotechnology has guided many approaches and techniques as a potential alternative to reduce the harms of these chemicals. One of these strategies is the use of bacterial strains as a bioinsecticide for insect control. The objective of the present study is to demonstrate the biotechnological interest of *Bacillus thuringiensis* in agriculture, and to analyze their genes involved in virulence plant pests. In this thesis, we have reported the biotechnological microbial potential in the agricultural field, bioinsecticidal proteins, such as crystallins (*cry*), cytolytics (*cyt*) and vegetative insecticidal proteins (*Vip*) of different strains of *Bacillus thuringiensis*, as well as their mechanisms of action and their application cases. We also analyzed *in silico* two genes of the δ -endotoxin family (*cyt1Aa*, *cry4Ba*) in order to determine their functional synergistic effects. The main results obtained confirm that *Bacillus thuringiensis* is the most common example of a bacterium pathogenic to insects, which carries secondary metabolites involved in biological control.

Key words: biotechnology, *Bacillus thuringiensis*, agroecology, bioinsecticides (*Vip*, *Cry*, *Cyt*), *in silico*.

ملخص

تطبيقات التكنولوجيا الحيوية للبكتيريا *Bacillus thuringiensis* في الزراعة الإيكولوجية

استخدام المواد الكيميائية والمبيدات والأسمدة لتحسين الإنتاجية الزراعية، يتسبب في مشاكل خطيرة على البيئة وصحة الإنسان، وقد وجهت البيو تكنولوجيا الميكروبية العديد من الأساليب والتقنيات كبديل محتمل للحد من أضرار هذه المواد الكيميائية، وإحدى هذه الاستراتيجيات هي استخدام السلالات البكتيرية كمبيد حشري بيولوجي لمكافحة الحشرات.

الهدف من هذه الدراسة، هو تسليط الضوء على الأهمية البيو تكنولوجيا للبكتيريا *Bacillus thuringiensis*، في مجال الزراعة، وتحليل جيناتها المسؤولة عن الخاصية الممرضة لبعض الآفات النباتية.

في هذه المذكرة، قمنا بالإبلاغ عن الإمكانيات التكنولوجية الحيوية للبكتيريا في المجال الزراعي، وأيضا المبيدات الحشرية الحيوية التي تحتوي على البروتينات الطبيعية مثل (cyt)، (cry) و (vip) لسلالات مختلفة للبكتيريا *Bacillus thuringiensis*، بالإضافة إلى آليات عملها وحالات تطبيقها .

قمنا أيضًا بتحليل *in silico* لجينات من عائلة δ -endotoxine، مثل *cyt1Aa* و *cry4Ba* من أجل تحديد تأثيرهما المتحد الوظيفي. تؤكد النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها أن *Bacillus thuringiensis* هو المثال الأكثر شيوعًا لبكتيريا مسببة لأمراض الحشرات التي تحمل مستقبلات ثانوية تشارك في مكافحة البيولوجية، والتي أثناء اتحادها تكثف السمية.

الكلمات المفتاحية: البيو تكنولوجيا الميكروبية، *Bacillus thuringiensis*، الإيكولوجيا الزراعية، المبيدات الحشرية الحيوية، *Vip*، *Cry*، *Cyt*، الآفات النباتية، *in silico*

Liste des abréviations

3D :	Tri-Dimensionnelle.
ADN :	Acide Désoxyribonucléique.
ADNr :	Acide Désoxyribonucléique Recombinant.
ADP:	Adénosine Diphosphate.
ALP:	Phosphatases Alcalines.
ALS:	Arysta Life Science.
APN:	N-Aminopeptidases.
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool.
<i>Bt:</i>	<i>Bacillus thuringiensis.</i>
<i>Bti:</i>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis.</i>
<i>Btk:</i>	<i>Bacillus thuringiensis ssp. Kurstaki.</i>
CAGR :	Taux De Croissance Annuel Composé.
Cp :	Protéines Cristallisées.
Cry :	crystalline.
Cyt:	cytolytique.
dbGaP:	Database Of Genotypes And Phenotypes.
dbSNP:	Database Of Single Nucleotide Polymorphism Database.
dbVar:	Database Of Human Genomic Structural Variation.
EBI :	Institut Européen de Bio-informatique.
EPA:	Environmental Protection Agency.
FASTA:	Fast Adaptive Sharinkage Thresholding Algorithm.
GC:	Guanine-Cytosine.
GEO:	Gene Expression Omnibus.

GIA Global Industry Analysts.

GM : Génétiquement Modifiée.

GPI : Glycosylphosphatidylinositol.

GPI: Glicosyl Phosphatidil Inositol

ICP: Insecticidal Crystal Proteins.

INSDC: International Nucleotide Sequence Database Collaboration

Kb: Kilobase.

KDa: Kilo Dalton.

Kg: Kilogramme.

Mb : Millions De Paires De Bases.

ME : Minimum Evolution

Mg : milligramme.

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NJ: Neighbor joining

NLM: National Library of Medicine

OCDE : Organisation De Coopération Et De Développement Economiques.

OTH : Unité Taxonomique Hypothétique

OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDB: Protein Data Bank

PGPB: Plant Growth-Promoting Bacteria.

PH : Potentiel Hydrogène.

PIR : Protein Information Resource

RFLP : Polymorphisme De Longueur Des Fragments De Restriction.

RMN : Spectroscopie Par Résonance Magnétique Nucléaire

SIB: Swiss Institute of Bioinformatics

SRA: Sequence Read Archive.

ssp : Sous-espèce.

SSR : Répétitions De Séquences Simples.

TCAC : Taux De Croissance Annuel Composé.

TE : Eléments Transposables.

Uniprot : Universal Protein Resource.

USD : United States dollar.

USDA : Département de l'Agriculture des États-Unis.

Vip : Vegetative Insecticidal Proteins.

Liste des figures

Figure 1. Histoire du développement de la biotechnologie.....	4
Figure 2. Les opportunités attractives sur le marché des biopesticides.....	7
Figure 3. Micrographie électronique à transmission d'une cellule sporulée de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> souche C18 (x 44 000).....	11
Figure 4. Schéma de la sporulation chez <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
Figure 5. Structure des protéines Cry à trois domaines.....	17
Figure 6. Mécanisme de la toxicité des protéines Cry	20
Figure 7. Structure tridimensionnelle de la toxine <i>Cyt1Aa</i> complète (gauche), de la partie C-terminale (centre) et N-terminale (droite)	21
Figure 8. Modèle de l'oligomère de <i>Vip1Ac</i> de <i>B. thuringiensis</i> intégré dans la membrane cellulaire de l'insecte cible et formant un canal ionique qui permettrait la translocation de <i>Vip2Ac</i>	24
Figure 9. Modèle proposé du mode d'action des protéines binaires <i>Vip1</i> , <i>Vip2</i>	24
Figure 10. Schéma représentatif de la structure des protéines <i>Vip3</i>	25
Figure 11. Mécanisme insecticide des protéines <i>Vip3A</i> par la formation de pores et l'apoptose	27
Figure 12. Liste des cultures Bt approuvées pour la libération).....	29
Figure 13. Résultat de la recherche du gène <i>Cyt1Aa</i>	43
Figure 14. Représentation graphique de la séquence du gène <i>Cyt1Aa</i>	43
Figure 15. Format FASTA du gène <i>Cyt1Aa</i> chez <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>	43
Figure 16. Arbre phylogénétique global du gène (<i>Cyt1Aa</i>) qui code pour la virulence chez <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i> , l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.	45
Figure 17. Arbre phylogénétique (E-value ~ 0) du gène (<i>Cyt1Aa</i>) qui code pour la virulence chez <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i> , l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.....	45
Figure 18. Résultats de recherche de la structure protéiques 3D (<i>Cyt1Aa</i>) sur le portail PDB.....	46
Figure 19. Structure 3D de la protéine cristalline <i>Cyt1Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis ssp Israelensis</i> . ..	47

Figure 20. Résultat de la recherche du gène <i>Cry4Ba</i>	48
Figure 21. Représentation graphique de la séquence du gène <i>Cry4Ba</i>	48
Figure 22. Format FASTA du gène <i>Cry4BA</i> chez <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>	49
Figure 23. Arbre phylogénétique global du gène (<i>Cry4Ba</i>) qui code pour la virulence chez <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i> , l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.	51
Figure 24. Arbre phylogénétique (E-value ~ 0) du gène (<i>Cry4Ba</i>) qui code pour la virulence chez <i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i> , l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.....	51
Figure 25. Résultats de recherche de la structure protéiques 3D (<i>Cry4Ba</i>) sur le portail PDB.	52
Figure 26. Structure 3D de la protéine cristalline <i>Cry4Ba</i> de <i>Bacillus thuringiensis ssp Israelensis</i>	53

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature et schéma de classification des gènes <i>cry</i> en fonction de la gamme d'hôtes	15
Tableau 2. Enregistrement de travaux de <i>Bacillus thuringiensis</i> aux différentes bases de données.....	42
Tableau 3. Liste des séquences d'alignement significatif (<i>Cyt1Aa</i>).....	44
Tableau 4. Liste des séquences d'alignement significatif (<i>Cry4Ba</i>).	50

Table Des Matières

Introduction

PARTIE I Synthèse Bibliographique

1 Applications microbiennes en biotechnologies	3
1.1 Généralités sur les biotechnologies	3
1.2 Biotechnologies agricoles	4
1.2.1 Microorganismes et biotechnologies agricoles	5
1.2.1.1 Biofertilisants	5
1.2.1.2 Biopesticides	6
1.2.1.2.1 Marché des biopesticides	7
1.2.1.2.2 Réglementation Des Biopesticides	8
2 Bacillus thuringiensis en agroécologie	8
2.1 Caractéristiques générales de Bacillus thuringiensis	8
2.1.1 Paramètres de croissance	9
2.1.2 Cycle De Vie	10
2.1.3- Milieux de vie	11
2.2 Caractéristiques génétiques	12
2.3 Métabolites d'intérêt biotechnologiques chez Bacillus thuringiensis	13
2.3.1 Les protéines cristalline (Cry)	14
2.3.1.1 Structure Des Protéines (Cry)	15
2.3.1.2 Mode d'action des protéines (Cry)	17
2.3.2 Protéines cytolytique (Cyt)	20
2.3.2.1 Mode d'action des toxines cytolytique	21
2.3.3 Les protéines végétatives insecticides (Vips)	22
2.3.3.1 Les protéines Vip 1	22
2.3.3.2 Les protéines Vip2	22
2.3.3.3 Mode d'action des Vip1-Vip2	23
2.3.3.4 Les protéines Vip3	25
2.3.3.5 Mode d'action des Vip3	26
2.4 - Applications biotechnologiques de Bacillus thuringiensis	27
2.4.1 Les Plantes transgéniques expriment des gènes de Bacillus thuringiensis	28
2.4.1.1 Le maïs Bt	29
2.4.1.2 Le coton Bt	30

2.4.2 Les Bio Insecticides A Base De <i>Bacillus thuringiensis</i> :	31
2.4.3 Microorganismes recombinants expriment des gènes <i>Bacillus thuringiensis</i>	33

PARTIE II Matériels Et Méthode

1 Banques de données	35
1.1 National Center for Biotechnology Information (NCBI)	35
1.2 PDB (protein Data Bank)	35
1.3 Universal Protein Resource (UniProt)	35
2 <i>Bacillus thuringiensis</i> et les gènes de virulence aux insectes	36
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
2.2 Les gènes de virulence	36
3 Analyse <i>in silico</i>	36
3.1 Exécution FASTA	36
3.2 Exécution BLASTn	37
3.3 Construction de l'arbre phylogénétique	38
3.3.1 Arbre phylogénétique	39
3.3.2 La méthode de Neighbor-joining (NJ)	39
3.3.3 La méthode minimum évolution	39
3.4 Déterminations de la structure 3D	39

Partie III Résultats Et Discussion

1 Résultats	41
1.1 Travaux de recherche sur <i>Bacillus thuringiensis</i>	41
1.2 Gène <i>CytIAa</i>	41
1.3 Gene <i>Cry4Ba</i>	47
2 Discussion	54
Conclusion et perspectives	57

Références bibliographiques

Introduction

L'amélioration des productions végétales, et la protection des forêts et des cultures, a exigé l'utilisation abusive de pesticides chimiques et des fertilisants. Ces intrants chimiques, ont provoqué de sérieux problèmes sur la biodiversité agricole, la santé humaine, l'environnement ainsi que le développement de la résistance chez les agents pathogènes (insectes, nématodes, champignons, bactéries) (Bhardwaj *et al.*, 2014).

La lutte biologique à base d'organismes microbiens est donc considérée comme une alternative ou un moyen complémentaire pour diminuer l'utilisation des pesticides chimiques en agriculture (Singh *et al.*, 2011). En 2000, le marché global des biopesticides ne représentait que 0.25 % du total des pesticides, ce marché doit attendre plus de 10%. La popularité croissante des agents de lutte biologique réside dans leur effet létal beaucoup plus sélectif comparé aux produits chimiques synthétiques et également en raison du développement rapide de la résistance des insectes ravageurs aux insecticides synthétiques (Stevens *et al.*, 2011).

Bacillus thuringiensis, peut constituer un traitement privilégié pour lutter contre un large éventail d'insectes ravageurs des forêts et des cultures appartenant aux ordres des coléoptères, diptères et lépidoptères et pour certaines espèces non-insectes tels que les nématodes et les pucerons, grâce à une inclusion cristalline composée de protéines insecticides (Schnepf *et al.*, 1998). Ces protéines sont synthétisées pendant la phase stationnaire, en même temps que la sporulation, elles s'accumulent dans la cellule mère pour former un cristal, également appelé corps parasporal. Ils sont aussi une importante source de gènes pour l'expression transgénique afin de transférer aux plantes la résistance aux ravageurs (Bravo *et al.*, 2011). Grâce à des avancées biotechnologiques moléculaires et de génie génétique (Jouzani *et al.*, 2017). Plus de 200 biopesticides à base de *B.thuringiensis* représentent 53 % du marché mondial des biopesticides commercialisés, générant des revenus annuels de 120 à 140 millions de dollars (van Lenteren, 2000). La plupart des produits commerciaux de *B.thuringiensis* sont basés sur des préparations de spores-cristaux obtenus à partir d'un petit nombre de souches de type sauvage tels que (Soberon *et al.*, 2009) :

–*B.thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) HD1 qui exprime les protéines *CryIAa*, *CryIAb*, *CryIAc*, *Cry2Aa* et *Cry2Ab* ou HD73 qui produit *CryIAc* et qui sont efficaces pour contrôler de nombreux lépidoptères, ennemis des cultures ou défoliants ravageurs forestiers.

– *B.thuringiensis israelensis* contenant *Cry4A*, *Cry4B*, *Cry11A* et *Cyt1Aa*, qui est utilisé pour le contrôle de larves des diptères qui se nourrissent de graines de blé et qui sont nuisibles à l'agriculture.

L'objet de ce travail consiste à réaliser en premier lieu une recherche bibliographique sur l'importance des applications de *Bacillus thuringiensis* et ses métabolites en agroécologie, En seconde partie l'intérêt est focalisé sur une analyse *in silico* des gènes de virulence *Cyt1Aa*, *Cry4Ba* chez *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*. Cette étude a été réalisée en ligne sur la base de données informatisée NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) , suivie d'une détermination des structures tridimensionnelle 3D de protéines à partir des banques de données : PDB (protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>) et Uniprot (Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org>) .

PARTIE I

Synthèse Bibliographique

1 Applications microbiennes en biotechnologies

1.1 Généralités sur les biotechnologies

Le terme « biotechnologie » remonte à 1919, date à laquelle il a été inventé pour la première fois par l'ingénieur hongrois Karl Ereky. D'où le nom consistant en une combinaison des mots grecs : bios – vie ; techno technique ; et logos – étude. Depuis lors, la définition la plus largement acceptée a été donnée par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) en 1981 (Verma, 2011).

Le mot « biotechnologie » a acquis une importance et une signification énorme au cours des deux dernières décennies, ce qui est tout simplement sans précédent. La probabilité et les possibilités derrière ce type d'attention envers la biotechnologie peuvent être dues à son potentiel illimité de servir et de profiter à l'humanité. Jusqu'à présent, la biotechnologie a touché nos vies et notre environnement (Verma, 2011).

L'OCDE définit la biotechnologie comme « l'application de principes scientifiques et techniques au traitement de matériaux par des agents biologiques pour fournir des biens et des services ; la nouvelle biotechnologie implique l'utilisation de processus cellulaires et moléculaires pour résoudre des problèmes ou fabriquer des produits » (Amarakoon *et al.*, 2017).

L'utilisation de processus, d'organismes ou de systèmes biologiques pour produire des produits qui devraient améliorer la vie humaine est appelée biotechnologie. En gros, cela peut être défini comme l'ingénierie des organismes à des fins d'utilisation humaine. Il peut également être défini comme l'ensemble des compétences requises pour l'utilisation des systèmes vivants ou l'influence des processus naturels afin de produire des produits, des systèmes ou des environnements favorisant le développement humain (Bhatia, 2018).

Certaines découvertes importantes liées à la biotechnologie ont été présentées à la **(Figure1)**, il apparaît que les biotechnologies ont influencé l'avancée et le développement de divers disciplines scientifiques, tel que la génétique, la biologie moléculaire et le génie génétique, ainsi il y a une nette amélioration dans les techniques de biologie moléculaire tel que le clonage, la transgénèse, production des vaccins et antibiotiques, détermination des structures d'ADN.

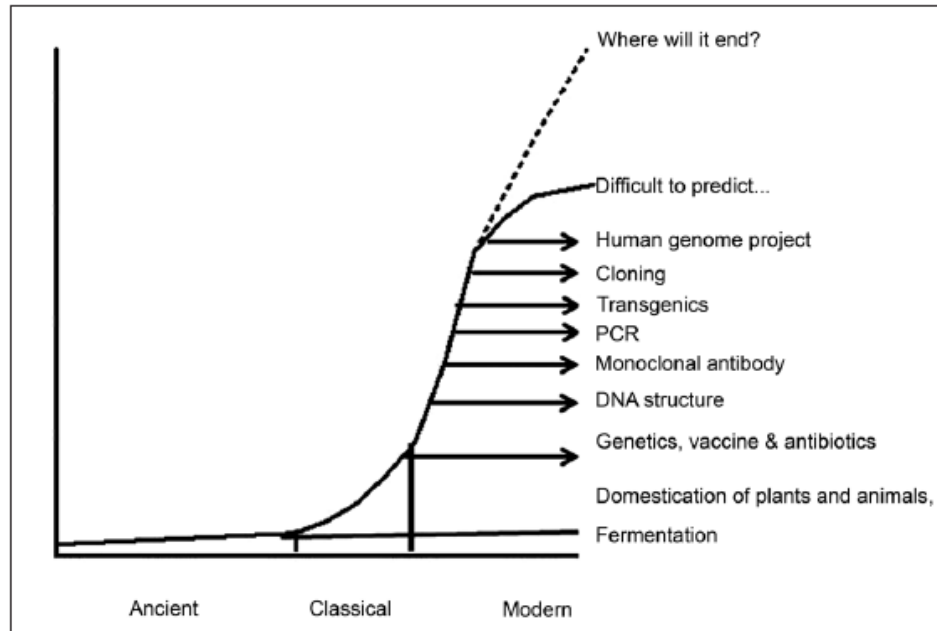


Figure 1. Histoire du développement de la biotechnologie (Verma, 2011).

1.2 Biotechnologies agricoles

La biotechnologie agricole, appelées également végétales, permettent d'ouvrir des pistes pour relever les défis posés à l'agriculture : assurer la production alimentaire et énergétique tout en préservant l'environnement. L'évolution de la réglementation et l'émergence de nouvelles attentes sociétales ont incité les agriculteurs à faire évoluer leurs pratiques vers une production toujours plus durable, au service des populations, de l'environnement et des territoires (Gerbore, 2020).

A l'aide des avancées en génomique, en protéomique, et en génie génétique, il est désormais possible de produire des plantes transgéniques avec des gènes souhaitables tels que la résistance aux herbicides, la résistance aux maladies, une durée de conservation accrue, etc. Des techniques telles que la sélection moléculaire a été utilisées pour accélérer le processus d'amélioration des cultures. Par exemple, les marqueurs moléculaires, tels que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), et les répétitions de séquences simples (SSR) fournissent des outils potentiels pour la sélection indirecte des caractères qualitatifs et quantitatifs, ainsi que pour l'étude de la diversité génotypique (Bhatia, 2018).

L'introduction d'ADN étranger peut aussi améliorer la teneur en protéines de certains aliments, considération importante pour les pays en développement, non seulement pour l'alimentation humaine mais aussi pour l'alimentation animale. Les chercheurs s'attachent par ailleurs à améliorer les qualités nutritives d'amidons et d'huiles alimentaires, Ainsi que la lutte

contre les parasites par la voie biologique, technique utilisée en Asie depuis plusieurs millénaires. Cette lutte a accompli de grands progrès depuis l'importation, à la fin des années 70, de *Bacillus thuringiensis* de la Chine aux États-Unis. *Bacillus thuringiensis* est non seulement modifié pour être introduit dans de nombreuses plantes, y compris les céréales, mais est aussi fabriqué par des techniques de recombinaison aux fins d'utilisation comme produit à vaporiser (Sasson, 1988).

1.2.1 Microorganismes et biotechnologies agricoles

Les micro-organismes sont le groupe de minuscules organismes présents partout dans l'air, sol et dans l'eau. Les microbes sont exploités dans le processus de biotechnologie connu sous le nom de biotechnologie microbienne, qui est un domaine important qui favorise les progrès en matière de sécurité alimentaire, de produits à valeur ajoutée, de nutrition humaine et d'aliments fonctionnels, de protection des végétaux et d'animaux et de la recherche fondamentale en général (Kumari, 2018).

Le but de la biotechnologie est de développer des inoculant microbiens pour améliorer la croissance des plantes et supprimer leurs maladies avec un objectif clé de réduire la dépendance aux engrais chimiques et aux pesticides (Adesemoye *et al.*, 2009).

La croissance et la productivité des plantes sont principalement influencées par les microbes et les interactions plantes-racines (Kumari, 2018). La rhizosphère de la plante héberge des micro-organismes qui peuvent avoir un effet positif, négatif ou aucun effet visible sur la croissance de la plante (Berg, 2009). Bien que la plupart des microbes rhizosphériques soient nocifs et inhibent la croissance des plantes et des racines (Pereg et McMillan, 2015), les microbes peuvent être utilisés pour l'agriculture durable sans nuire à l'environnement. Ces micro-organismes sont utilisés comme étant des biofertilisants, des biopesticides, des biostimulants, et autres effets phyto-bénéfiques.

1.2.1.1 Biofertilisants

Les biofertilisants sont définis comme des préparations contenant des cellules vivantes ou des cellules latentes, de souches de micro-organismes efficaces à la croissance végétale. Ils interagissent avec les systèmes racinaires des plantes en leur procurant une meilleure absorption des éléments minéraux dans la rhizosphère lorsqu'ils sont appliqués sur les semences ou dans le sol. Ils accélèrent certains processus microbiens dans le sol impliqués dans l'augmentation de la disponibilité des nutriments, en des formes facilement assimilables par les plantes (Vessey, 2003). Ainsi Ils jouent un rôle très important dans l'amélioration de la fertilité du sol, en fixant l'azote atmosphérique et produisent également des substances de croissance des plantes dans le sol. Ils

favorisent la croissance des racines en produisant des hormones et des antimétabolites. Ils aident à la minéralisation du sol et à la décomposition des nutriments (Agarwal *et al.*, 2018).

En outre, le biofertilisant peut remplacer partiellement l'utilisation des engrais chimiques, réduit leur quantité et leur coût, et empêche ainsi la pollution de l'environnement due à une application extensive des produits chimiques. En utilisant les engrais biologiques et organiques, un système à faible intrant peut être mis en œuvre, et il peut être aidé à atteindre la durabilité des exploitations (Mohammadi *et al.*, 2012). Les biofertilisants peuvent être caractérisés en différentes catégories comme (Agarwal *et al.*, 2018) :

- Biofertilisants fixateurs d'azote.
- Biofertilisants solubilisant au phosphate.
- Biofertilisants mobilisateurs de phosphate.
- Biofertilisants pour micro-nutriments.
- La croissance des plantes favorisant les biofertilisants (PGPB).

1.2.1.2 Biopesticides

Les biopesticides peuvent être définis comme le pesticide dérivé des ressources naturelles, qui contrôle le ravageur par des mécanismes non dangereux et de nature écologique. Selon l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis, les biopesticides sont certains types de pesticides obtenus à partir de matériaux naturels (par exemple, des animaux, des plantes, des bactéries...etc) et de certains minéraux (Kachhawa, 2017). Ils peuvent être des organismes vivants (ravageurs naturels nuisibles), des composés phytochimiques, des produits microbiens ou des sous-produits, qui peuvent être utilisés pour la lutte antiparasitaire. Ils représentent moins de menaces pour l'environnement et la santé humaine (Singh, 2019).

Les biopesticides microbiens comprennent principalement des bactéries, des champignons, des virus, des protozoaires ou des algues comme agents actifs. Ces microbes sont les biopesticides les plus couramment utilisés, notamment les bioinsecticides (*Bacillus thuringiensis*), les biofongicides (*Trichoderma sps*), les bioherbicides (*Phytophthora*)...etc. Ces biopesticides sont moins nocifs pour l'agriculture ainsi que pour les animaux et les êtres humains (Singh, 2019).

Le micro-organisme le plus utilisé dans le développement des bioinsecticides est la bactérie pathogène des insectes *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Cette bactérie sert d'insecticide à la plupart des lépidoptères, coléoptères et diptères (Gill *et al.*, 1992).

1.2.1.2.1 Marché des biopesticides

Ces dernières années, les biopesticides sont plus encouragés pour leur utilisation à travers le monde, pour lutter contre les insectes nuisibles et les maladies. Ils présentent un des secteurs en pleine croissance sur le marché international (Ghodake *et al.*, 2018).

En 2000, le marché des biopesticides était à l'état embryonnaire, la proportion des biopesticides vendus versus les pesticides chimiques n'atteignait que 0.25% (van Lenteren, 2000). Après cinq ans, le marché des biopesticides représentait 2.5% du marché global des pesticides qui était équivalent d'environ 26.7 milliard USD (Thakore, 2006). En 2006, Arysta life science (ALS) a estimé que le marché des biopesticides était de 541 millions dollars alors qu'en 2008 il a atteint 750 millions USD (3% du marché global des pesticides). Selon Global Industry Analysts (GIA), le marché mondial des biopesticides est évalué à 1.3 milliards d'euro en 2011 et devrait passer à 3.2 milliards USD en 2017 (Markets et Markets, 2016). Le marché américain des bio-pesticides (y compris les bio-insecticides, acaricides, fongicides, herbicides, bactéricides, algues et stimulants) est évalué à 1,1 milliard de dollars en 2016, et devrait croître à 17 % du TCAC entre 2016 et 2022. Ce taux de croissance dépasse de loin le TCAC de 3 % prévu pour les pesticides classiques. Le marché des biopesticide est estimé d'être évalué à 4,3 billions en 2020, et devrait croître à 14,7 % de CAGR vers 2025 (Markets et Markets, 2016) (**Figure 2**).



Figure 2. Les opportunités attractives sur le marché des biopesticides (Markets et Markets, 2016).

1.2.1.2.2 Réglementation Des Biopesticides

La réglementation joue clairement un rôle important dans la commercialisation des biopesticides et est souvent considérée comme un obstacle au développement. Bien que les exigences varient d'un pays à l'autre, le principal problème est que les réglementations ne reconnaissent pas la différence entre les organismes vivants et les molécules synthétiques. Des tests coûteux sont nécessaires quelle que soit la taille du marché cible, ce qui rend les marchés de niche des biopesticides non rentables, et le processus d'enregistrement peut être excessivement prolongé (Glare *et al.*, 2012).

Dans certains pays, comme les États-Unis et le Canada, les organismes de réglementation s'efforcent de modifier le processus d'homologation afin d'améliorer l'utilisation des produits à faible risque, y compris les biopesticides. Néanmoins, les restrictions à la circulation des produits contenant des organismes vivants à travers certaines frontières géopolitiques continuent de limiter l'accès au marché pour les biopesticides. Il s'agit notamment des procédures d'importation et de quarantaine, des restrictions sur les nouveaux organismes et de la Convention sur la diversité biologique (Glare *et al.*, 2012).

L'Union européenne a adopté des règlements qui incitent à l'homologation des substances à faible risque pour la lutte antiparasitaire et la mise en œuvre obligatoire de pratiques de lutte intégrée contre les ravageurs d'ici 2014, ce qui limite explicitement l'utilisation de la plupart des pesticides synthétiques. Bien que l'industrie des biopesticides reconnaisse la nécessité d'une modification de la réglementation, l'incitation fournie (15 ans d'approbation initiale au lieu de 10 qui est la norme) est considérée comme une incitation minimale et les critères pour se qualifier comme substance à faible risque ne sont pas clairs (Glare *et al.*, 2012).

2 *Bacillus thuringiensis* en agroécologie

2.1 Caractéristiques générales de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis a été isolée au Japon par Ishiwata (1901) dans des larves de vers à soie malades *Bombyx mori*. Dix ans plus tard, elle a été décrite par le biologiste allemand Ernest Berliner en 1911. Le travail classique d'identification de *Bt* a commencé au début des années 60 en tant que membre des *firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales*, et la famille des *Bacillaceae* (De-Barjac *et al* in Osman *et al.*, 2015).

L'espèce *Bacillus thuringiensis* fait partie du groupe des bactéries de type *Bacillus cereus* et se divise en 82 sous-espèces, déterminée à partir des antigènes de leur flagelle H, pour cela on peut individualiser actuellement 12 sérotypes et 17 variétés (De Barjac *et al.*, 1973).

Bacillus thuringiensis est une bactérie aérobie facultative, ubiquiste, Gram positive, qui peut tolérer la chaleur. De plus, le *Bt* a une forme et une morphologie similaires à celles des autres membres du genre, avec un corps de type tige. Dans le sens de la largeur, les cellules bactériennes en forme de bâtonnet varient de 0,5 à 1,0 µm lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux de culture liquides, À l'état végétatif, *Bacillus thuringiensis* a une forme d'un bâtonnet de 5 µm de long sur 1 µm de large, et est pourvu de flagelles, Les colonies *Bt* cultivées sur des milieux solides sont généralement blanches, arrondies, ondulées ou à bords fins, avec un aspect de type œuf frit et sont élevées (Hastowo *et al.*, 1992).

Le placement de *Bt* en tant qu'espèce distincte au sein du genre *Bacillus* a été controversé depuis la publication de The Genus *Bacillus* en 1973 et du Bergey Manual of Determinative Bacteriology en 1974 (Buchanan et Gibbons in Osman *et al.*, 2015).

Sur la base de l'hétérogénéité phylogénétique, huit genres de la classe *Bacilli* ont été proposés : *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus* et *Gracilibacillus* (Ash *et al.*, 1991).

2.1.1 Paramètres de croissance

B. thuringiensis ssp peut convertir les nitrates en nitrites et utiliser le citrate lentement comme source de carbone. La bactérie peut croître dans des conditions anaérobies en présence de glucose (Heimpel et Angus, 1958). Toutefois, dans des conditions anaérobies, la croissance de *B. thuringiensis* est lente et la sporulation peut être inhibée, un apport en oxygène est donc essentiel pour assurer sa survie et sa persistance à long terme (Argôlo-Filho *et al.* 2013).

Il a été proposé que sa germination et sa croissance soient inhibées par d'autres microorganismes indigènes et une pénurie de nutriments (West *et al.*, 1985). La germination et la croissance de *B. thuringiensis* s'effectuent dans une gamme de pH restreinte, dans le cas de *B. thuringiensis ssp. kurstaki* et de *B. thuringiensis ssp. israelensis* la croissance est optimale à un pH de $7,5 \pm 1,0$ (Seligy *et al.*, 1997).

B. thuringiensis peut croître en étant exposé à une vaste gamme de températures. La température minimale permettant à la bactérie de croître est de 10 à 15 °C et la température maximale est de 40 à 45 °C, Il a été rapporté que la croissance est bonne entre 28 et 35 °C (Heimpel et Angus, 1958).

2.1.2 Cycle De Vie

Le cycle de vie du *B. thuringiensis* est caractérisé par deux phases qui incluent la division cellulaire végétative et le développement des spores, autrement appelé cycle de sporulation (Bechtel et Bulla, 1982). Ces deux étapes impliquent des changements à la fois dans la morphologie et dans la biochimie de la cellule. Lorsque les nutriments sont suffisants et les conditions environnementales convenables pour la croissance, la spore germe et produit une cellule végétative, cette dernière se divise en deux cellules filles uniformes, par la formation d'un septum de division initié à mi-chemin le long de la membrane plasmique. Durant cette phase de croissance végétative, les cellules de *B.thuringiensis* utilisent les sucres comme source de carbone et d'énergie pour la synthèse des protéines et autres métabolites. Les cellules continuent à se multiplier jusqu'à ce qu'un des nutriments (sucres, acides aminés ou phosphate) ou le dioxygène dissous deviennent insuffisants pour la croissance végétative. Dans ces conditions, la bactérie sporule produisant une spore et une inclusion cristalline (Lui et Tzeng, 2000) (**Figure 3**).

La sporulation est une manifestation physiologique de la bactérie soumise à des conditions environnantes difficiles (Rivera, 1999), qui implique une division cellulaire asymétrique et est caractérisée par sept étapes (**Figure 4**) qui comprennent (Bulla *et al* in Ibrahim *et al*, 2010) :

- Stade I : la formation de filaments axiaux.
- Stade II : la formation du septum avant les spores.
- Stade III : l'engloutissement, la première apparition de cristaux parasporaux et la formation d'un forespore.
- Stades IV à VI : formation de l'exosporium, de la paroi cellulaire primordiale, du cortex et des couches de spores accompagnées de la transformation du nucléoïde de la spore et de la maturation des spores.
- Stade VII : lyse sporangiale.

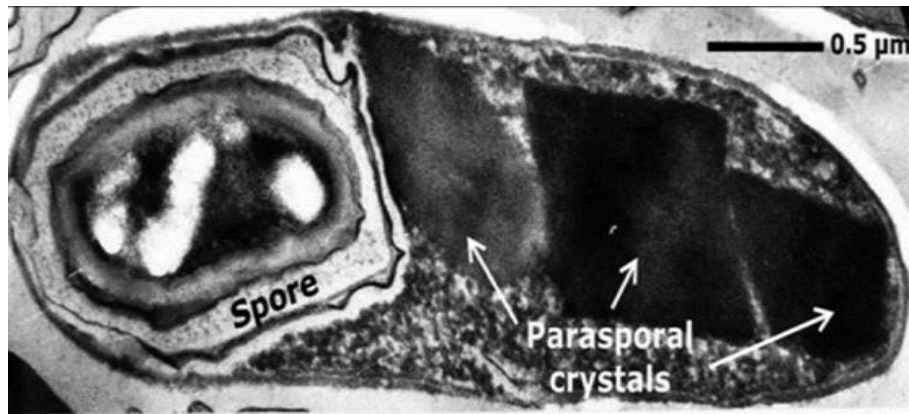


Figure 3. Micrographie électronique à transmission d'une cellule sporulée de *Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni* souche C18 (x 44 000) (Bulla *et al.*, 1980).

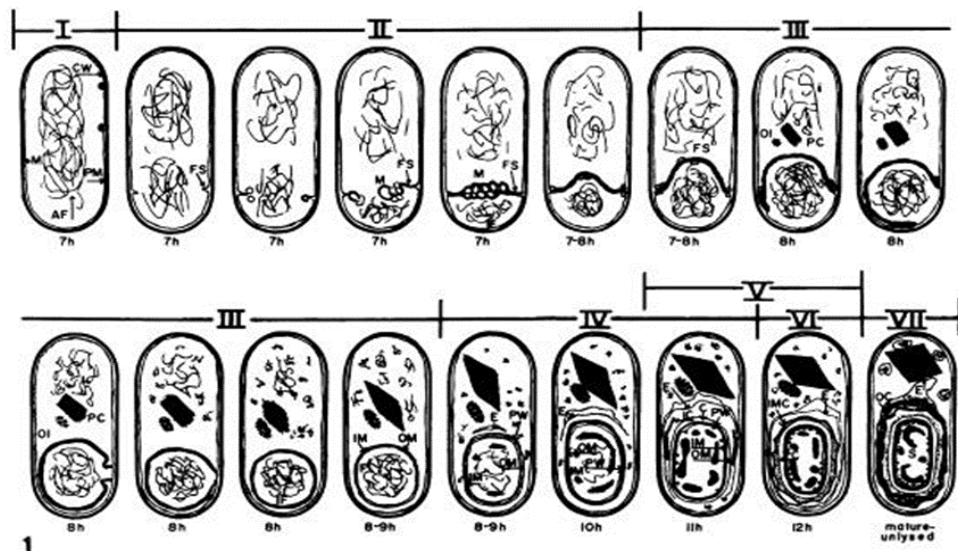


Figure 4. Schéma de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis* (Bechtel et Bulla, 1982).

2.1.3- Milieux de vie

B. thuringiensis est considéré ubiquiste (de Been *et al.*, 2006) , elle est présent un peu partout dans le monde et a été isolé dans tous les continents (Forsyth et Logan, 2000). *B. thuringiensis ssp. thuringiensis* est principalement présent dans des habitats terrestres, mais est également présent dans des milieux aquatiques (Martinez et Caballero, 2002).

- Sol

Sols agricoles cultivés, sols non cultivés, déserts, toundras forestières et forêts tropicales humides (Obeidat *et al.*, 2004).

– **Phyllosphère et rhizosphère**

- Feuilles, le phylloplane des plantes ligneuses et herbacées, dont des arbres à feuilles caduques, des conifères, de l'herbe et du chou, compost de champignonnière (Frederiksen *et al.*, 2006).
- Fruits et légumes frais, soit comme contaminants naturels, soit comme résidus d'insecticides à base de *B. thuringiensis* (Frederiksen *et al.*, 2006).
- Cadavres d'insectes, sol de séricultures (Xavier *et al.*, 2007).
- Produits céréaliers stockés, moulins, meules à maïs, divers aliments, comme les pâtes, le pain pita et le lait (Damgaard *et al.*, 1996).

– **Milieus aquatiques**

Plans d'eau stagnante, plans d'eau asséchés, eau, sédiments marins, sédiments de saumâtre dans des marais à mangrove (Maeda *et al.*, 2001).

2.2 Caractéristiques génétiques

La taille du génome *Bt* varie de 2 à 6 millions de paires de bases. Pour certaines souches de *Bt*, des cartes physiques ont été construites. La comparaison de la carte chromosomique *Bt* avec celle de *B. cereus* indique qu'ils ont presque la même architecture dans la moitié centrale du chromosome autour de l'origine de réplication alors qu'ils varient les uns des autres à la moitié terminale (Carlson *et al.*, 1996).

La plupart des souches de *Bt* possèdent également des plasmides circulaires et linéaires dont la taille varie de 2 à 200 kb. Les grands plasmides codent généralement pour les gènes des protéines cristallines parasporales. Des éléments transposables (TE) sont également rapportés dans *Bt* et on pense que leur rôle est dans la duplication des gènes *Cry*. Un autre rôle possible pour ces TE qui pourrait être envisagé dans la diffusion horizontale de l'information génétique en intervenant dans le processus de conjugaison au sein de *Bt* ou avec d'autres espèces bactériennes apparentées (Schnepf *et al.*, 1998).

Selon (Mahillon *et al.*, 1994), près de 18 génomes de *Bt* représentant plus que 13 serovars (sous-espèces) et correspondant souvent aux séquences du chromosome plus des éléments extra-chromosomiques ont été séquencés, assemblés souvent en « contigs » et déposés dans la base de données « GenBank » disponible sur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) tel que *Bt ssp. Kurstaki* (5 493 868 pb).

Le génome de pleine longueur (y compris un à plusieurs plasmides) des souches *Bt* étudiées s'étend de 5,3 à 6,87 Mb. Le nombre de gènes dans les souches *Bt* étudiées varie de 5343

à 7227, et le nombre de plasmides varie entre 1 et 13. La teneur en guanine-cytosine (GC) des génomes *Bt* est comprise entre 31,4% et 35,48 % (Dong *et al.*, 2016).

2.3 Métabolites d'intérêt biotechnologiques chez *Bacillus thuringiensis*

Les bactéries *Bacillus thuringiensis* produisent plusieurs types de toxines, parmi lesquelles des toxines larvicides, tel que les δ -endotoxines (ICP) produites sous forme de cristal durant la sporulation de la bactérie, et des toxines *Vip* (Végétative Insecticidal Proteins) produites durant la phase végétative mais qui ne semblent participer que faiblement à la toxicité du *Bt* en comparaison des δ -endotoxines (Crickmore *et al.*, 2016).

Certains variants de *Bt* sont également connus pour développer peu d'autres protéines autres que les δ -endotoxines (*Cry* et *Cyt*) et les *Vips* telles que chitinases, protéases spécifiques, phospholipases et β -exotoxines. Cependant, seuls ICP et *Vips* ont été étudiés en tant que protéines insecticides majeures (Pohare *et al.*, 2021).

235 δ -endotoxines produites par l'ensemble des sous-espèces de *Bt* décrites ont été recensées à ce jour. Chaque toxine est codée par un seul gène porté par un des plasmides de la bactérie, les gènes codant les toxines du *Bti* sont portés par le plasmide pBtoxis (Crickmore *et al.*, 2016).

Lors de la sporulation, *Bt* synthétise des inclusions de cristaux essentiellement composés d'une ou plusieurs protéines cristallines (*Cry*) et cytolytiques (*Cyt*). Ces cristaux sont accumulés dans la cellule mère, ce qui représente jusqu'à 25% du poids sec des cellules sporulées. Il a été démontré que la quantité de protéines cristallines produites par une culture de *Bt* en conditions de laboratoire, indique que chaque cellule doit synthétiser environ 0,5 mg de protéines par ml de δ -endotoxines lors de la phase stationnaire (Agaisse et Lereclus, 1995).

Contrairement aux pesticides chimiques, ces δ -endotoxines sont très spécifiques à l'insecte cible. Elles nécessitent tout d'abord une solubilisation ainsi qu'une activation en toxine par les enzymes protéolytiques de l'insecte. Ensuite, elles se fixent spécifiquement sur des récepteurs membranaires situés au niveau des cellules intestinales. Enfin, cette toxine s'oligomérisse et forme un pore membranaire, induisant une paralysie intestinale puis la mort de l'insecte (Bravo *et al.*, 2007).

2.3.1 Les protéines cristalline (*Cry*)

L'un des aspects les plus importants de la sporulation *Bt* est la formation de cristaux parasporaux. Les toxines insecticides (toxines *Cry*) du *Bt*, souvent appelées δ -endotoxines sont quelque peu spécifiques à certains insectes. La famille des gènes codant pour ces toxines est la famille des gènes *Cry* (Heimpel, 1967). Que l'on trouve principalement sur les grands plasmides, ces gènes peuvent être intégrés dans le chromosome (Schnepf et Whiteley, 1981).

Sur la base de son mode d'action, une toxine *Cry* est une toxine simple définie comme un monomère ou un oligomère d'une protéine simple toxique. Les cristaux parasporaux de *Bt* sont des oligomères composés de sous-unités polypeptidiques de protoxine (Heimpel, 1967).

La protoxine est le précurseur toxique immédiat d'une toxine *Cry*, lors de l'activation de la protoxine, une toxine *Cry* insecticide est générée (Bulla *et al.*, 1981). Il est intéressant de noter que la transformation de la protoxine en toxine est différente parmi les groupes de toxines respectifs, en fonction de la spécificité de l'hôte, c'est-à-dire des toxines qui tuent les mites, les coléoptères ou les moustiques. Par exemple, les toxines *CryIA* et *Cry4* (~ 65 kDa) qui tuent principalement les papillons de nuit et les moustiques, respectivement, sont des produits de protoxines, dont le poids moléculaire est compris entre 125 et 135 kDa, tandis que les toxines *Cry3* (~ 68 kDa) qui tuent les coléoptères sont des produits de conversion de protoxines de 72 kDa. Différents cristaux parasporaux sont constitués de protéines *Cry* uniques ou multiples, tel que, le cristal parasporal de *Bt subsp. kurstaki* HD-73 contient uniquement la protéine *CryIAC*, tandis que le cristal parasporal de la souche HD1, qui appartient à la même sous-espèce, est composé de cinq toxines *Cry* différentes *CryIAa*, *CryIAb*, *CryIAC*, *Cry2Aa* et *Cry2Ab* (Schnepf et Whiteley, 1981).

(Carlton et Gawron-Burke, 1993), ont proposé une nomenclature universelle et un schéma de classification des protéines *Cry* et de leurs gènes en fonction de la gamme d'hôtes. En conséquence, les gènes *Cry* ont été classés en quatre grandes classes en fonction de leur toxicité protéique envers les insectes et de leur réactivité primaire avec les gènes correspondants, à savoir *Cry I* (spécifique des lépidoptères), *Cry II* (spécifiques des lépidoptères et des diptères), *Cry III* (spécifiques des coléoptères) et *Cry IV* (spécifiques des diptères) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Nomenclature et schéma de classification des gènes *cry* en fonction de la gamme d'hôtes (Höfte et Whiteley, 1989).

Gene	Crystal shape	Protein size(kDa)	Insect activity
cry I [several subgroups: A(a), A(b), A(c), B, C, D, E, F, G]	bipyramidal	130-138	lepidoptera larvae
cry II [subgroups A, B, C]	cuboidal	69-71	lepidoptera and diptera
cry III [subgroups A, B, C]	flat/irregular	73-74	coleoptera
cry IV [subgroups A, B, C, D]	bipyramidal	73-134	diptera
cry V-IX	various	35-129	various

Plus tard, un autre format de nomenclature basé sur la similarité des séquences d'acides aminés a été proposé (Crickmore *et al.*, 1998).

Dans la classification proposée par (Crickmore *et al.*, 1998), les gènes *cry* sont divisés en 51 groupes et sous-groupes. Les toxines *Cry* sont séparées en six classes principales en fonction de leurs spécificités d'hôte d'insectes qui incluent : Groupe 1 lépidoptère (*Cry1*, *Cry9* et *Cry15*), Groupe 2 lépidoptère et diptère (*Cry2*), groupe 3 Coléoptère (*Cry3*, *Cry7* et *Cry8*), Groupe 4 diptère (*Cry4*, *Cry10*, *Cry11*, *Cry16*, *Cry17*, *Cry19* et *Cry20*), groupe 5 lépidoptère et coléoptère (*Cry1*), et Groupe 6 nématodes (*Cry6*). Les structures tridimensionnelles d'un certain nombre de toxines *Cry* ont été publiées : *Cry3Aa*, *Cry1Aa*, *Cry1Ac*, *Cry2Aa*, *Cry3Bb*, *Cry4Ba*, *Cry4Aa* (Boonserm *et al.*, 2006).

2.3.1.1 Structure Des Protéines (*Cry*)

Les cristaux protéiques sont initialement sous forme de protoxines avant leur activation en toxines par l'insecte cible. Ces protoxines peuvent être décomposés en deux fragments (Bietlot *et al.*, 1990) :

- Un fragment dit structural (C-terminal), responsable de la formation et la stabilité du cristal, par la présence de ponts disulfures (fragment riche en cystéines). Cette première moitié C-terminale est très conservée pour les gènes *Cry*, suggérant qu'elle ne joue pas un rôle majeur dans la toxicité, mais plutôt dans le maintien et la solubilité des toxines (Bietlot *et al.*, 1990).
- Un fragment dit toxique (N-terminal), responsable de l'activité insecticide proprement dite. Ce fragment peut être à son tour décomposé en trois domaines distincts (**Figure 5**) (de Maagd *et al.*, 2001).

- Le domaine I (partie N-terminale) : contenant sept hélices- α organisées en trois paires d'hélices amphipathiques autour d'une hélice centrale hydrophobe, impliqué à l'insertion dans la membrane et donc dans la formation des pores dans l'épithélium intestinal de l'organisme cible (Höfte et Whiteley, 1989).
- Le domaine II formé de trois feuillets- β et impliqué dans la reconnaissance et la fixation de la toxine sur le récepteur (Höfte et Whiteley, 1989).
- Le domaine III (partie C-terminale) structuré en β -sandwichs impliqués à la fois dans la reconnaissance et la liaison de la protéine aux récepteurs membranaire des cellules épithéliales (Allured *et al.*, 1986), et le fonctionnement du canal ionique. Cette partie C-terminale contrôle la spécificité vis-à-vis de l'insecte cible, si bien qu'une mutation dans ce domaine permet de modifier le spectre d'hôtes (Helassa, 2008).

Par ailleurs, à l'intérieur de ces trois domaines, cinq blocs d'acides aminés sont très conservés entre la majeure partie des différentes toxines *Cry*, suggérant une structure tertiaire assez conservée (Höfte et Whiteley, 1989) :

- Le bloc 1, comprenant l'hélice $\alpha 5$ du domaine I, hélice impliquée dans la formation du pore membranaire, expliquant sa grande conservation. Sa situation centrale peut influencer sur le maintien structural des autres hélices.
- Le bloc 2, comprenant l'hélice $\alpha 7$ du domaine I, et le premier feuillet- β du domaine II, correspondant à la région de contact entre le domaine I et II.
- Les blocs 3, 4 et 5, comprenant le dernier feuillet- β du domaine II, et les feuillets- β du domaine III.

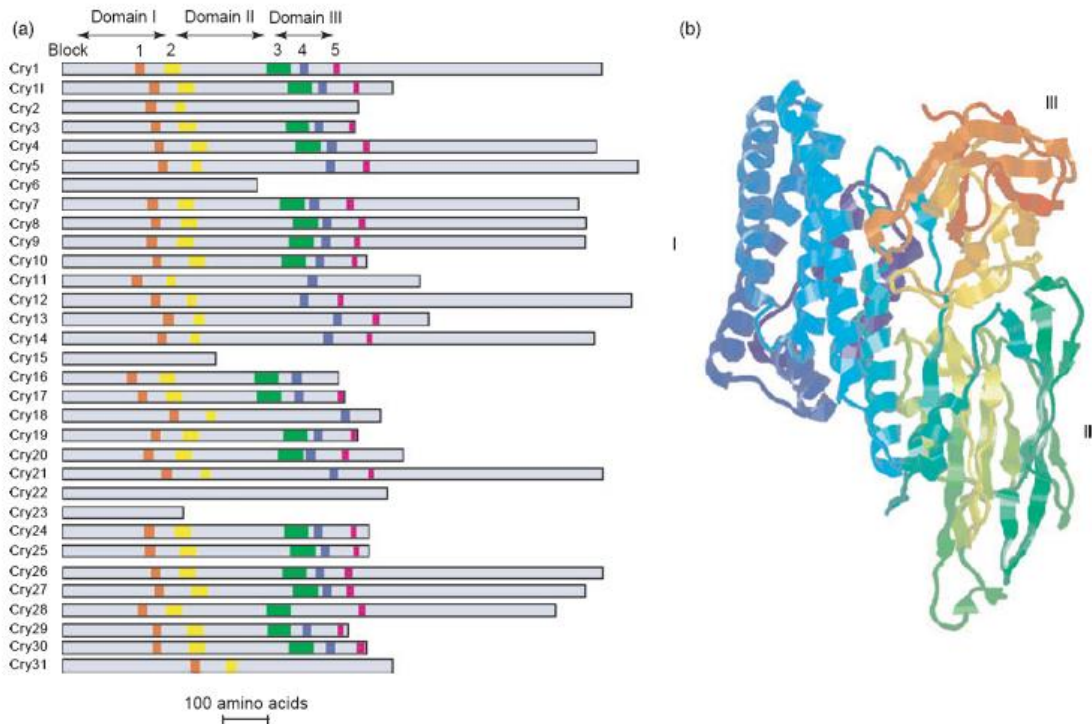


Figure 5. Structure des protéines *Cry* à trois domaines (Sanahuja *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Mode d'action des protéines (*Cry*)

Le mécanisme de mort induit par *Bt*, comprend un total de six étapes principales (**Figure 6**) (Bravo *et al.*, 2007).

- **Etape A : Ingestion de spores ou de protéines recombinantes par des larves phytophages**

Les cristaux et spores de *Bt* sont épanchés conjointement dans l'environnement. La suspension est soit aspergée sur les plantes à protéger des phytophages soit directement dans l'eau des gîtes à moustiques, cette suspension est ensuite ingérée par la larve d'insecte. Dans le contexte des plantes génétiquement modifiées, les toxines produites par les plantes sont généralement déjà solubilisées et activées. L'étape d'ingestion par la larve se fait donc en mangeant des parties de la plante contenant des toxines pré-activées (Becker, 2002).

- **Etapes B et C : solubilisation et activation**

Une fois ingéré, le cristal se dissout dans l'intestin des larves à un pH variant entre 9,5 (toxines *CryI*, Lépidoptères), et 12 (toxines du *Bti*, Diptères), par cassure des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes qui assurent sa stabilité (Gill *et al.*, 1992).

Les protoxines solubilisées sont inactives. Pour pouvoir acquérir leur pouvoir insecticide, les protoxines doivent être activées, principalement par des enzymes digestives intestinales de la larve, mais également par certaines enzymes de la bactérie *Bt* (Rukmini *et al.*, 2000). L'activation des toxines est généralement réalisée par des protéases à sérine, telles que des trypsines et des chymotrypsines (Oppert, 1999).

- **Etapes D : fixation au(x) récepteur(s) membranaire(s)**

Trois principales familles de récepteurs aux toxines *Cry* ont été décrites : les cadhérines, les N-aminopeptidases (APN) et les phosphatases alcalines (ALP). C'est à la spécificité de leurs récepteurs que l'on attribue la spécificité de chaque toxine pour leurs insectes cibles (Bravo *et al.*, 2011).

Une même toxine peut se fixer à plusieurs récepteurs différents et plusieurs toxines peuvent partager le même récepteur (Ferré *et al.*, 1995).

• **Les cadhérines**

Sont des glycoprotéines présentes à la surface des cellules, et impliquées dans les jonctions intercellulaires. Les cadhérines sont constituées d'un domaine cytoplasmique, permettant la régulation de leur fonction par les caténines, d'un domaine transmembranaire, permettant leur insertion dans la membrane plasmique et de plusieurs domaines répétés (entre 9 et 12 chez les insectes), Ce sont les domaines les plus éloignés de la membrane, qui assurent la fonction de jonction entre les cellules, alors que les toxines *Cry* se fixent au niveau des domaines proximaux de la membrane (Ivanov *et al.*, 2001).

Les cadhérines sont les premiers récepteurs aux toxines *Cry* à avoir été décrit *Bt-RI* pour *CryIAb* chez *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1993), ainsi ils jouant un rôle clé dans le mode d'action des toxines *CryIA* chez au moins cinq autres espèces de Lépidoptères : *Bombyx mori*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Pectinophora gossypiella* et *Ostrinia nubilalis* (Pigott et Ellar, 2007).

• **N-Aminopeptidases (APN)**

Les aminopeptidases, sont des métalloprotéases qui clivent les acides aminés de la région N-terminale des protéines, ce qui leur confère un rôle important dans la digestion des aliments par la larve (Taylor, 1993).

Chez les insectes, les N-aminopeptidases (APNs) sont des enzymes membranaires ancrées grâce à un motif GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Pigott et Ellar, 2007). Elles sont localisées au niveau de radeaux lipidiques (Zhuang *et al.*, 2002).

Les APNs ont été décrites comme des récepteurs pour les toxines *CryI* chez six espèces différentes de Lépidoptères : *B. mori*, *H. armigera*, *H. virescens*, *Lymantria dispar*, *M. sexta* et *Plutella xylostella* (Pigott et Ellar, 2007).

- **Phosphatases alcalines (ALP)**

Tout comme les APNs, les phosphatases alcalines (ALP) sont ancrées dans les membranes lipidiques des cellules à l'aide d'ancres GPI, et se localisent principalement au niveau de radeaux lipidiques (Pigott et Ellar, 2007).

Leur implication en tant que récepteurs des toxines *Cry* est récente. Les ALPs ont été décrites comme de potentiels récepteurs chez *M. sexta* pour les toxines *CryIAb* et *CryIAc* et chez *H. virescens* pour *CryIAc* (Arenas *et al.*, 2010).

Les toxines de *Bacillus thuringiensis var. israelensis Cry4Ba* et *CryIIAa* ainsi que *CryIIBa Bacillus thuringiensis var. jegathesan* sont également capables de se fixer à des ALPs chez *Ae. aegypti* et *A. gambiae* (Dechklar *et al.*, 2011).

- **Etapes E à F : de l'oligomérisation à l'infection**

L'oligomérisation est une étape indispensable pour la toxicité de nombreuses toxines *Cry* (Munoz-Garay *et al.*, 2009).

Les toxines peuvent s'assembler sous différentes formes : en dimères, en trimères et plus généralement en tétramères (Ounjai *et al.*, 2007).

Une fois l'oligomère inséré dans la membrane, il va y avoir mort de la cellule due au choc osmotique, provoquant une déstabilisation de la paroi intestinale. Cela permet aux spores de *Bt* de passer dans l'hémolymphe de l'insecte, milieu extrêmement riche dans lequel elles vont pouvoir germer et les bactéries proliférer (Lacey, 2007).

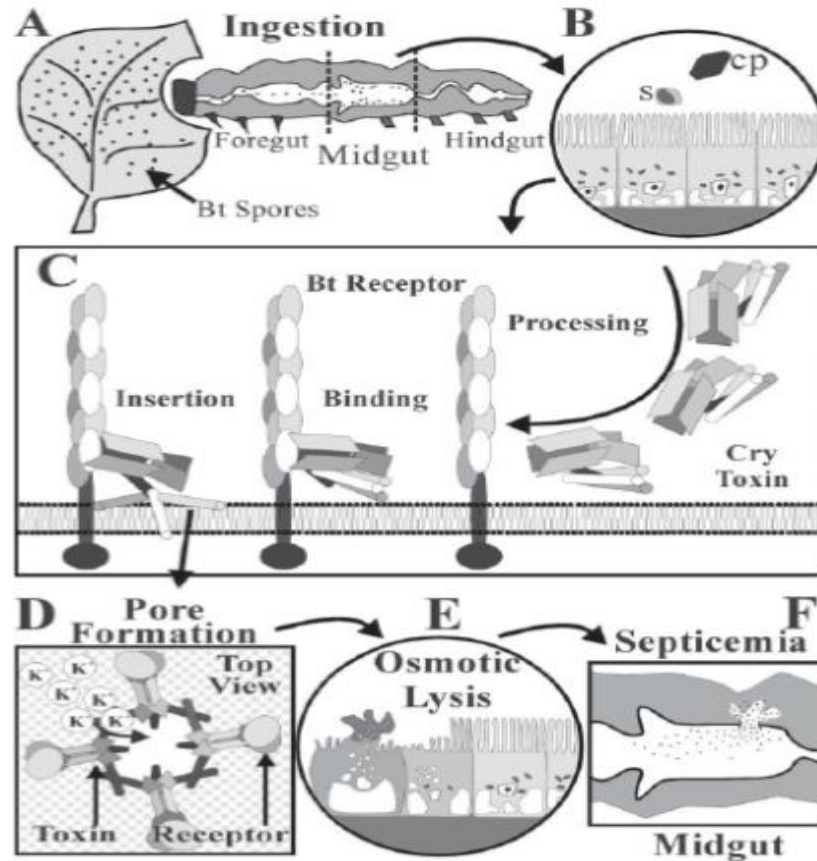


Figure 6. Mécanisme de la toxicité des protéines *Cry* (Bravo *et al.*, 2011).

2.3.2 Protéines cytolytique (*Cyt*)

Les espèces de *B. thuringiensis* ne sont pas toutes connues pour produire des toxines *Cyt* (Crickmore *et al.* 1998), Les toxines *Cyt* sont des protéines d'environ 30 kDas constitués d'hélices alpha entourant des feuilletts bêta (**Figure 7**) (Butko, 2003).

Ces toxines (*Cyt*) ont été rapportées chez des souches de *B. thuringiensis* spécifiques des diptères, comme la sous-espèce *israelensis* (Crickmore *et al.*, 1998). La sous-espèce *B. thuringiensis ssp. israelensis* est connue pour son effet insecticide sur les moustiques, elle produit un mélange de toxines *Cyt* qui ont une activité cytolytique et hémolytique *in vitro* et sont toxiques pour les moustiques des genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* (Crickmore *et al.*, 1995).

Les toxines *Cyt* de *B. thuringiensis* présentant un effet insecticide sur les moustiques exhibent un mécanisme d'interaction cellule-membrane différent de celui des toxines *Cry*. Les toxines *Cyt* ne se lient pas à des récepteurs protéiques, mais forment directement des pores dans la membrane (Bravo *et al.*, 2007), ou détruisent la membrane grâce à une interaction de type détergent (Butko, 2003).

Cyt1Aa et *Cyt2Ba* ont un seul domaine de protéines alpha – bêta à trois couches, tandis que *Cyt1Ca* le domaine présente une homologie avec le domaine de liaison aux glucides de la ricine mais n'a pas de larvicide ou hémolytique activité (Butko, 2003).

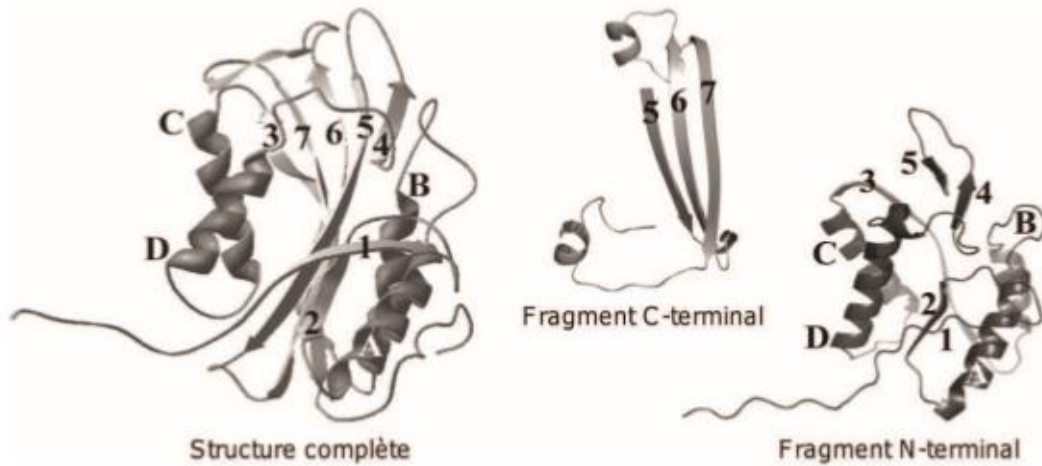


Figure 7. Structure tridimensionnelle de la toxine *Cyt1Aa* complète (gauche), de la partie C-terminale (centre) et N-terminale (droite) (Butko, 2003).

2.3.2.1 Mode d'action des toxines cytolytiques

Tout comme les toxines *Cry*, les toxines *Cyt* sont ingérées sous forme de cristal qui doit être solubilisé dans l'intestin des larves d'insectes. Les protoxines solubilisées sont également activées par les enzymes digestives de la larve (Li *et al.*, 1996).

Contrairement aux toxines *Cry*, les toxines *Cyt* ne nécessitent aucun récepteur pour avoir une activité cytolytique, deux modèles s'opposent sur la manière dont les toxines *Cyt* activées, déstructurent les membranes des cellules épithéliales (Butko, 2003).

Le premier modèle est un modèle « pore-forming » où les toxines *Cyt* seraient capables de s'insérer spontanément dans les membranes des cellules, entraînant la formation de pores et la mort de la cellule (Butko, 2003). Ce modèle est soutenu par des travaux montrant la formation de canaux cation-sélectifs (Knowles *et al.*, 1989).

Le deuxième modèle est un modèle détergent (Manceva *et al.*, 2005), les toxines *Cyt* ne s'insèrent pas dans la membrane et ne subissent aucune modification de structure. Leur fixation non spécifique sur la membrane entraîne une déstructuration des lipides provoquant l'éclatement de la cellule (Butko, 2003).

2.3.3 Les protéines végétatives insecticides (*Vips*)

En plus des endotoxines (toxines *Cry* et *Cyt*), *Bt* produit une nouvelle famille de protéines insecticides, appelées protéines insecticides végétatives (*Vip*). Au cours de sa phase végétative, Deux classes de toxines *Vip* ont été décrites. Le premier consiste en un système binaire composé de deux protéines *Vip1* et *Vip2*, qui mesurent respectivement 100 kDa et 52 kDa. Ces protéines sont hautement toxiques pour certaines espèces de coléoptères. La deuxième classe est une protéine de 88,5 kDa (*Vip 3*), et active contre un large éventail d'insectes lépidoptères. Ces deux classes de protéines ne présentent pas d'homologie de séquence avec les protéines *Cry* ou *Cyt*. Il existe, environ 82 gènes *Vip* identifiés. Les toxines *Vip* ne forment pas de cristaux (Wu *et al.*, 2007).

2.3.3.1 Les protéines *Vip 1*

Les protéines *Vip1* sont de 60 à 100 kDa, et possèdent un peptide signal au niveau de la partie N-terminale responsable de sa sécrétion vers le milieu extracellulaire (Ramasamy *et al.*, 2008).

La protéine oligomérique *Vip1Ac* a été purifiée sous forme native, ce qui a permis de constater *in vitro* qu'elle forme un canal oligomérique, ionique et sélectif d'anions en présence d'une membrane de bicouche lipidique (**Figure 8**) (Jucovic *et al.*, 2008).

Il a été démontré que des feuillettes β se rassemblent pour former une structure en « β -turn » transmembranaire, où les résidus hydrophobes sont du côté de la bicouche lipidique, et les résidus hydrophiles sont du côté de la lumière du canal. L'oligomérisation de la protéine active *Vip1A* après l'interaction avec un récepteur donné serait une étape essentielle pour la formation des pores qui seront le chemin putatif du passage de *Vip2* (Leuber *et al.*, 2006).

2.3.3.2 Les protéines *Vip2*

La protéine *Vip2* est une ADP-ribosyl transférase, possédant un peptide signal au niveau de la partie N-terminale responsable de sa sécrétion vers le milieu extracellulaire (Ramasamy *et al.*, 2008).

Des alignements de séquences ont montré que, la protéine *Vip2Ac* de *Bacillus cereus*, présente des similarités avec d'autres composants enzymatiques de plusieurs toxines binaires, de 95% avec *Vip2Aa* de *Bacillus cereus*, de 89% avec *Vip2Ab* de *B. thuringiensis* et de 36-38% d'identité avec les toxines C2 produites par *Clostridium botulinum*, (Aktories *et al.*, 1986), "iota toxins" de *C. perfringens*, les toxines de *C. spiroforme* et de *C. difficile* (Popoff *et al.*, 1988).

La structure cristalline de *Vip2A(c)* de *B. cereus*, a montré qu'elle est formée d'un mélange de structures α/β formant deux domaines, N-terminal (résidus 60-265) et C-terminal (résidus 266-461), ayant une homologie structurale entre eux malgré qu'ils ne montrent que 24% d'identité de séquence. Chaque domaine est formé d'un noyau sous forme d'un « sandwich β » constitué de cinq feuillets β ($\beta_1, \beta_4, \beta_8, \beta_7, \beta_2$) au niveau du domaine N-terminal, et cinq feuillets $\beta_9, \beta_{12}, \beta_{15}, \beta_{16}, \beta_{10}$ au niveau du domaine C-terminal et trois autres feuillets β antiparallèles ($\beta_3, \beta_6, \beta_5$) au niveau du domaine N-terminal, et trois feuillets $\beta_{11}, \beta_{14}, \beta_{13}$ au niveau du domaine C-terminal. Autour de ce noyau sont arrangées cinq hélices α consécutives ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5$) au niveau du domaine N-terminal, ($\alpha_6, \alpha_7, \alpha_8, \alpha_9, \alpha_{10}$) au niveau du domaine C-terminal (Tsuge *et al.*, 1993).

La structure cristalline du complexe *Vip2Ac-NAD* a montré que la liaison de la molécule NAD se fait au niveau de la séquence C-terminale qui joue le rôle du domaine enzymatique (Han *et al.*, 1999).

2.3.3.3 Mode d'action des *Vip1-Vip2*

(Leuber *et al.*, 2006), ont proposé une succession d'étapes résumant l'action des protéines *Vip1* et *Vip2*. En effet, une fois ingérées par la larve cible, la protoxine *Vip1*, subit un clivage protéolytique grâce au pH alcalin (9-11) de l'intestin larvaire et à la présence des protéases de type trypsine-like. La protéine *Vip1* ainsi activée va se lier sous forme d'oligomères à des récepteurs spécifiques se trouvant au niveau des microvillosités de l'intestin moyen des larves cibles sous la forme d'une structure en « β -turn» transmembranaire (**Figure 9**).

A l'état naturel, la polymérisation de l'actine G au niveau du cytosquelette des cellules intestinales de l'insecte forme des polymères d'actine nommés actines fibrillaires (actine F). Ces derniers constituent des cellules normales et un intestin fonctionnel. La protéine *Vip2* en tant que ADP ribosyltransférase catalyse le transfert d'un groupement ADP et d'un groupement ribose liés à une molécule appelée NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) vers les monomères d'actine G (Globulaire) au niveau de l'arginine en position 177, inhibant ainsi la polymérisation des microfilaments et la formation de l'actine polymérique, d'où la disruption de l'intégrité du cytosquelette cellulaire et de la membrane cytoplasmique causant ainsi la mort de l'insecte (Barth *et al.*, 2004).

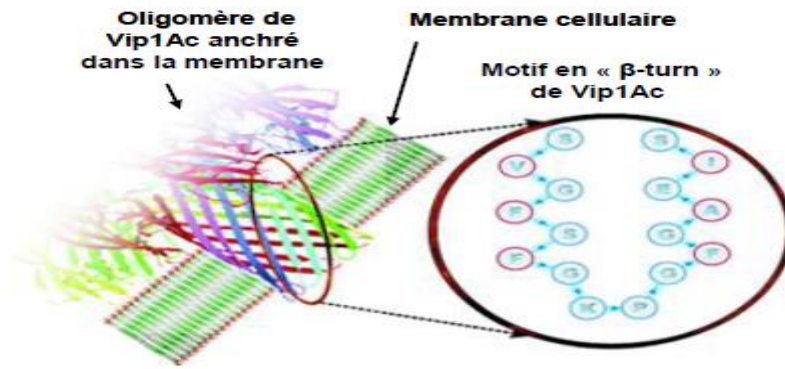


Figure 8. Modèle de l'oligomère de *Vip1Ac* de *B. thuringiensis* intégré dans la membrane cellulaire de l'insecte cible et formant un canal ionique qui permettrait la translocation de *Vip2Ac* (Leuber *et al.*, 2006).

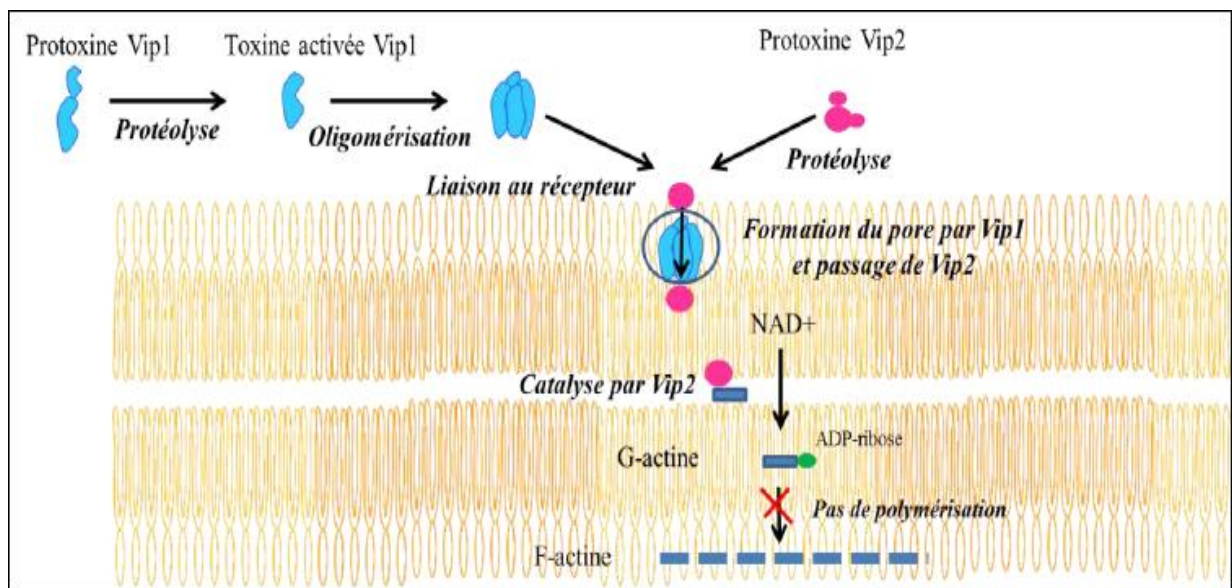


Figure 9. Modèle proposé du mode d'action des protéines binaires *Vip1*, *Vip2* (Leuber *et al.*, 2006).

2.3.3.4 Les protéines *Vip3*

Le nombre total d'acides aminés de la plupart des protéines *Vip3* est d'environ 790, codant pour une protéine de 89 kDa. La partie N-terminale des protéines *Vip3* est hautement conservée, alors que la partie C-terminale est très variable suggérant qu'elle intervient dans la spécificité des insectes cibles (Wu *et al.*, 2007).

La partie N-terminale des protéines *Vip3*, contient une séquence signal responsable de la translocation des protéines à travers la membrane. Cette séquence est constituée de quelques acides aminés chargés positivement suivi d'une région hydrophobe qui sera clivée après la sécrétion (Chen *et al.*, 2003) (**Figure 10**).

Cependant, le mécanisme de sécrétion des protéines *Vip3* est encore non élucidé, La conservation très importante de la partie N-terminale des protéines *Vip3* peut suggérer qu'elle intervient dans le repliement de la protéine ou dans l'interaction aux récepteurs (Estruch *et al.*, 2001).

Des études sur la partie C-terminale ont montré que les derniers acides aminés de cette partie sont critiques pour l'activité et la stabilité de ces protéines puisque leurs suppressions, substitutions ou l'ajout d'autres acides aminés mènent à la perte de l'activité insecticide (Selvapandiyan *et al.*, 2001).

La structure secondaire prédite de la protéine *Vip3* a suggéré que la partie N-terminale est majoritairement construite d'hélices α , alors que la partie C-terminale est riche en hélices β et en coudes. Cependant, la structure tri-dimensionnelle des protéines *Vip3* est encore non élucidée, seuls les derniers 200 acides aminés ont été modélisés et découverts homologues au domaine II des protéines *Cry* (Wu *et al.*, 2007).



Figure 10. Schéma représentatif de la structure des protéines *Vip3* (Doss *et al.*, 2002).

2.3.3.5 Mode d'action des *Vip3*

L'étude du mode d'action des protéines *Vip3* a débuté peu après leur découverte en 1996 par (Estruch *et al*), qui ont proposé que les protéines *Vip3* exercent leur toxicité via un processus différent de celui des protéines *Cry*. Jusqu'à présent, toutes les études rapportées sur le mode d'action des protéines *Vip3*, ont été réalisées avec celles de la famille *Vip3A*, principalement celles de la sous-famille *Vip3Aa* (Chakroun *et al.*, 2016).

Après l'ingestion d'insectes et la digestion de la protéase dans l'intestin moyen, la protoxine tétramère *Vip3* sécrétée, interagit avec les récepteurs présents sur la membrane épithéliale. Une poche est formée entre le corps tétramère et le domaine III et le N-terminal de la protéine, se sépare à travers cette poche en raison de l'interaction entre le C-terminal de la protéine et les récepteurs. De plus, la digestion par la protéase déstabilise l'apex, ce qui conduit à la formation d'une longue spirale enroulée N-terminale qui pénètre dans la bicouche lipidique, un modèle représentatif de mécanisme d'action pour la protéine *Vip3* a été proposé : (A) Les fragments 62-66 kDa ainsi que le fragment ~19-22 kDa peuvent se lier à des récepteurs conduisant à la formation de pores et à la mort cellulaire. (B) Cela signifie que la protoxine *Vip3A* peut se lier aux trois récepteurs spécifiques de l'insecte cible. Par la suite, entrez dans la cellule par endocytose médiée par les récepteurs et activation induite, dommages à l'ADN et perturbation de la membrane mitochondriale induite par les lysosomes, ce qui conduit au processus d'apoptose dans les cellules et finalement à la mortalité des insectes (**Figure 11**) (Gupta *et al.*, 2021). Des études en cours sur la protéine *Vip3Ca* indiquent que cette protéine a un mode d'action similaire à celui des protéines *Vip3A* (Chakroun *et al.*, 2016).

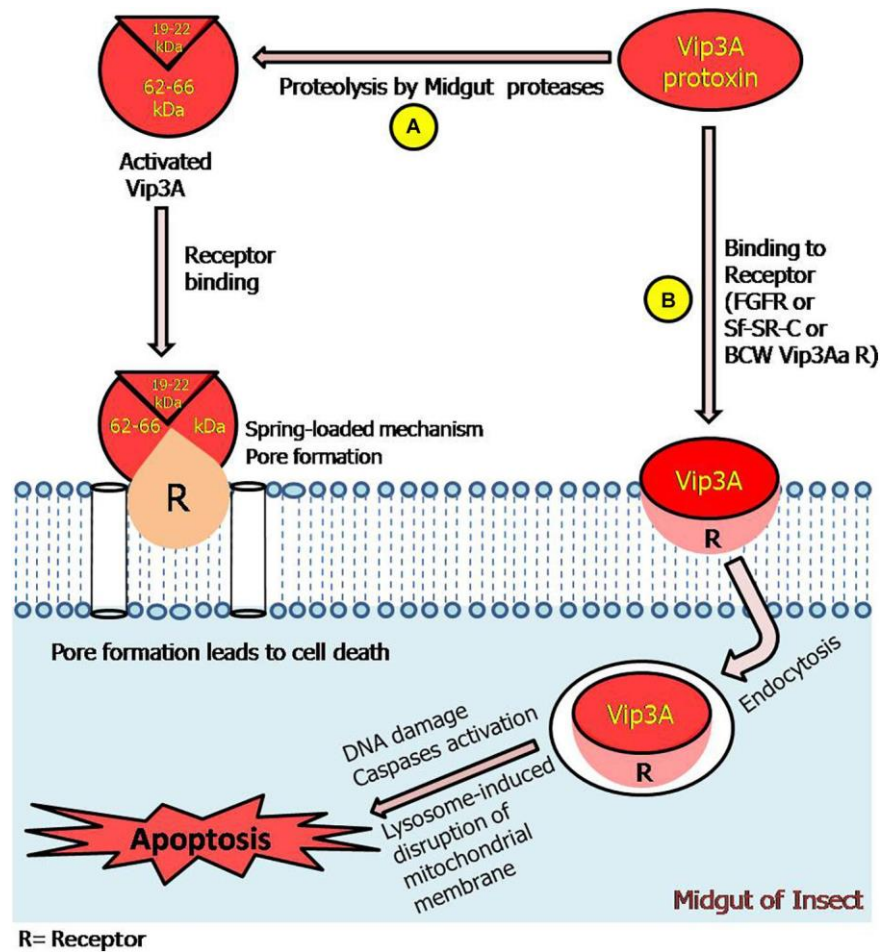


Figure 11. Mécanisme insecticide des protéines *Vip3A* par la formation de pores et l'apoptose (Gupta *et al.*, 2021).

2.4 - Applications biotechnologiques de *Bacillus thuringiensis*

Les agricultures alternatives s'appuient sur la bonne santé des sols et en font un facteur clé du système de production, à ce titre, elles doivent ou devront vérifier le fonctionnement du sol et ajuster leurs pratiques pour en maintenir l'équilibre. Tout comme la recherche peut aider au développement pratique d'une agriculture durable, en sens inverse, les praticiens d'une agriculture plus écologique peuvent faire bénéficier les chercheurs de leurs observations et orienter leurs recherches sur les pratiques culturales pour stimuler la fertilité du sol, la santé des plantes et du milieu (Adjanohoun *et al.*, 2017).

Différentes espèces bactériennes de la famille des *Bacillacées* font depuis longtemps l'objet d'études portant sur leur relation pathogène avec les invertébrés, en particulier les insectes. Ce groupe d'entomopathogènes est bien représenté par *Bacillus thuringiensis*, l'espèce bactérienne la plus étudiée et la plus utilisée commercialement (Ruiu, 2018).

Bacillus thuringiensis est connu comme l'insecticide microbien le plus efficace contre différents ordres d'insectes ravageurs en agriculture. De nombreuses stratégies d'exploitation des toxines insecticides de *B thuringiensis* sont actuellement mises en œuvre : construction de souches améliorées, introduction des gènes de toxines dans des batteries colonisant les plantes, ou directement dans les plantes. L'emploi croissant de ces nouvelles technologies soulève des problèmes écologiques, notamment le risque de sélectionner des populations d'insectes résistants à ces produits (Sanchis *et al.*, 1996).

2.4.1 Les Plantes transgéniques expriment des gènes de *Bacillus thuringiensis*

Ces dernières années ont vu des progrès rapides dans l'application de la biotechnologie moderne, en particulier dans l'agriculture. La superficie mondiale des cultures GM à travers le monde a considérablement augmenté au cours des 20 dernières années en raison de leurs avantages socio-économiques et environnementaux et a atteint 179,7 millions d'hectares en 2015. Les caractères les plus largement utilisés dans le génie génétique des plantes sont la résistance aux herbicides et aux ravageurs. Les gènes de la toxine *Bt* ont été largement utilisés pour améliorer la résistance aux ravageurs dans les cultures (Lacey *et al.*, 2015).

Ces plantes permettant d'atteindre une plus grande diversité d'insectes tels que les insectes suceurs piqueurs et les nématodes, qui n'étaient pas atteints lors d'un traitement biologique simple (Shelton *et al.*, 2002).

Les cultures *Bt* ont amélioré la réduction de l'application de pesticides de plus de 583 millions de kg tout au long de 1996 à 2014. Depuis 1996, 198 variétés GM et lignées de huit plantes *Bt*, dont le maïs, le coton, la pomme de terre, le soja, la tomate, le peuplier, le riz et l'aubergine, ont été approuvées pour la commercialisation (**Figure 12**) (George et Crickmore, 2012).

Le maïs, le coton et la pomme de terre avec 115, 42 et 30 variétés et lignées sont respectivement les cultures *Bt*GM les plus approuvées (base de données d'approbation GM de l'ISAAA 2016). Sept gènes anti lépidoptère *Cry* et *Vip*, y compris *CryIAb*, *CryIA.105*, *CryIAc*, *CryIF*, *Cry2Ab*, *Cry2Ae* et *Vip3A*, ont été utilisés pour améliorer la résistance aux lépidoptères. Les gènes *CryIAb*, *CryIF* et *CryIAc* sont les plus utilisés pour produire des cultures résistantes aux lépidoptères, qui ont été utilisés respectivement dans 61, 51 et 32 variétés GM (Crickmore *et al.*, 1998).

Certaines cultures *Bt* contiennent plus d'un gène *Cry* ou *Vip* (deux ou trois). Ces systèmes de pyramide génique ont été développés pour retarder la résistance potentielle des ravageurs aux

toxines *Bt* produites dans les plantes transgéniques. Cependant, au cours des 20 dernières années après la production commerciale de cultures *Bt*, aucun dommage significatif n'a été prouvé pour elles (Jouzani *et al.*, 2017).

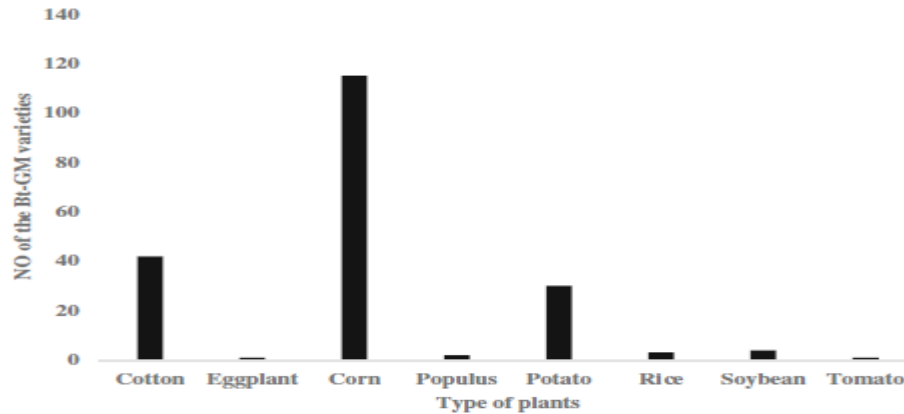


Figure 12. Liste des cultures *Bt* approuvées pour la libération (ISAAA's GM Approval Database in Jouzani *et al.*, 2017).

2.4.1.1 Le maïs *Bt*

Le maïs est la seule culture *Bt* produite commercialement et vendue dans cinq pays européens (Espagne, Portugal, Roumanie, République tchèque et Slovaquie), et est utilisé pour l'alimentation du bétail et comme matériau de rang pour l'industrie de l'amidon. Ces pays produisent environ 173 millions de tonnes de maïs ensilage et 56 millions de tonnes de maïs grain. Une partie des graines de maïs *Bt* est utilisée pour fabriquer des produits alimentaires, comme l'amidon, les cornflakes, le pop-corn, le maïs sucré en conserve, le maïs en épi et l'huile de maïs, car la chaleur élevée utilisée pour produire ces aliments décompose les toxines (Koch *et al.*, 2015).

Il existe des règles dans les pays européens selon lesquelles tous les produits alimentaires à base de maïs *Bt* doivent être étiquetés. Cependant, les États-Unis et le Canada n'ont pas de telles règles et près de 75% de leurs produits de maïs fabriqués sont fabriqués à partir de maïs *Bt*. La culture du maïs *Bt* a commencé aux États-Unis, au Canada et en Europe (Espagne) en 1997, et en 2009, il a été planté commercialement dans 11 pays. Il représentait alors 85% de la superficie totale de maïs aux États-Unis, 84% au Canada, 83% en Argentine, 57% en Afrique du Sud, 36% au Brésil, 20% en Espagne et 19% aux Philippines (James, 2016 in, Abbas, 2018).

En 2016, le maïs GM dans le monde (dans 16 pays) a atteint 60,6 millions d'hectares, dont 6 millions (10%) étaient du maïs *Bt*, 7 millions (11,7%) étaient du maïs tolérant aux herbicides et 47,7 millions (78,7%). Ont été combinés avec du maïs *Bt* et tolérant aux herbicides. La culture

a été produite pour résister à l'infestation par la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*, mais plus tard dans les années 2000, elle a été produite contre le ver de l'épi du maïs, *H.zea*, et la chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera* en plus d'*O. nubilalis* (James, 2016 in, Abbas, 2018).

2.4.1.2 Le coton *Bt*

Pour les producteurs de coton, il y avait beaucoup de pression des ravageurs avant l'introduction du coton *Bt*. En raison de la résistance aux insecticides synthétiques, les agriculteurs perdaient une grande partie de leur coton à cause de *H. virescens* et du ver rose de la capsule, *Pectinophora gossypiella*. (James, 2016 in, Abbas, 2018).

Selon l'USDA, 94% du coton cultivé aux États-Unis est génétiquement modifié. Une étude de l'Université de Californie, a révélé que la réduction moyenne des coûts des pesticides appliqués dans les champs de coton *Bt* de 1996 à 1998 était comprise entre 25 et 65 dollars, le rendement estimé, sur la même période, était en moyenne de 5% supérieur à celui du coton traditionnel. De plus, le coton *Bt* a considérablement réduit le nombre de pulvérisations foliaires contre d'autres ravageurs du coton, et par conséquent le coût des insecticides (Stewart in Abbas, 2018).

Le coton *Bt* a été largement adopté aux États-Unis par les agriculteurs de la ceinture cotonnière occidentale pour le ver rose de la capsule et par les agriculteurs du centre-sud et du sud-est principalement pour la tordeuse du tabac et dans une moindre mesure pour la légionnaire d'automne, *Spodoptera frugiperda* et *S. exigua* (Stewart in Abbas, 2018).

En 1996, le coton Bollgard (une marque déposée de Monsanto Company) a été le premier coton *Bt* à être commercialisé aux États-Unis. Il produisait la toxine *CryIAc* avec une forte activité sur la tordeuse du tabac et la tordeuse rose. Bollgard II a été introduit en 2003, représentant la prochaine génération de coton *Bt*. Il produisait la toxine *Cry2Ab*. Le coton Wide Strike (une marque déposée de Dow Agro-sciences) a été produit en 2004 contenant *CryIAc* et *CryIF*. Le Bollgard II et le Wide Strike ont tous deux une meilleure activité sur un large éventail d'insectes chenilles que le Bollgard original (Stewart in Abbas, 2018). La 3ème génération la plus récente de coton *Bt* contenait trois gènes : Bollgard 3 (*CryIAc* + *Cry2Ab* + *Vip3A*), Twin Link Plus (*CryIAb* + *Cry2Ac* + *Vip3Aa19*) et Wide Strike 3 (*CryIAc* + *CryIF* + *Vip3A*) (Wang *et al.*, 2002).

Le coton *Bt* est la seule culture *Bt* cultivée dans les pays en développement. En Inde et en Chine, la superficie cultivée de coton *Bt* a fortement augmenté en 2006 et 2007 pour atteindre 2,5 millions d'hectares. En 2016, la superficie totale mondiale de coton était de 35 millions d'hectares (dans 18 pays), dont 22,3 millions (64%) étaient du coton GM. Aux États-Unis, cependant, la

superficie totale de coton était de 4 millions d'hectares et dont 3,2 millions d'hectares (80%) étaient du coton combiné *Bt* et tolérant aux herbicides, Les variétés de maïs *Bt* et de coton *Bt* enregistrées aux États-Unis produisaient dix-huit combinaisons différentes de onze toxines *Bt*. Chaque variété produit un à six toxines *Bt* qui tuent les chenilles, les coléoptères ou les deux (Tabashnik *et al.*, 2009).

2.4.2 Les Bio Insecticides A Base De *Bacillus thuringiensis* :

Bcillus thuringiensis est utilisés depuis plus de 50 ans pour produire des insecticides biologiques pour application foliaire, ces produits étaient et sont toujours produits par fermentation de souches *Bt* uniques dans des milieux bruts bon marché. Généralement, la première étape du processus de fabrication d'un bio-insecticide *Bt* consiste à concentrer les solides de fermentation (spores de cristaux de delta-endotoxine et composants de milieu particulière inutilisés) par centrifugation. Parfois, la dialyse à flux tangentiel est également utilisée pour concentrer davantage les solides avant le séchage par atomisation. Le matériau séché est ensuite broyé à une taille uniforme pour produire une poudre technique qui peut ensuite être formulée de diverses manières. (Koziel *et al.*, 1993). Les formulations de *Bt* peuvent être globalement classées en deux groupes : les formulations solides (poussières, granules, poudres, briquettes) et les formulations liquides (suspensions ou émulsions) (Rhodes, 1993).

Les formulations solides, incluant les poussières et les poudres humides, comportent principalement des adhérents et des déshydratants et sont très utilisées pour le contrôle de la pyrale du maïs (McGaughey, 1985). Les granules sont faits à partir de la farine de blé, de la fécule de maïs, de la gélatine et de plusieurs autres matériaux (Maldonado *et al.*, 2002). Les briquettes sont un type de formulation flottante faites avec des matériaux comme la farine de blé et sont couramment utilisées pour les formulations de *Bti* (Mittal, 2003). Les suspensions liquides comportent les concentrés liquides qui ne sédimentent pas à cause de l'agglomération réversible par les agents de dispersion. Elles comportent aussi des agents tensio-actifs qui agissent comme des agents mouillants favorisant la pulvérisation (Burgess, 1998). Il y a également des émulsions huile/eau et eau/huile dont l'usage domestique ou agricole est restreint (Brar *et al.*, 2006).

- **En forêts**

En 1971, en France, 670 hectares de mélèzes ont été traités à l'aide d'une seule pulvérisation de spores-cristaux de *Bt* pour lutter contre la tordeuse grise du mélèze *Zeiraphera diniana*. L'application a été faite alors que les insectes étaient au troisième stade larvaire et que les dégâts n'étaient pas encore apparents. L'efficacité immédiate du traitement a pu être chiffrée aux alentours

de 80 %, ce qui a eu pour effet de maintenir la population de tordeuse en dessous du seuil de nuisance. En Amérique du Nord, *Bt* est utilisé à une tout autre échelle : ainsi de 1985 à 1988, près de 2,9 millions d'hectares de forêt ont été traités avec différentes formulations de *Bt* contre *Choristoneura pinus pinus*, *Choristoneura fumiferana*, *Lymantria dispar*, et *Lambdina fiscellaria*, de bons résultats sont obtenus si l'application aérienne est faite au moment opportun au cours du cycle de l'insecte et si les conditions atmosphériques après la pulvérisation sont favorables. (Sanchis *et al.*, 1995).

- **En vignoble et arboriculture**

En Suisse, des essais ont été réalisés en micro parcelles de vigne pour lutter contre les tordeuses. Plusieurs produits formulés ont été utilisés, en ajoutant ou non une solution sucrée aux suspensions bactériennes, en comparaison avec le parathion. L'efficacité (mortalité) sur *Lobesia botrana* (eudémis) et sur *Eupoecilia ambiguella* (cochylis) a été la suivante : BT Delfin : 97%, MVP : 94%, Turex : 89%, Bactecl : 85%, parathion : 96%. Les deux premiers produits ont montré une efficacité semblable à celle du parathion, la solution sucrée améliore les résultats. (Sanchis *et al.*, 1995).

- **En grandes cultures**

Des traitements contre *Heliothis armigera* ont été réalisés sur cotonnier, en Palestine, lors d'une très forte infestation de ce lépidoptère en 1985. *Bt* s'est bien comporté par rapport à un insecticide chimique et, après 5 jours, la population du ravageur a été ramenée à quatre à huit larves par rangée de 2 mètres dans les deux cas, avec l'avantage pour le biopesticide de préserver les ennemis naturels du ravageur. (Sanchis *et al.*, 1995).

- **En cultures maraîchères**

Une comparaison de l'efficacité, du prix de revient et des bénéfices entre un programme insecticide par lutte chimique classique et par *Bt* a été réalisée au Mexique, sur culture de tomates au cours des années 1992 et 1993. Les dommages dus à trois espèces de ravageurs principaux *Keiferia lycopersicella* (lépidoptère), *Helicoverpa zea* (lépidoptère) et *Macrosiphum euphorbiae* (hyménoptère) furent réduits dans les parcelles traitées avec *Bt*, mais les bénéfices bruts furent légèrement inférieurs à ceux des parcelles traitées avec le méthomyl et la perméthrine. Cependant, le nombre de traitements du programme *Bt* fut inférieur à celui du programme de lutte chimique. Le coût des traitements est donc beaucoup plus bas avec *Bt*, notamment en ce qui concerne la main d'œuvre et l'eau. Les bénéfices nets sont relativement proches pour les deux modes de traitement.

De plus, selon les auteurs, d'autres bénéfices sont attendus, à plus long terme, en utilisant le programme de lutte avec *Bt* (Sanchis *et al.*, 1995) :

- Réduction du tassement du sol par des passages moins fréquents d'engin de pulvérisation.
- Réduction substantielle de la contamination de l'environnement.
- Avantages potentiels dans la commercialisation des fruits produits.
- Utilisation de produits moins toxiques pour les mammifères.

2.4.3 Microorganismes recombinants expriment des gènes *Bacillus thuringiensis*

Des laboratoires de biotechnologies, ont développé différentes souches de bactéries transformées pour exprimer les gènes insecticides *Cry*. La première bactérie dans laquelle des gènes de protéines *Bt* ont été clonés est *Escherichia coli*, bactérie facilement manipulable génétiquement. Cependant, cette dernière présente de faibles rendements d'expression à cause de divers facteurs de régulation (Broadwell, 1994). Alors, la société Mycogen aux Etats-Unis a développé à des fins agricoles, une souche de *Pseudomonas* dans laquelle un gène de *Btk* a été incorporé de façon stable. Lorsqu'elle meurt, cette souche conserve sa membrane cellulaire intacte ce qui protège les cristaux des rayonnements solaires. Ainsi, les performances sur le terrain sont accrues (Watkinson, 1994).

Une seconde stratégie, afin de mieux exploiter ou augmenter le potentiel entomopathogène de *Bt*, a consisté à diversifier ou à améliorer le mode d'administration de la toxine, en utilisant les outils fournis par le développement de la biotechnologie. Cette approche, a été suivie par de nombreux laboratoires, qui ont cherché à faire exprimer les gènes codant pour les delta-endotoxines dans des hôtes divers, naturellement présents dans les mêmes niches écologiques que les insectes que l'on cherchait à atteindre. Des gènes de delta endotoxines ont été introduits chez *Azospirillum*, *Pseudomonas cepacia* et *Pseudomonas fluorescens* (trois bactéries qui colonisent naturellement les racines et le feuillage de nombreuses plantes) et dans *Rhizobium leguminosarum*, une bactérie symbiotique et fixatrice d'azote qui forme des nodules sur les racines de nombreuses Légumineuses (Sanchis *et al.*, 1996).

Une autre approche, développée par Crop Genetics International, consiste à transformer par un gène de *Bt* une bactérie endophyte, *Clavibacter xyli ssp. cynodontis*. L'imprégnation des graines de maïs par cette bactérie permet la colonisation du système vasculaire de la plante adulte, la protégeant alors contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Watkinson, 1994).

Cependant, les meilleurs hôtes pour ces gènes restent les *Bacillus*. Donc, en clonant ces gènes dans d'autres espèces de *Bacillus* comme *Bacillus sphaericus*, le spectre d'hôtes peut être augmenté avec des possibles actions synergiques entre les toxines et les spores (Broadwell, 1994).

PARTIE II

Matériels Et Méthodes

1 Banques de données

1.1 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

The National Center for Biotechnology Information (NCBI), a été créé en 1988 à la National Library of Medicine (NLM) aux États-Unis, pour développer des systèmes d'information pour la biologie moléculaire (Sayers *et al.*, 2012). Elle héberge plusieurs bases de données d'archives primaires qui stockent de nombreuses catégories de données biologiques produites par la communauté scientifique. Les types de données incluent, les génomes complets et partiels, les transcriptomes, les épigénomes, la variation génétique et les données phénotypiques. Les bases de données d'archives (NCBI) et International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) hébergeant ces données comprennent GenBank, SRA, GEO, Epigenomics, dbSNP, dbVar et dbGaP (Barrett *et al.*, 2012). La mission du NCBI est de développer de nouvelles technologies de l'information pour aider à la compréhension des processus moléculaires et génétiques fondamentaux qui contrôlent la santé et les maladies. Il a été mis en place pour effectuer ces quatre tâches principales citées sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Jenuth, 2000).

1.2 PDB (protein Data Bank)

Le référentiel mondial unique des structures 3D, déterminées expérimentalement de macromolécules biologiques et de leurs complexes a été créée en 1971, devenant la première ressource numérique en libre accès en sciences biologiques. Les archives de la PDB contiennent environ 130000 entrées. La PDB archive les données expérimentales, les métadonnées associées et les modèles structuraux au niveau atomique 3D dérivés de trois méthodes bien établies : la cristallographie, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie électronique (3D) (Burley, 2017).

1.3 Universal Protein Resource (UniProt)

Universal Protein Resource, Fournit une ressource centrale stable, complète et librement accessible sur les séquences protéiques et l'annotation fonctionnelle. Le Consortium UniProt est une collaboration entre l'Institut Européen de Bioinformatique (EBI), le Protein Information Resource (PIR) et le Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). Les activités principales comprennent la curation manuelle des séquences de protéines assistée par l'analyse informatique, l'archivage des séquences, le développement d'un site Web UniProt convivial et la fourniture d'informations à valeur ajoutée supplémentaires par le biais de références croisées à d'autres bases de données.

UniProt est composé de quatre composants principaux, chacun optimisé pour différentes utilisations : la base de connaissances UniProt, les clusters de référence UniProt, l'archive UniProt et la base de données UniProt Metagenomic and Environmental Sequences. UniProt est mis à jour et distribué toutes les trois semaines (UniProt Consortium, 2007).

2 *Bacillus thuringiensis* et les gènes de virulence aux insectes

2.1 *Bacillus thuringiensis*

En premier lieu nous avons consulté le portail NCBI, pour examiner l'actualité des travaux de recherches scientifiques sur *Bacillus thuringiensis*. Donc sur la barre de recherche nous avons introduit le mot clé *Bacillus thuringiensis*, qui nous a permis de cibler les gènes de la souche *Bacillus thuringiensis.spp israelensis*, objet de notre analyse.

2.2 Les gènes de virulence

- Type-1AA cytolytic delta-endotoxin (*Cyt1Aa*) (Bukto, 2003), décrit sous le numéro d'accès NC_010076.1.
- pesticidal crystal protein (*Cry4Ba*) (Boonserm *et al.*, 2006), décrit sous le numéro d'accès NC_010076.1.

Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le mécanisme de virulence aux insectes de la famille des diptères (mouches noires, moustiques) (Schnepf et Whiteley, 1981).

3 Analyse *in silico*

La recherche a été faite selon la nomenclature des gènes (*Cry4Ba*, *Cyt1Aa*) dans la base de données NCBI. Des Séquences génomiques ont été alignées sur **FASTA** et comparées sur **BLASTn**.

3.1 Exécution FASTA

FASTA « Fast Adaptive Sharinkage Thresholding Algorithm », D'après (Charlebois *et al.*, 2007), les fichiers FASTA sont très utilisés pour annoter les séquences en bio-informatique et sont requis par plusieurs programmes. Un fichier FASTA contient une ou plusieurs séquences, soit de nucléotides ou d'acides aminés. Chaque séquence est précédée d'une ligne débutant par le symbole suivi d'un entête contenant normalement le nom de la séquence et les informations complémentaires qu'on veut y ajouter. Ensuite la séquence est écrite en entier sans autre annotation.

Nous avons introduit la nomenclature des gènes *Cyt1Aa* et *Cry4Ba*, et exécuter une recherche pour obtenir le format FASTA de la séquence génétique de ces gènes.

3.2 Exécution BLASTn

BLAST « Basic Local Alignment Search Tool », Est un programme couramment utilisé pour trouver des régions d'homologie entre différentes séquences, La comparaison peut être effectuée sur de grandes banques de séquences disponibles sur internet comme NCBI, ou sur des banques de séquences locales, cet algorithme de recherche est à la fois rapide et sensible (Charlebois *et al.*, 2007) :

- Blastn est utilisé pour chercher des séquences nucléiques avec une requête Nucléique.
- Blastp est utilisé pour les protéines.
- Blastx sert à comparer une requête en acide aminée traduite en protéine à une base de données de protéines.
- tBlastn sert à comparer une requête de protéine sur une banque nucléique traduite.
- tBlastx sert à comparer une requête nucléique traduite à une banque nucléique traduite.

Après avoir obtenu le format FASTA des deux gènes, BLAST a été exécuté et nous a permis d'avoir une liste de séquences nucléotidiques réarrangées par ressemblance décroissante avec un ensemble d'autres séquences similaires.

En plus d'effectuer des alignements, BLAST fournit des informations statistiques sur un alignement ; il s'agit de la valeur « attendue » ou du taux de faux positifs. La comparaison de séquences repose sur des calculs matriciels ou des algorithmes complexes qui rendent des résultats sous forme de données statistiques (% match, E-value...) (Altschul *et al.*, 1990).

a) E- value

Logiciel BLAST caractérise chaque alignement par une e-valeur, qui est calculée en fonction du score brut, de la longueur des séquences alignées, et de la taille de la base de données (Rasko *et al.*, 2005). La E-valeur est destinée à fournir un « moyen pratique de créer un seuil de signification pour la communication des résultats ». En effet, cette option a été largement utilisée dans de nombreuses études depuis près de trois décennies, maintenant pour limiter la recherche de similarité de séquence à un seuil significatif, et pour identifier une similarité significative partagée entre deux séquences. De nombreux utilisateurs supposent que les résultats d'alignement BLAST avec des e-valeur inférieures ou égales au seuil prédéfini sont identifiés une fois la recherche terminée, dans une étape finale pour classer tous les alignements par e-valeur, de la plus petite (en

haut de la liste des résultats) à la plus grande e-valeur (en bas de la liste) (González-Pech *et al.*, 2019), la e-valeur la plus faible qui tende vers le zéro et la plus intéressante.

b) Alignement

L'opération d'alignement consiste à faire apparaître le possible cheminement d'une évolution d'une séquence par rapport à une autre ou des deux séquences par rapport à un hypothétique ancêtre commun. L'opération d'alignement consistera donc à mettre en regard les caractères de deux séquences S1 et S2 de manière à ce que les séquences se correspondent le mieux possible. Les séquences n'étant de manière générale pas strictement identiques on autorise le décalage des caractères en insérant des espaces (ou gap) dans les séquences. Un alignement peut être construit grâce à quatre opérations de base (Pearson, 2013) :

- **L'appariement (match)** : un caractère de la première séquence est mis en regard d'un caractère identique dans la deuxième séquence.
- **La substitution (miss match)** : un caractère de la première séquence est mis en regard d'un caractère différent dans la deuxième séquence.
- **Espace (Gap)** : L'insertion d'un gap dans S1 L'insertion d'un gap dans S2.

c) Similarité

Deux séquences sont dites similaires si elles sont relativement proches sans toutefois être identiques, elle permet d'avoir une idée sur la fonction d'une protéine codée par un gène si la fonction d'une séquence similaire est connue (Altschul *et al.*, 1990).

d) Homologie/ analogie

L'homologie est la relation de deux caractères ; inclure génique (moléculaire), structurel (morphologique), des caractères fonctionnels (métaboliques, régulateurs et comportementaux) qui sont issus, généralement avec divergence, d'un caractère ancestral commun. L'analogie se distingue d'homologie, c'est une relation de deux caractères qui descendent de manière convergente d'ancêtres non apparentés (Fitch, 2000).

3.3 Construction de l'arbre phylogénétique

L'outil BLAST nous offre la possibilité de construire un arbre phylogénétique, selon deux méthodes (Neighbor joining, Minimum Evolution) dans notre analyse on a travaillé avec la méthode (NJ).

3.3.1 Arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique (phylogénie) est une forme de classification des espèces. Cette classification traduit les relations de descendance des espèces avec modification de leurs caractères. Les caractères sont transmis d'une génération à l'autre à travers les mécanismes d'hérédité. Un arbre est composé de quatre éléments principaux (Stuessy, 1983) :

- La racine, désignant l'ancêtre commun des espèces représentées dans l'arbre.
- Les nœuds externes ou feuilles qui représentent les unités taxonomiques (les espèces) dont les informations ont été utilisées lors de la construction de l'arbre.
- Les nœuds internes, représentant des ancêtres hypothétiques.
- Les branches qui montrent les relations de descendance entre les nœuds de l'arbre.

3.3.2 La méthode de Neighbor-joining (NJ)

La méthode Neighbor-joining, est proposée pour reconstruire des arbres phylogénétiques à partir de données de distance évolutive. Le principe de cette méthode est de trouver des paires d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU) qui minimisent la longueur totale des branches à chaque étape de regroupement des OTU en commençant par un arbre en forme d'étoile. Les longueurs de branches ainsi que la topologie d'un arbre parcimonieux peuvent être obtenues rapidement en utilisant cette méthode (Saitou *et al.*, 1987), qui a été inspirée à partir de la méthode UPGMA (Sokal et Sneath, 1963).

3.3.3 La méthode minimum évolution

La méthode à évolution minimale (ME), est basée sur l'hypothèse que l'arbre avec la plus petite somme d'estimations de longueur de branche est le plus susceptible d'être le vrai (Rzhetsky et Nei, 1992).

3.4 Déterminations de la structure 3D

Nous avons consulté la base de données PDB. La recherche des structures protéiques 3D a été faite selon la nomenclature des protéines Type-1AA cytolytic delta-endotoxin (*CytIAa*), et pesticidal crystal protein (*Cry4Ba*).

La Structure 3D est l'organisation d'éléments de structure secondaire, qui forment des arrangements géométriques spécifiques, c'est la forme que prend la protéine dans l'espace. Le repliement en structure tertiaire a pour effet de rapprocher spatialement des acides aminés fortement éloignés au niveau de la séquence, ce rapprochement rend possible le positionnement

très précis des chaînes latérales pour assurer une activité optimale de la protéine (fixation plus aisée de substrats ou de coenzymes (de Bolle *et al.*, 1995).

Partie III

Résultats Et Discussion

1 Résultats

1.1 Travaux de recherche sur *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis, est une espèce très étudiée sur les plans scientifique et académique de recherche ce qui a fait d'elle un modèle dans les applications de lutte biologique, ses travaux sont publiés sur la base de données NCBI.

En plus de maintenir la base de données de séquences d'acides nucléiques « GenBank », le National Center for Biotechnology Information (NCBI) fournit des ressources d'analyse et de récupération pour les données de GenBank et d'autres données biologiques mises à disposition sur le site Web du NCBI. Les ressources NCBI incluent PubMed, PubMed Central (PMC), Gene, le navigateur de taxonomie NCBI, BLAST, BLAST Link (BLink), RefSeq, UniGene, HomoloGene, ProtEST, dbSNP, Epigenomics, Genome and related tools, the Map View, Sequence Read Archive, BioProject, BioSample... etc (**Tableau 2**).

1.2 Gène *CytIAa*

D'après les résultats obtenus à partir de la base de données NCBI, nous avons choisi le gène *CytIAa* (**Figure 13**), le gène plasmidique Type-1AA cytolytic delta-endotoxin (*cytIAa*) décrit selon la séquence génomique NC_010076.1, qui est localisé de 17,372 à 18,121 k et de longueur de 750 nt (127,923 bp) (**Figure 14**).

A partir de la représentation graphique du gène, le fichier FASTA, a permis d'obtenir une suite de lettres stockées sous forme texte (**Figure 15**).

Après l'exécution BLASTn nous avons obtenu un tableau de séquences d'alignement significatif qui présente la ressemblance entre la séquence génétique (*CytIAa*) de *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* et d'autres séquences similaires par des valeurs dites des E-value (**Tableau 3**).

La construction des arbres phylogénétiques dépend principalement des E-value obtenues d'après les alignements, sachant que la E-value la plus faible est considérée comme la plus intéressante, cela nous a permis de construire deux arbres phylogénétiques : un premier arbre global (**Figure 16**) et un autre arbre des E-value ~ 0 (**Figure 17**).

Tableau 2. Enregistrement de travaux de *Bacillus thuringiensis* aux différentes bases de données.

Data base	Enregistrements	Data source
Littérature		
– Livres	217	collaboration/agreement, internal NCBI /NLM curation.
– Pub Med	9 339	collaboration/agreement.
– Pub Med central	12 023	collaboration/agreement.
Gènes		
– Gènes	15 169	collaboration/agreement, internal NCBI /NLM curation.
– GEO data sets	138	Internal NCBI /NLM curation.
Protéines		
– Proteine	3 749 720	
– Modèles de familles de protéins	60	collaboration/agreement, internal NCBI /NLM curation.
– structure	137	
Génome		
– Assemblée	664	Gen Bank
– Bioprojet	350	Gen Bank
– Echantillon biologique	1 381	Internal NCBI /NLM curation.
– Génome	1	collaboration/agreement, internal NCBI /NLM curation.
– Taxonomie	1	
– Nucléotide	272 342	collaboration/agreement, internal NCBI /NLM curation. Gen Bank
Pubchem		
– Essais biologiques	141	Gen Bank
– Composés	3	internal NCBI /NLM curation
– Substances	33	Gen Bank

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> A4U42_RS11355 ID: 43519177	type-1Aa cytolytic delta-endotoxin [<i>Dickeya solani</i> IPO 2222]		A4U42_RS11355, A4U42_11365
<input type="checkbox"/> BTF1_32111 ID: 13505499	type-1AA cytolytic delta-endotoxin [<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789] ⚠ discontinued	NC_018510.1 (60495..61244)	BTF1_32111
<input checked="" type="checkbox"/> cyt1AA ID: 5759908	type-1AA cytolytic delta-endotoxin [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>] ⚠ discontinued	NC_010076.1 (17372..18121, complement)	pBt021, cytA
<input type="checkbox"/> DDA3937_RS02205 ID: 9731854	type-1Aa cytolytic delta-endotoxin [<i>Dickeya dadantii</i> 3937]	NC_014500.1 (489535..490194, complement)	DDA3937_RS02205, Dda3937_01342
<input type="checkbox"/> DSOIPO2222_RS02050 ID: 23245038	type-1Aa cytolytic delta-endotoxin [<i>Dickeya solani</i> IPO 2222] ⚠ discontinued		DSOIPO2222_RS02050
<input type="checkbox"/> FJR70_RS32115 ID: 50623629	type-1Aa cytolytic delta-endotoxin [<i>Bacillus tropicus</i>] ⚠ discontinued		FJR70_RS32115, FJR70_32090

Figure 13. Résultat de la recherche du gène *Cyt1Aa*.

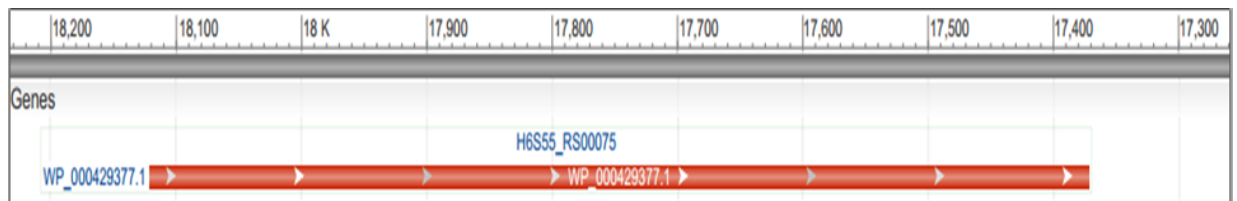


Figure 14. Représentation graphique de la séquence du gène *Cyt1Aa*.

```
>NC_010076.1:c18121-17372 Bacillus thuringiensis serovar israelensis plasmid pBtoxis,
complete sequence
ATGGAAAATTTAAATCATTGTCCATTAGAAGATATAAAGGTAATCCATGGAAAACCCCTCAATCAACAG
CAAGGGTTATTACATTACGTGTTGAGGATCCAAATGAAATCAATAATCTTCTTTCTATTAACGAAATTGA
TAATCCGAATTATATATTGCAAGCAATTATGTTAGCAAAATGCATTTCAAAATGCATTAGTTCCACTTCT
ACAGATTTTGGTGATGCCCTACGCTTTAGTATGCCAAAAGGTTAGAAATCGCAAACACAATTACACCGA
TGGGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGATCAAAATGTAACCTCAAACGAATAACCAAGTAAGTGTATGATTAA
TAAAGTCTTAGAAGTGTAAAAACTGTATTAGGAGTTGCATTAAGTGGATCTGTAATAGATCAATTAAC
GCAGCAGTTACAAATACGTTTACAAATTTAAATACCTCAAAAAAATGAAGCATGGATTTTCTGGGGCAAGG
AAACTGCTAATCAAACAAATTACACATACAATGTCCGTGTTTGCAATCCAAAATGCCCAAACGGTGCCGT
TATGTATTGTGTACCAGTTGGTTTTGAAATTAAGTATCAGCAGTAAAGGAACAAGTTTTATTTTTACA
ATTCAAGATTCTGCGAGCTACAATGTTAATCAATCTTTGAAATTTGCACAACCATTAGTTAGCTCAA
GTCAGTATCCAATTGCAGATCTTACTAGCGCTATTAATGGAACCCCTCTAA
```

Figure 15. Format FASTA du gène *Cyt1Aa* chez *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Tableau 3. Liste des séquences d'alignement significatif (*Cyt1Aa*).

Description	Scientific Name	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FDAARGOS_796 plasmid unnamed4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP053973.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain AM65-52 insecticidal crystal protein Cyt1Aa (cyt1Aa).gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	MK184474.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain JW-1 cytolytic protein 1 (cyt1).gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	MN539643.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain JW-1 plasmid p4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP045026.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BT-59 plasmid p4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP039725.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain T0139 plasmid pT0139-4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP037468.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain T0131 plasmid pT0131-4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP037456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain Bti plasmid pT0124-4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP037887.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain 1.24 plasmid pT0124-4_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	KY352353.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis plasmid pBTI-6 DNA_complete_sequence_strain_HD522	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	LC128536.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain AM65-52 plasmid pAM65-52-4-128K_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP013279.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain ISPC-12 Cyt1Aa (cyt1Aa).gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	MT995838.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis HD-789 plasmid pBTHD789-3_complete_sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP003766.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis subsp. israelensis plasmid pBtoxis	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	AI731825.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis var. israelensis gene for delta endotoxin	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	X04338.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis gene for crystal protein (Mr 28.000)	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	X03182.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis gene for 27 kDa crystal protein	Bacillus thuringi...	0.0	99.87%	Y00135.1
<input checked="" type="checkbox"/> B.thuringiensis 27.3 Kd cytolytic insecticidal protein gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.87%	M35968.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain PBT602 megaplasmid Cyt gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.73%	AY913951.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain LLP29 cytolytic toxin Cyt1 gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.73%	DQ302752.2
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain BRC-HQY1 cytolytic toxin Cyt1 (cyt1).gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.60%	KF152888.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain BUPM98 cytolytic protein Cyt1A98 (cyt1A98).gene_complet...	Bacillus thuringi...	0.0	99.60%	JF445289.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis Cyt1A97 (cyt1A).gene_cyt1A97 allele_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.60%	EF656359.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain LBIT-107 Cyt1-like protein gene_complete_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.60%	MF893205.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain QBT229 Cyt1A (cyt1A).gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.16%	MG708177.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis subsp. israelensis pBtoxis plasmid_subclone pTOX11a	Bacillus thuringi...	0.0	95.50%	AJ296639.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis subsp. medellin cyt2Bc gene for Cyt2Bc protein	Bacillus thuringi...	0.0	88.02%	AJ251979.1
<input checked="" type="checkbox"/> B.thuringiensis cyt1Ab1 gene	Bacillus thuringi...	0.0	87.88%	X98793.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FWO dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt) gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EF649750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FGW2 dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt).gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EF649749.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BYW2 dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt).gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EF649746.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DDN dipterans toxic crystal protein-like protein (cyt).gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EF649748.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain 14-1 Cyt1 protein gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	99.10%	EU917076.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain 187 Cyt1 gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EJ009211.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain IPS-82 Cyt1 gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EJ009210.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis/tochigiensis cyt1 gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EF182767.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain 1897 Cyt1 protein gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	98.85%	EU917077.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis cytolytic insecticidal protein 1 (cyt1Aa).gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	0.0	98.58%	DQ200984.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain SY1-1 Cyt1 protein gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	6e-135	87.47%	EU917074.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain Y-5 Cyt1 protein gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	1e-102	85.68%	EU917075.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain NX-4 Cyt1 protein gene_partial_cds	Bacillus thuringi...	1e-47	75.79%	EU917073.1
<input checked="" type="checkbox"/> cytA=28 kda crystal protein...cryIVD=68 kda crystal protein (intergenic region)[Bacillus thuringiensis_ssp_is...Bacillus thuringi...	Bacillus thuringi...	7e-15	100.00%	S78174.1

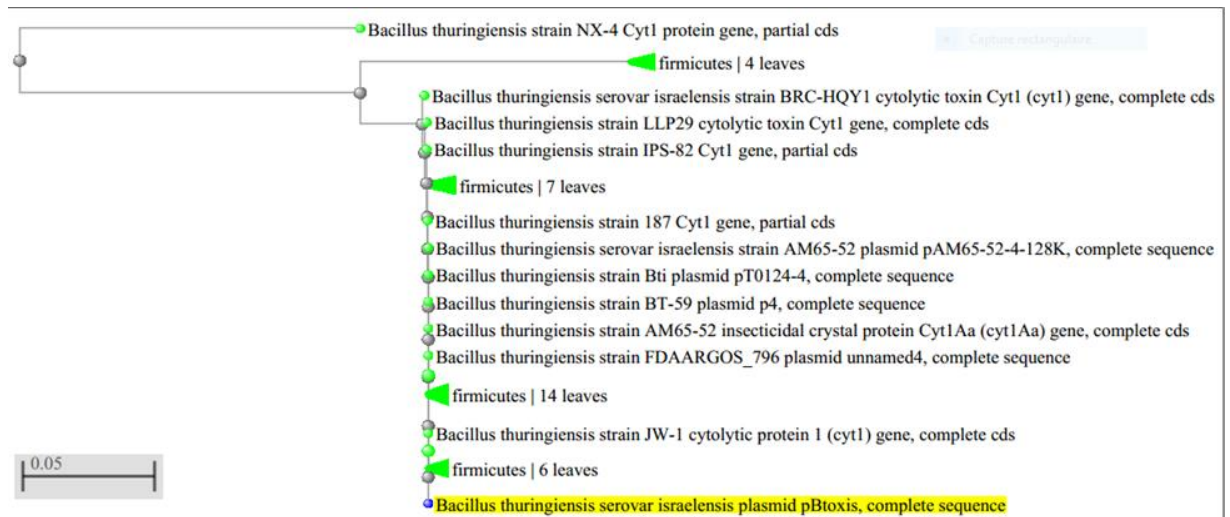


Figure 16. Arbre phylogénétique global du gène (*Cyt1Aa*) qui code pour la virulence chez *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*, l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.

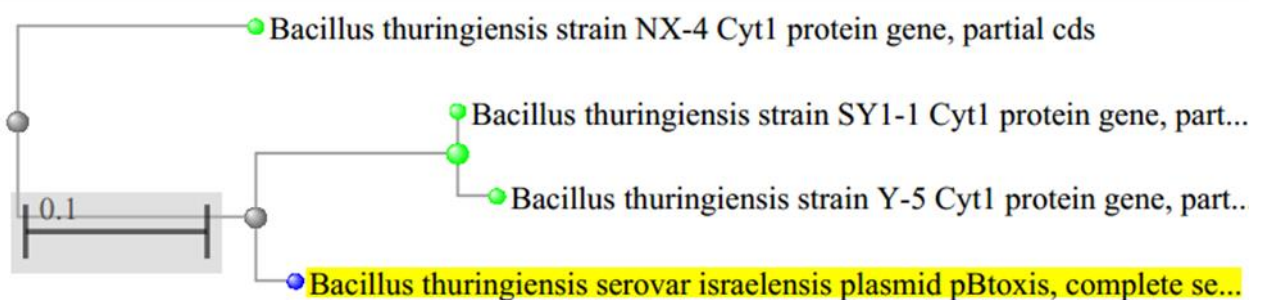


Figure 17. Arbre phylogénétique (E-value ~ 0) du gène (*Cyt1Aa*) qui code pour la virulence chez *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*, l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.

D'après les informations collectées à partir de la base de données PDB et Uniprot, la structure de la protéine cytolytique a été déterminée (**Figure 18**).

The screenshot shows the PDB website interface. At the top, the search bar contains the query "type-1Aa cytolytic delta-endotoxin". Below the search bar, the "Advanced Search Query Builder" section is visible. The search results are displayed in a table with columns for "Refinements", "Summary", "Gallery", "Compact", and "Tabular Report". The first result is for the entry 3RON, titled "Crystal Structure and Hemolytic Activity of the Cyt1Aa Toxin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis". A 3D ribbon diagram of the protein structure is shown next to the entry details. The details include the authors, journal reference, release date, method, organism, and macromolecule name.

Figure 18. Résultats de recherche de la structure protéiques 3D (*Cyt1Aa*) sur le portail PDB.

La protéine cytolytique codé par le gène plasmidique *Cyt1Aa*, et de longueur 249 acide aminé et de masse 27341 Da. Cette protéine présente une structure manométrique globale à un seul domaine d'architecture α/β avec des feuillets β au centre entouré de deux couches α -hélicoïdales. La feuille β centrale se compose de six brins β antiparallèles, flanqués d'une couche d'hélice α composée de $\alpha 1$ et $\alpha 2$ d'un côté et de $\alpha 3$ - $\alpha 5$ de l'autre côté. L'alignement des séquences révèle qu'il y a quatre blocs : (I) Bloc 1, hélice $\alpha 1$; (II) bloc 2, région $\alpha 5$ à $\beta 5$; (III) Bloc 3, région $\beta 6$ - $\beta 7$; (IV) Bloc 4, région $\alpha 6$ - $\beta 8$. Dans *Cyt1Aa*, l'ensemble structurel $\beta 2$ - $\beta 3$ entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est commune à tous les membres de la famille *Cyt1*. La structure $\beta 6$ - $\beta 8$ de *Cyt1Aa* se compose d'une topologie modifiée de « Greek-key » suivie du brin $\beta 4$ (Xu *et al.*, 2014). Les liaisons qui maintiennent cette structure stable sont représentées par différentes couleurs. (H1-S2 bleu nuit, H2-S4 bleu ciel, H3-H4 bleu turquoise, H4-S7 vert, H5-S12 orange, N-terminal –S1 violet, S1-H1 mauve, S13- C-terminal rouge-brique, S2-S3 bleu, S6-H3 bleu-vert, S9-S10 vert menthe (**Figure 19**).



Figure 19. Structure 3D de la protéine cristalline *Cyt1Aa* de *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*.

1.3 Gene *Cry4Ba*

D'après les résultats obtenus à partir de la base de données NCBI nous avons choisi le gène *Cry4Ba* (**Figure 20**), Le gène plasmidique pesticidal crystal protein (*Cry4BA*) décrit selon la séquence génomique NC_010076.1, qui est localisée de 32597 à 36007 K et de longueur de 3,411 nt (127,923 bp) (**Figure 20**).

A partir de la représentation graphique du gène (**Figure 21**), le fichier FASTA, a permis d'obtenir une suite de lettres stockées sous forme texte (**Figure 22**).

Après l'exécution BLAST on a obtenu un tableau de séquences d'alignement significatif qui présente la ressemblance entre la séquence génétique (*Cry4Ba*) de *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* et d'autres séquences similaires par des valeurs dites des E-value (**Tableau 4**).

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input checked="" type="checkbox"/> BT8 ID: 5759934	pesticidal crystal protein cry4BA [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>] ⚠ discontinued	NC_010076.1 (32597..36007)	pBt038, cry4BA, cryD2, cryIVB(A), isrH3
<input type="checkbox"/> BTF1_32046 ID: 13505488	pesticidal crystal protein cry4BA [<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789] ⚠ discontinued	NC_018510.1 (42611..46021, complement)	BTF1_32046
<input type="checkbox"/> MC28_C001 ID: 13749457	pesticidal crystal protein cry4BA [<i>Bacillus thuringiensis</i> MC28] ⚠ discontinued	NC_018685.1 (47..3697)	MC28_C001
<input type="checkbox"/> YBT020_27819 ID: 12183655	pesticidal crystal protein cry4BA [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>finitimus</i> YBT-020] ⚠ discontinued	NC_017201.1 (17470..18765)	YBT020_27819
<input type="checkbox"/> YBT020_27999 ID: 12183691	pesticidal crystal protein cry4BA [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>finitimus</i> YBT-020] ⚠ discontinued	NC_017201.1 (42240..45734)	YBT020_27999

Figure 20. Résultat de la recherche du gène *Cry4Ba*.

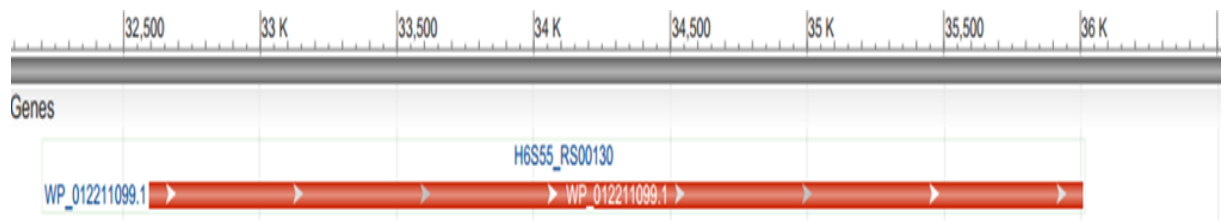


Figure 21. Représentation graphique de la séquence du gène *Cry4Ba*.

```

>NC_010076.1:32597-36007 Bacillus thuringiensis serovar israelensis plasmid pBtoxis,
complete sequence
ATGAATTCAGGCTATCCGTTAGCGAATGACTTACAAGGGTCAATGAAAAACACGAACTATAAAGATTGGC
TAGCCATGTGTGAAAAAACAACAGTATGGCGTTAATCCAAGCTGCGATTAAATCTTCTTCAGTTAGTAC
CGCTTTAAAAAGTAGCTGGAGCTATCCTTAAATTTGTAACCCACCTGCAAGGTACTGTCTTAAACGTA
AGCGCGGTGCTTCCATTCTTTGGCCGACTAATACTCCAACGCTGAAAAGAGTTTGGAAATGATTTTATGA
CCAATACAGGGAATCTTATTGATCAAACTGTAACAGCTTATGTACGAACAGATGCAAAATGCAAAAAATGAC
GGTTGTGAAAAGATTATTTAGATCAATATACAACATAAATTTAACACTTGGAAAAGAGAGCCATAAACCAG
TCCTATAGAACAGCAGTAATAACTCAATTTAACTTAAACAGTGCACAACTTCGAGAGACCCGCAATTTATT
TTAGCAACTTAGTAGGTTATGAATTTATTGTTATTACCAATATACGCACAAGTAGCAAAATTTCAATTTACT
TTTAAATAAGAGATGGCCTCATAAATGCACAAGAAATGGTCTTTAGCACGTAGTGTGGTACCAACTATAT
AACACTATGGTGCAGTACACTAAAGAAATATATTGCACATAGCATTACATGGTATAATAAAGGTTTAGATG
TACTTAGAAAAAATCTAATGSAACAATGGATTACGTTAATGATTATAAAAAGAGAGATGACTATTCAAGT
ATTAGATATACTGCTCTTTTGGCAGTTATGATCCACGTGATACCCCTGCGGACAAAAATAGATAAATACG
AAACTATCAAAAAACAGAAATTTACAAGAGAGATTATACAGCTTTAGTAGAACTCCTTCTAGTAAATCTA
TAGCAGCACTGGAGGCGAGCACTTACACAGATGTTCAATTTATCACTTGGCTAAAAGAGAGTAGATTTCTG
GACCAATACTATATATCAAGATTTAAGATTTTTATCTGCCAAATAAATTTGGGTTTTCAATATACAAATCT
TCTGCAATGCAAGAAAAGTGGAAATTTAAGAAAGTTCTGGTTTTGGTTCAAATCTTACTCATCAAATCAAC
TTAATTTCTAATGTTTATAAAACTTCTATCACAGATACCTAGCTCCCTCTCAATCGAGTTACAAAAATGGA
TTTTCTACAAAATTTGATGGTACTTGCCTCTTATAATTCAAATATAACCAACCTCTGAAAGGTTTAAAGG
ACCAACTTTTTGGATTTTCAACAAATGAGAACAACCTAATCAACCAACTGTAATGATATACGCATA
TTTTAAGCTATATAAAAACTGATGTTATAGATTATAACAGTAACAGGGTTTCATTTGCTTGGACACATAA
GATTGTTGACCCATAAATAAATAAATATACACAGATGCTATCACACAAGTCCGCGCCGTAATAATCTAATCTC
TTGAATGCAACAGCTAAAAGTAATCAAGGGACCTGGTCATACAGGGGGGGATCTAGTTGCTCTTACAAGCA
ATGGTACTCTATCAGGCAGAAATGGAGATTTCAATGTAACAAGTATTTTTAATGATCCTACAAGAAATTA
CGGATTACGCATACGTTATGCTGCAAAATAGTCCAAATGATTGAATGATCATATGATTTACAAGGAGTT
TCTAGAGGAACAACGATTAGTACAGAAATCTACGTTTTCAAGACCTAAATAATAATACCTACAGATTAA
AATATGAAGAGTTTAGATACAAAGATCCTTTTGTGCAATGTACCGSATGAGATTATCTTCAATCAACT
GATAACTATAGCTATTCAACCTTAAACATGACTTCAAAATAATCAAGTGAATATTGACAGAAATCGAAAT
ATTTCAATCACTCAATCTGTATTAGATGAGACAGAGAAACAAAAATTTAGAAATCAGAACGAGAAATTTGTA
ATGCACTGTTTACAAATGACGCGAAAAGATGCAATTAACATTTGGAACGACAGATTATGACATAGATCAAGC
CGCAAAATCTTGTGGAAATGATTTCTGAAAGAAATATATCCAAAAGAAAATGCTGTATTAGATGAAAGTT
AAAAATGCGAAACAACCTTAGTCAATCTCGAAATGTACTTCAAAACGGGGATTTTGAATCGGCTACGCTTG
GTTGGACAACAAGTGAATAATACAAATCAAGAAAGATGATCCTATTTTAAAGGGCATTACCTTCATAT
GTCTGGGGCGAGAGACATTGATGGTACGATATTTCCGACCTATATATTCAAAAAATTTGATGAATCAAAA
TTAAAAACCGTATACACGTTACCTAGTAAAGGGGATTTGTAGGAAGTAGTAAAGATGTAGAACTAGTGGTTT
CACGCTATGGGGAAAGAAATGATGCCATCATGAATGTTCCAGCTGATTTAAACTATCTGTATCCTTCTAC
CTTTGATTGTGAAGGGTCTAATCGTTGTGAGACGCTCCGCTGTGCCGGCTAACATTTGGGAACACTTCTGAT
ATGTTGATTCATGCCAATATGATACAGGGAAAAGCATGTCGATGTCAGGATTCCTCATCAATTTAGTT
TCACTATTGATACAGGGGCATTAGATACAAATGAAAATATAGGGGTTTGGGTCATGTTAAAAATATCTTC
TCCAGATGGATACGCATCATTAGATAATTTAGAAGTAATTAAGAAAGGGCCAAATAGATGGGGAAAGCACTG
TCACGCGTGAACACATGSAAGAAAGAAATGGAACGATCAAAATGGAAGCAAAAACGTTCCGSAACACAAACAAG
CATATGATGTAGCGAAAACAAGCCATTGATGCTTTATTCACAAATGTACAAGATGAGGCTTTACAGTTTGA
TACGACACTCGCTCAAAATCAGTACGCTGAGTATTTGGTACAATCGATTTCCATATGTTACAAATGATTTGG
TTGTCAAGATGTTCCAGGATGAAATATGATATCTATGTAGAGTTGGATGCAAGAGTGGCACAAAGCGCTT
ATTTGTATGATACAAGAAATATTTAAAAATGGTGAATTTACACAAGGGGTAATGGGGTGGCATGTAAC
TGGAAAATGCAGACGTACAACAAATAGATGGTGTTCGTATTGGTTCTATCTAATTTGGAGTGTGGCGTA
TCTCAAAATGTCCATCTCCAAACATAATCATGGGTATGCTTACGTGTTATTGCCAAAAAAGAAAGGCACTG
GAAATGGGTATGTACGCTTATGGATTGTGAGSAGAAATCAAGAAAAATTTGACGTTTACGCTTGTGAAAG
AGGATATATTACGAAGACAGTAGATGATTTCCAGATACAGATCGTGTACGAATTAGATAGGCGAAACC
GAAAGTTCTGTTTATATCGAAAGCATTGAATTAATTTGCATGAAAGAGTGA

```

Figure 22. Format FASTA du gène *Cry4BA* chez *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Tableau 4. Liste des séquences d'alignement significatif (*Cry4Ba*).

Description	Scientific Name	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FDAARGOS_796 plasmid unnamed4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP053973.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain AM65-52 insecticidal crystal protein Cry4Ba (cry4Ba) gene. complete cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	MK184470.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain JW-1 plasmid p4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP045026.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BT-59 plasmid p4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP039725.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain T0139 plasmid pT0139-4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP037468.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain T0131 plasmid pT0131-4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP037456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain Bti plasmid pT0124-4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP037887.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain 1.24 plasmid pT0124-4. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	KY352353.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis HD-789 plasmid pBTHD789-3. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	CP003766.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain PBT602 130 kDa crystal protein (cry) gene. complete cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	AY847707.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis subsp. israelensis plasmid pBtoxis	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	AL731825.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis israelensis bt8 gene for 130 kDa crystal protein (mosquito-specific toxin)	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	X07423.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis gene for 130 kDa delta-endotoxin	Bacillus thuringi...	0.0	99.94%	X07082.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain AM65-52 plasmid pAM65-52-4-128K. complete sequence	Bacillus thuringi...	0.0	99.82%	CP013279.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FGW dipterans toxic crystal protein-like protein (cry4) gene. partial cds	Bacillus thuringi...	0.0	100.00%	EF649751.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FGW2 dipterans toxic crystal protein-like protein (cry4) gene. partial cds	Bacillus thuringi...	1e-162	99.38%	EF649756.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BtMC28 cry-like protein gene. partial cds; and hypothetical protein gene. compl...	Bacillus thuringi...	7e-155	78.89%	JQ916908.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis MC28 plasmid pMC189. complete sequence	Bacillus thuringi...	7e-155	78.98%	CP003692.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BYW2 dipterans toxic crystal protein-like protein (cry4) gene. partial cds	Bacillus thuringi...	3e-148	99.33%	EF649753.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis/tochigiensis cry4B gene. partial cds	Bacillus thuringi...	3e-143	100.00%	EF182769.1
<input checked="" type="checkbox"/> Mutant Bacillus thuringiensis Cry4B (cry4B) gene. partial cds	Bacillus thuringi...	1e-142	99.31%	DQ910833.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar entomocidus cry4Ba like and ORF2 genes for putative mosquitocidal toxin an...	Bacillus thuringi...	2e-136	77.46%	AB161456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar entomocidus cry30Aa like gene for putative mosquitocidal toxin and hypotheti...	Bacillus thuringi...	3e-133	77.25%	AB125059.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis cry24-like. orf2s1 genes for delta-endotoxin. hypothetical protein. complete cds	Bacillus thuringi...	8e-120	76.36%	AB185105.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar jegathesan strain 367 Cry30Ca (cry30Ca) and hypothetical protein genes. co...	Bacillus thuringi...	1e-117	76.25%	GQ368655.2
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain LDC-9 pesticidal crystal protein cry4B-like (cry4B) gene. complete cds	Bacillus thuringi...	5e-117	96.95%	DQ078743.1
<input checked="" type="checkbox"/> B.thuringiensis cry19Aa gene & ORF2	Bacillus thuringi...	2e-115	76.12%	Y07603.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis gene for Cry30-like. hypothetical protein. complete cds	Bacillus thuringi...	3e-114	76.02%	AB193814.1
<input checked="" type="checkbox"/> B.thuringiensis insecticidal endotoxin gene. complete cd	Bacillus thuringi...	1e-93	81.09%	M12662.1
<input checked="" type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain ARP132 pesticidal protein gene. complete cds	Brevibacillus lat...	1e-32	71.09%	KC156676.1
<input checked="" type="checkbox"/> cry1VB=insecticidal crystal protein (promoter). [Bacillus thuringiensis. ssp. israelensis. Bti. Genomic. 480 nt]	Bacillus thuringi...	1e-23	100.00%	S68149.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain JW-1 crystal protein 10 (cry10) gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	MN539645.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain ISPC-12 Cry10Aa (cry10Aa) gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	MT995837.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain BRC-LLP29 putative cry10 gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	JQ228566.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DAB-Bt6 Cry4c gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	EU124371.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DAB-Bt5 Cry4c gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	EU124370.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DAB-Bt4 Cry4c gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	EU124369.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DAB-Bt2 Cry4c gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	EU124367.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DAB-Bt1 Cry4c gene. complete cds	Bacillus thuringi...	9e-15	91.43%	EU124366.1

La construction des arbres phylogénétiques dépend principalement des E-value obtenu d'après les alignements, sachant que la E-value la plus faible est considères comme la plus intéressantes, cela nous a permet de construire deux arbres phylogénétiques, un premier arbre global (**Figure 23**) et un autre arbre des E-value ~ 0 (**Figure 24**).

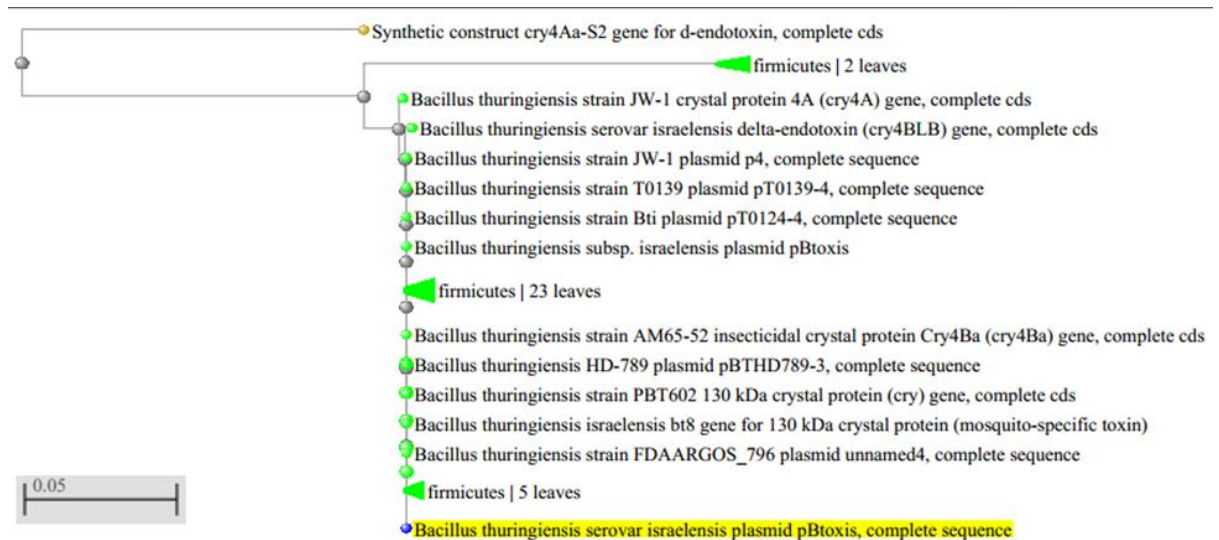


Figure 23. Arbre phylogénétique global du gène (*Cry4Ba*) qui code pour la virulence chez *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*, l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.

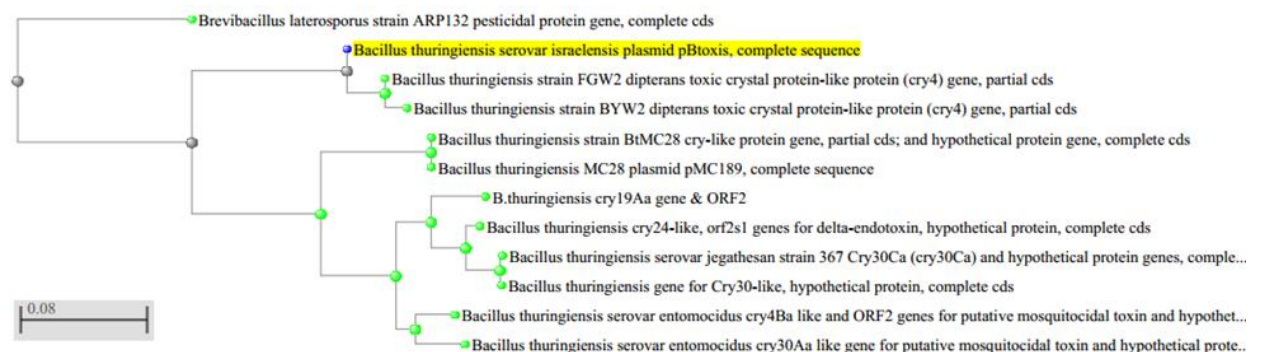


Figure 24. Arbre phylogénétique (E-value ~ 0) du gène (*Cry4Ba*) qui code pour la virulence chez *Bacillus thuringiensis serovar israelensis*, l'arbre a été construit à l'aide de la plate-forme NCBI avec logiciel BLASTn en utilisant la méthode neighbor joining.

D'après les informations collectées à partir de la base de données PDB et Uniprot, la structure de la protéine cytolytique a été déterminée (**Figure 25**).

Figure 25. Résultats de recherche de la structure protéiques 3D (*Cry4Ba*) sur le portail PDB.

La protéine cristalline codé par le gène plasmidique *Cry4Ba*, et de longueur 1136 acide aminé et de masse 127,764 Da. Cette protéine présente la topologie à trois domaines, Le domaine I est un faisceau α -hélicoïdale de cinq hélices de $\alpha 3$ – $\alpha 7$. Les cinq hélices sont toutes plus longues que 30 Å Les hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$ sont disposées en arc autour de l'hélice $\alpha 5$, dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Le domaine II, est un prisme β de trois feuillets β antiparallèles la Feuille 1, composée des brins $\beta 5$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$, et la feuille 2, composé des brins $\beta 8$, $\beta 7$, $\beta 6$ et $\beta 9$, montrent le motif « Greek-key », tandis que dans la feuille 3, trois brins β , $\beta 1$, $\beta 11$ et $\beta 10$, ainsi que l'hélice $\alpha 8$ forment un motif de type « Greek-key » Entre les feuilles 1 et 2, la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ contient un virage γ . Les boucles qui relient les brins intérieurs de chaque feuille ou motif de, « Greek-key » sont formées au bas (apex) du domaine II. Le domaine III, est un β -sandwich de deux feuillets β antiparallèles, ce domaine s'empile au-dessus du domaine II et contre le côté du domaine I. Les résidus C-terminaux 634-640 forment une petite hélice amphipathique $\alpha 9$, qui suit le dernier brin $\beta 23$, l'hélice $\alpha 9$ se trouve au-dessus du bord de la feuille interne vers le domaine I. (Boonserm *et al.*, 2005).

Les liaisons qui maintiennent cette structure stable sont représentées par différentes couleurs. (H1-H2 violet, H2-H3 bleu nuit, H3-H4 bleu, H4-H5 et H5-S1 bleu Turquoise, H6-S2

bleu vert, N-terminal – H1 mauve, S1-H6 bleu Turquoise, S7-S8 / S8-S9 / S10-S11 / S11-S12 vert, S13-S14 / S14-S15 / S15-S16 vert pistache, S16-S17 / S17-S18 / S18-S19 vert-jaune, S19-S20 jaune, S20-S21 jeune-orange, S25-S26 / S26-S27 orange, S28-S29 / S30- C-terminal rouge, S3-S4 / S4-S5 / S6-S7 vert pistache (**Figure 26**).



Figure 26. Structure 3D de la protéine cristalline *Cry4Ba* de *Bacillus thuringiensis ssp Israelensis*.

2 Discussion

D'après nos résultats, l'arbre phylogénétique global du gène *Cyt1Aa* représente 13 ancêtres communs, le premier (ancêtre le plus anciens) présente une homologie donc une évolution divergente, qui a généré un évènement de spéciation due probablement à une pression évolutive (mutation ou transfère de gène).

Le deuxième ancêtre (UTH) présente une homologie (évolution divergente) qui a son tour générés un évènement de duplication explique l'existence d'un point commun qui a un moment donné subit une pression évolutive qui conduit à l'apparition du gène *Cyt1Aa* chez d'autres espèces (**Figure 16**).

L'arbre phylogénétique à une e-value ≈ 0 du gène *cty1Aa* représente trois ancêtres communs, le premier (le plus ancien) représente une homologie (évolution divergente) qui a généré un évènement de spéciation, tandis que le deuxième ancêtre (UTH) représente un évènement de duplication qui fait apparaitre le gène *Cyt1Aa* chez *Bacillus thuringiensis subsp israelensis* avec un autre ancêtre récent (UTH) ou les distances génétiques entre les UTO semblent lointaines. L'ancêtre récent représente une évolution homologue due à un évènement de spéciation.

Les espèces *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* plasmide pBtoxis, et *Bacillus thuringiensis* strain SY1-1 *Cyt* protéine gène, et *Bacillus thuringiensis* strain Y-5 *Cyt1* protéine gène, contenant le gène (*cty1Aa*) présente un groupe paraphylétique qui regroupe une espèce ancestrale et une partie seulement de ses descendants, dont les membres ne partagent que des caractères plésiomorphes (Tassy, 1996) (**Figure 17**).

L'arbre phylogénétique global du gène *Cry4BA* représente dix ancêtres communs, le premier (ancêtre le plus anciens) présente une évolution homologue (une divergence) qui a généré un évènement de spéciation due probablement à une pression évolutive (mutation ou transfère de gène).

Le deuxième ancêtre (UTH) présente une homologie qui a son tour générer un évènement de duplication explique l'existence d'un point commun qui a un moment donné subit une pression évolutive qui conduit à l'apparition du gène *Cry4Ba* chez d'autres espèces (**Figure 23**).

L'arbre phylogénétique à une e-value ≈ 0 du gène *Cry4Ba* représente 11 ancêtres communs : le premier (le plus ancien) représente une évolution homologue (une divergence). qui a généré un évènement de spéciation, Tandis que le deuxième ancêtre (UTH) représente un évènement de duplication, le troisième ancêtre représente un évènement de spéciation où les sous

espèce *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* plasmide pBtoxis, et *Bacillus thuringiensis* strain FGW2 diptéran toxic crystal protein_like protein (*Cry4*) gene, partial cds, et *Bacillus thuringiensis* strain BYW2 diptéran toxic crystal protein_like protein (*Cry4*) gene, partial cds, contenant le gène *Cry4Ba* présentent un groupe paraphylétique (**Figure 24**).

Selon nos résultats et les travaux de (Cantón *et al.*, 2011), le *Bti* produit au moins quatre protéines cristallines différents qui appartiennent à la famille des toxines non apparentées, *Cyt* et *Cry* qui présentent des structures 3D (**Figure 19, 26**), a des mécanismes d'action différents. Les régions de boucle exposées dans le domaine II sont impliquées dans la liaison au récepteur.

Pour exercer leur effet toxique, les toxines *Cry4Ba* reposent sur la liaison séquentielle avec au moins deux molécules réceptrices de protéines de l'intestin moyen qui, chez les insectes lépidoptères, ont été identifiées comme étant une cadhérine transmembranaire et des protéines ancrées au glycosyl-phosphatidil-inositol (GPI) comme aminopeptidase -N (APN) et phosphatase alcaline (ALP). La liaison à la cadhérine facilite le clivage protéolytique de l'hélice α -1 et la formation d'une structure oligomère qui acquiert une affinité pour les récepteurs ancrés GPI conduisant à l'insertion membranaire et à la formation de pores. Des molécules de cadhérine, d'APN et d'ALP ont été identifiées comme des molécules de liaison *Cry4Ba*, suggérant un mode d'action conservé des toxines *Cry* chez les insectes diptères. En revanche, les *CytIAa* activées ne dépendent pas des protéines de l'intestin moyen pour se lier à l'épithélium de l'intestin, elles interagissent directement avec les lipides membranaires, entraînant la formation de pores. Des essais biologiques de protéines insecticides de *Bacillus thuringiensis* spp *israelensis* avec des larves d'insectes a montré que la protéine cytolytique *CytIAa* n'était pas toxique seule, mais qu'elle augmentait la toxicité des protéines cristallines *Cry4Ba*. Une synergie s'est également produite entre les toxines *Cry4Ba* et *CryIIAa* (FernándezLuna *et al.*, 2010).

Comprendre le mécanisme moléculaire de ce phénomène synergétique des toxines *Cry4Ba* permet d'avoir des implications importantes pour développer des stratégies de gestion de l'effet des toxines *Cry* en agriculture et dans la lutte biologique (Cantón *et al.*, 2011).

Dans de nombreuses études antérieures sur la synergie entre les toxines de *B. thuringiensis*, l'analyse statistique des données d'essais biologiques a été basée sur des comparaisons entre les valeurs attendues et observées pour la concentration tuant 50 % des insectes testés, Afin d'analyser si la liaison de *Cry4Ba* à *CytIAa* était impliquée dans leur synergie, les mutants *CytIAa* qui affectaient auparavant la liaison à *CryIIAa* ont été analysés. En ce qui concerne la liaison de *Cry4Ba* et leur effet sur la synergie contre les larves a également été analysé. De plus, les régions

de boucle du domaine II de *Cry4Ba* ont été soumises à une mutagenèse et les mutants de *Cry4Ba* ont été analysés en ce qui concerne leur liaison et leur synergie avec *Cyt1Aa* (Cantón *et al.*, 2011).

Selon (Fernández-Luna *et al.*, 2010), l'utilisation de différentes concentrations de la toxine *Cry4Ba* montrent un effet très réduit sur les insectes, et la même chose pour *Cyt1Aa*. Alors que lors de la combinaison des deux toxines (*Cry4Ba* et *Cyt1Aa*) l'effet a augmenté presque trois fois plus. Concernant les régions *Cry4Ba* impliquées dans l'interaction *Cyt1Aa*, nous montrons qu'une mutation du domaine II boucle α -8 affectait la liaison *Cyt1Aa* et la synergie entre ces toxines. Les boucles exposées au domaine II se sont avérées importantes pour l'interaction avec les récepteurs dans différentes toxines *Cry*. Dans le cas de *Cry4Ba*, il a été montré que les boucles exposées au domaine II 1, 2 et 3 sont impliquées dans la liaison à l'insecte et dans la toxicité. Le fait que les boucles du domaine II soient impliquées à la fois dans la liaison au récepteur et à *Cyt1Aa* est une indication claire que *Cyt1Aa* fonctionne comme une protéine de liaison spécifique de *Cry4Ba* médiant sa toxicité.

Sur la base du mécanisme moléculaire proposé pour l'effet synergique de *Cyt1Aa* sur *Cry4Ba*, il a été proposé que *Bti* soit le premier exemple d'une bactérie pathogène des insectes qui porte une toxine ainsi que son récepteur fonctionnel, favorisant la liaison de la toxine aux membranes cibles, et la toxicité (Cantón *et al.*, 2011).

Conclusion et perspectives

En conclusion, notre travail a permis de réaliser une recherche bibliographique sur l'importance de l'application biotechnologique en agroécologie de *Bacillus thuringiensis* et ses toxines codées par plusieurs gènes (*Cyt*, *Cry*...etc), ainsi qu'une analyse *in silico* de ces gènes.

Les résultats ont montré qu'il existait différents événements évolutifs (spéciation ou duplication) qui font apparaître les gènes *Cyt1Aa* et *Cry4Ba* chez d'autres espèces. Pour exercer l'effet toxique, les δ -endotoxines présentent des structures bien définies qui permettent la liaison avec les récepteurs sur la membrane intestinale de l'insecte. Chez la protéine *Cry4Ba* la liaison à la cadhérine facilite le clivage protéolytique de l'hélice α -1 et la formation d'une structure oligomère qui acquiert une affinité pour les récepteurs conduisant à l'insertion membranaire et à la formation de pores, alors que les *Cyt1Aa* ne dépendent pas de protéines d'insertion mais elles interagissent directement avec les lipides membranaire et forme des pores.

Des expérimentations ont trouvé que la combinaison entre ces deux protéines insecticides montrent un effet toxique plus élevé et très satisfaisant. Le domaine II, boucle α -8 est la région responsable de cette interaction entre *Cyt1Aa* et *Cry4Ba*. Le fait que les boucles du domaine II soient impliquées à la fois dans la liaison au récepteur et à *Cyt1Aa* est une indication claire que *Cyt1Aa* fonctionne comme une protéine de liaison spécifique de *Cry4Ba* médian sa toxicité.

Les retombés de cette étude *in silico*, ainsi que les connaissances moléculaire et phylogénétique peuvent mieux concevoir nos idées dans la formulation des biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* pour garantir la stabilité, et pour mieux comprendre leur activité vis-à-vis des insectes cibles. Nous avons aussi acquis que les protéines ne peuvent être stable et mieux valoriser s'il n'Ya pas une compréhension approfondie des caractéristiques génétiques.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses. Pour une meilleure adoption de cette technologie, la formation sur la production et le contrôle de la qualité aux fabricants, et la formation organisationnelle aux agents de vulgarisation et aux agriculteurs pour vulgariser les biopesticides, peuvent être essentielles.

Pour améliorer l'efficacité des pesticides, des enquêtes approfondies sont essentielles sur les possessions, la pathogénicité et le mode d'action des ravageurs, car le facteur écologique joue un rôle majeur dans la gestion et le contrôle de la population d'insectes nuisibles.

L'effet des biopesticides microbiens sur les communautés microbiennes doit être soigneusement surveillé, pour estimer d'éventuels risque en dangers dans la nature.

Références bibliographiques

1. Abbas, M. S. T. (2018). Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 1-12.
2. Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology*, 58(4), 921-929.
3. Adjanohoun A., 2017- Utilisation des microorganismes du sol pour accroître la productivité agricole. Bibliothèque Nationale (BN) du Bénin, 978 - 99919 - 819 - 1 – 8.
4. Agarwal, P., Gupta, R., & Gill, I. K. (2018). Importance of biofertilizers in agriculture biotechnology. *Annals of Biological Research*, 9(3), 1-3.
5. Aktories, K., Ankenbauer, T., Schering, B., & Jakobs, K. H. (1986). ADP-ribosylation of platelet actin by botulinum C2 toxin. *European journal of biochemistry*, 161(1), 155-162.
6. Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F., & McKay, D. B. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(5), 1320-1324.
7. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
8. Arenas, I., Bravo, A., Soberon, M., Gomez, I., 2010. Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *Journal of Biological Chemistry*. 285:17, 12497-12503.
9. Argôlo-Filho R.C. et Loguercio L.L.; 2013; *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches; *Insects*, 5(1), p. 62-91.
10. Barrett, T., Clark, K., Gevorgyan, R., Gorenkov, V., Gribov, E., Karsch-Mizrachi, I., ... & Ostell, J. (2012). BioProject and BioSample databases at NCBI: facilitating capture and organization of metadata. *Nucleic acids research*, 40(D1), D57-D63.
11. Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R., & Stiles, B. G. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 373-402.
12. Becker, N., 2002. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 18:1, 57-62
13. Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
14. Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-10
15. Bhatia, S. (2018). Histoire, portée et développement de la biotechnologie. *Introduction à la biotechnologie pharmaceutique*, 1.
16. Bietlot, H. P. L., Vishnubhatla, I., Carey, P. R., Pozsgay, M., & Kaplan, H. (1990). Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Journal*, 267(2), 309-315.

17. Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., & Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of molecular biology*, 348(2), 363-382.
18. Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342.
19. Bravo A., Gill S.S. et Soberón M.; 2007; Mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt toxins and their potential for insect control; *Toxicon*, 49(4), p. 423-35.
20. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 423-431.
21. Broadwell A.H. 1994. Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 27-29.
22. Bulla Jr, L. A., Kramer, K. J., Cox, D. J., Jones, B. L., Davidson, L. I., & Lookhart, G. L. (1981). Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 256(6), 3000-3004.
23. Burges, H. D., & Jones, K. A. (1998). Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. In *Formulation of microbial biopesticides* (pp. 33-127). Springer, Dordrecht.
24. Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H., & Velankar, S. (2017). Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Protein Crystallography*, 627-641.
25. Butko, P. (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2415-2422.
26. Cantón, P. E., Reyes, E. Z., De Escudero, I. R., Bravo, A., & Soberón, M. (2011). Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32(3), 595-600.
27. Carlton, B.C., and Gawron-Burke, C. 1993. Genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development. In: Kim L. ed. *Advanced engineered biopesticides*. NY: Marcel Dekker Inc. pp. 43-61.
28. Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., & Ferré, J. (2016). Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(2), 329-350.
29. Charlebois, P. (2007). Automatisation des étapes informatiques du séquençage d'un génome d'organisme et utilisation de l'ordre de gènes pour analyses phylogénétiques. Univ. LAVAL, QUÉBEC. pp.23-25.
30. Chen, J., Yu, J., Tang, L., Tang, M., Shi, Y., & Pang, Y. (2003). Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, 95(2), 310-316.
31. Cheung, P. Y., & Hammock, B. D. (1985). Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Applied and environmental microbiology*, 50(4), 984-988.

32. Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., & Ellar, D. J. (1995). Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131(3), 249-254.
33. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E. S. C. H. E. R. I. C. H. I. A., Van Rie, J., Lereclus, D., ... & Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 807-813.
34. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., ... & Dean, D. H. (2016). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available on line <http://www.btnomenclature.info>.
35. Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J., & Jørgensen, K. (1996). Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Letters in Applied Microbiology*, 23(3), 146-150.
36. De Barjac, H., & Bonnefoi, A. (1973). Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*, 18(1), 5-17.
37. De Been, M., Francke, C., Moezelaar, R., Abee, T., & Siezen, R. J. (2006). Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. *Microbiology*, 152(10), 3035-3048.
38. De Bolle, X., Vinals, C., Prozzi, D., Paquet, J. Y., Leplae, R., Depiereux, E., ... & Feytmans, E. (1995). Identification of residues potentially involved in the interactions between subunits in yeast alcohol dehydrogenases. *European journal of biochemistry*, 231(1), 214-219.
39. De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4), 193-199.
40. Dechklar, M., Tiewisiri, K., Angsuthanasombat, C., & Pootanakit, K. (2011). Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(3), 159-166.
41. Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11), 5389-5394.
42. Fernández-Luna, M. T., Tabashnik, B. E., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Soberón, M., & Miranda-Ríos, J. (2010). Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of invertebrate pathology*, 104(3), 231-233.
43. Ferré, J., Escrache, B., Bel, Y., & Van Rie, J. (1995). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 132(1-2), 1-7.
44. Fitch, W. M. (2000). Homology: a personal view on some of the problems. *Trends in genetics*, 16(5), 227-231.
45. Forsyth, G., & Logan, N. A. (2000). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from northern Victoria land, Antarctica. *Letters in applied microbiology*, 30(3), 263-266.

46. Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jørgensen, K., & Wilcks, A. (2006). Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Applied and environmental Microbiology*, 72(5), 3435-3440.
47. Gerbore, J., & Dreux-Zigha, F. T. (2020). Ces biotechnologies qui révolutionnent notre société.
48. Ghodake, V. N., Naik, S. V., Bhukhanwala, K. N., Kande, K. V., Bhor, N. J., & Patravale, V. B. (2018). Nanoengineered systems for biopesticides. In *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (pp. 243–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00015-8>
49. Gill, S. S., Cowles, E. A., Pietrantonio, P. V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37, 615-636.
50. Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., ... & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age?. *Trends in biotechnology*, 30(5), 250-258.
51. González-Pech, R. A., Stephens, T. G., & Chan, C. X. (2019). Commonly misunderstood parameters of NCBI BLAST and important considerations for users. *Bioinformatics*, 35(15), 2697-2698.
52. Gupta, M., Kumar, H., & Kaur, S. (2021). Vegetative Insecticidal Protein (Vip): A Potential Contender From *Bacillus thuringiensis* for Efficient Management of Various Detrimental Agricultural Pests. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1139.
53. Han, S., Craig, J.A., Putnam, C.D., Carozzi, N.B. and Tainer, J.A. (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat. Struct. Biol.* 6, 932–936.
54. Hastowo S., Lay B.W. and Ohba M. 1992. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 108-113.
55. Heimpel, A. M. (1967). A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual review of entomology*, 12(1), 287-322.
56. Heimpel, A. M., & Angus, T. A. (1958). The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. *Canadian journal of microbiology*, 4(5), 531-541.
57. Helassa, N. (2008). Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dans le sol (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (Montpellier SupAgro)).
58. Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(2), 242-255.
59. Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered bugs*, 1(1), 31-50.
60. Ivanov, D. B., Philippova, M. P., & Tkachuk, V. A. (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Moscow)*, 66(10), 1174-1186.
61. Jenuth, J. P. (2000). The ncbi. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 301-312). Humana Press, Totowa, NJ.

62. Jouzani, G. S., Valijanlian, E., & Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2691-2711.
63. Jucovic, M., Walters, F. S., Warren, G. W., Palekar, N. V., & Chen, J. S. (2008). From enzyme to zymogen: engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity. *Protein Engineering, Design & Selection*, 21(10), 631-638.
64. Kachhawa, D. (2017). Microorganisms as a biopesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 468-473.
65. Knowles, B. H., Blatt, M. R., Tester, M., Horsnell, J. M., Carroll, J., Menestrina, G., & Ellar, D. J. (1989). A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS letters*, 244(2), 259-262.
66. Koch, M. S., Ward, J. M., Levine, S. L., Baum, J. A., Vicini, J. L., & Hammond, B. G. (2015). The food and environmental safety of Bt crops. *Frontiers in plant science*, 6, 283.
67. Koppenhöfer, A. M., & Kaya, H. K. (2001). Entomopathogenic nematodes and insect pest management. In *Microbial Biopesticides* (pp. 284-313).
68. Koziel, M. G., Carozzi, N. B., Currier, T. C., Currier, T. C., Warren, G. W., & Evola, S. V. (1993). The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 11(1), 171-228.
69. Kumari S., Jha A.K., Kumar R et Rajnikant., 2018 - Role of Microbial Biotechnology in Sustainable Agriculture and Environment. *Chem Sci Rev Lett*, 7(25), 184-189 [en ligne]. Disponible sur : "https://chesci.com/wp-content/uploads/2018/04/V7i25_28_CS112049012_Sonia_184-189.pdf" (consulté le 28/03/2021).
70. Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(sp2), 133-163.
71. Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A., & Benz, R. (2006). Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. *Biochemistry*, 45(1), 283-288.
72. Li, J., Koni, P. A., & Ellar, D. J. (1996). Structure of the Mosquitocidal δ -Endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and Implications for Membrane Pore Formation. *Journal of molecular biology*, 257(1), 129-152.
73. Lui C.M, Tzeng Y.M., 2000. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 11–17.
74. Maeda, M., Mizuki, E., Hara, M., Tanaka, R., Akao, T., Yamashita, S., & Ohba, M. (2001). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from intertidal brackish sediments in mangroves. *Microbiological research*, 156(2), 195-198.
75. Maldonado, B. M., Galán, W. L., Rodríguez, P. C., & Quiroz, M. H. (2002). Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc*, 18, 352-358.
76. Manceva, S. D., Pusztai-Carey, M., Russo, P. S., & Butko, P. (2005). A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry*, 44(2), 589-597.

77. Markets et Markets, 2016. Biopesticides Market by Type (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides, and Bioherbicides), Source (Microbials, Biochemicals, and Beneficial Insects), Mode of Application, Formulation, Crop Application, and Region - Global Forecast to 2025. Retrieved 12/07/2020, from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html>.
78. Martínez, C., & Caballero, P. (2002). Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 745-752.
79. McGaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229(4709), 193-195.
80. Mittal, P. K. (2003). Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *Journal of vector borne diseases*, 40(1/2), 20.
81. Mohammadi, K., & Sohrabi, Y. (2012). Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review. *ARPJ Agric Biol Sci*, 7(5), 307-316.
82. Muñoz-Garay, C., Rodríguez-Almazán, C., Aguilar, J. N., Portugal, L., Gómez, I., Saab-Rincon, G., & Bravo, A. (2009). Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7548-7550.
83. Obeidat M., Hassawi D. et Ghabesh I.; (2004); Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the lepidoptera, *Ephestia kuehniella zeller*; *African Journal of Biotechnology*, 3(11), p. 622-6.
84. Oppert, B. (1999). Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 42(1), 1-12.
85. Osman, G. E. H., Already, R., Assaedi, A. S. A., Organji, S. R., El-Ghareeb, D., Abulreesh, H. H., & Althubiani, A. S. (2015). Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(1), 271.
86. Ounjai, P., Unger, V. M., Sigworth, F. J., & Angsuthanasombat, C. (2007). Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba δ -endotoxin complex revealed by electron crystallography: Implications for toxin-pore formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(4), 890-895.
87. Pereg, L., & McMillan, M. (2015). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 349-358.
88. Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(2), 255-281.
89. Pohare, M. B., Wagh, S. G., & Udayasuriyan, V. (2021). *Bacillus thuringiensis* as Potential Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture. In *Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture* (pp. 439-468). Springer, Singapore
90. Ramasamy, B., Nadarajah, V. D., Soong, Z. K., Lee, H. L., & Mohammad, S. M. (2008). A preliminary study of the bioactivity of vegetative proteins extracted from Malaysian *Bacillus thuringiensis* isolates. *Tropical biomedicine*, 25(1), 64-74.
91. Rasko, D. A., Myers, G. S., & Ravel, J. (2005). Visualization of comparative genomic analyses by BLAST score ratio. *BMC bioinformatics*, 6(1), 1-7.

92. Rhodes, D. J. (1993). Formulation of biological control agents. In *Exploitation of microorganisms* (pp. 411-439). Springer, Dordrecht.
93. Rivera, D. A. V. I. D. (1999). Growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, The University of Western Ontario, London).
94. Ruiu, L. (2018). Microbial biopesticides in agroecosystems. *Agronomy*, 8(11), 235.
95. Rukmini, V., Reddy, C. Y., & Venkateswerlu, G. (2000). *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin [mature toxins]. *Biochimie (France)*.
96. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
97. Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9(3), 283-300.
98. Sanchis, V., Chaufaux, J., & Lereclus, D. (1995). Utilisation de " *Bacillus thuringiensis*" en protection des cultures et résistance des insectes. *Cahiers Agricultures*, 4(6), 405-416.
99. Sanchis, V., Chaufaux, J., & Lereclus, D. (1996, January). Amélioration biotechnologique de *Bacillus thuringiensis* : les enjeux et les risques. In *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités* (Vol. 7, No. 4, pp. 271-284). Elsevier Masson.
100. Sasson, R. R. C. E. A. (1988). Biotechnologie et développement. *Rapport Mondial Sur La Science 1996*, 265.
101. Sayers, E. W., Barrett, T., Benson, D. A., Bolton, E., Bryant, S. H., Canese, K., ... & Ye, J. (2012). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 40(D1), D13-D25.
102. Schnepf, H. E., & Whiteley, H. R. (1981). Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2893-2897.
103. Seligy, V. L., Beggs, R. W., Rancourt, J. M., & Tayabali, A. F. (1997). Quantitative bioreduction assays for calibrating spore content and viability of commercial *Bacillus thuringiensis* insecticides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 370-378.
104. Sellami, S., TOUNSI, S., & JAMOUSSE, K. (2015). *Bacillus thuringiensis* : un biopesticide environnemental (Synthèse Bibliographique). *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, (7).
105. Selvapandiyar, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S. K., Venkatesan, T., Singh, S. P., & Bhatnagar, R. K. (2001). Toxicity analysis of N-and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5855-5858.
106. Shelton A.M., Zhao J.Z. and Roush R.T. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47: 845-881.
107. Singh, B. R., Dwivedi, S., Al-Khedhairi, A. A., & Musarrat, J. (2011). Synthesis of stable cadmium sulfide nanoparticles using surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain KSU-109. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 207-213.

108. Singh, R. (2019). Microbial Biotechnology: A Promising Implement for Sustainable Agriculture. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 107-114). Elsevier.
109. Soberon, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. *Cellular and molecular life sciences*, 66(8), 1337-1349.
110. Stevens, M. M., Burdett, A. S., Mudford, E. M., Helliwell, S., & Doran, G. (2011). The acute toxicity of fipronil to two non-target invertebrates associated with mosquito breeding sites in Australia. *Acta tropica*, 117(2), 125-130.
111. STUESSY, T. F. (1983). PHYLOGENETIC TREES IN PLANT SYSTEMATICS. *SIDA, Contributions to Botany*, 10(1), 1-13.
112. Tassy, P. (1996). LE CLADISME, TRENTE ANS APRÈS PHYLOGENETIC SYSTEMATICS; QUELQUES REMARQUES À PROPOS DE DÉBATS RÉCENTS Cladistics, thirty years after Phylogenetic Systematics: some récent conflicts. *Vie et Milieu/Life & Environment*, 115-123.
113. Taylor, A., 1993. Aminopeptidases: structure and function. *Faseb Journal*. 7:2, 290-298.
114. Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.
115. Tsuge, H., Nagahama, M., Nishimura, H., Hisatsune, J., Sakaguchi, Y., Itogawa, Y., Katunuma, N. and Sakurai, J. Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., & Bulla Jr, L. A. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12334-12340.
116. UniProt Consortium. (2007). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D190-D195.
117. Van Lenteren, J. C. (2000). Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. In *Biological control: measures of success* (pp. 77-103). Springer, Dordrecht.
118. Verma, A. S., Agrahari, S., Rastogi, S., & Singh, A. (2011). Biotechnology in the realm of history. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 321.
119. Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
120. Wang, Z. H., Wang, Y., Cui, H. R., Xia, Y. W., Altosaar, I., & Shu, Q. Y. (2002). Toxicological evaluation of transgenic rice flour with a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7), 738-744.
121. Watkinson I. 1994. Global view of present and future markets for Bt products. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 3-7.
122. West A.W., Burges H.D., Dixon T.J. et Wyborn C.H. ;(1985); Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: Effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms; *Soil Biol. Biochem.*, 17(5), p. 657-65.
123. Wu, J., Zhao, F., Bai, J., Deng, G., Qin, S., & Bao, Q. (2007). Evidence for positive Darwinian selection of vip gene in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(7), 649-660.

124. Xavier, R., Nagarathinam, P., Murugan, V., & Jayaraman, K. (2007). Isolation of Lepidopteran active native *Bacillus thuringiensis* strains through PCR panning. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 15(2), 61-67.
125. Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.
126. Zhuang, M., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A., & Gill, S. S. (2002). *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* Lipid Rafts Are Involved in Cry1A Toxin Binding to the Midgut Epithelium and Subsequent Pore Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13863-13872.