

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE



جامعة محمد بوقرة - بومرداس

UNIVERSITE M'hamed BOUGARA DE BOUMERDES

Faculté des sciences

Département de Biologie

Mémoire de master Académique

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème :

Les molécules antimicrobiennes produites par *Bacillus thuringiensis* (revue bibliographique).

Réalisé par : Atmane Cylia

Évalué par le jury composé de :

Présidente : ACHEUK F

Professeur (UMBB)

Examineur : BOUDJEMA K

MCA (UMBB)

Promotrice : ALLOUANE R

MCB (UMBB)

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements :

Je remercie **Allah** de m'avoir donné la santé, la patience, la volonté et le courage durant toutes mes études ainsi que la réalisation de ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements et à exprimer ma profonde gratitude à **Mme Allouane R.** de m'avoir encadré et suivi durant ce travail avec ses précieuses conseils, remarques qu'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et qui ont pris le temps de l'examiner :

Présidente: ACHEUK F , examinateur: BOUDJEMAA K.

Je souhaite aussi adresser mes sincères remerciements à toutes personnes qui m'ont aidé à acquérir des documents nécessaires à la réalisation de mon mémoire.

Finalement, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation ce travail.

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude ;

À ceux qui m'ont donné la vie, l'amour, la joie... ; à mes très chers parents, ma mère **Taouasse** et mon père **Said** ; pour leurs sacrifices pour que je réussisse et encouragements durant toutes mes années d'études ; qui n'ont jamais cessés de me faire confiance dans ce que j'entreprends.

À mon cher frère **Arab**.

À mes chères sœurs : **Ghalia, Messouda, Chama, Hamida, Hassina, Nouria et Djawida**.

Qui m'ont entouré et soutenu et pour leurs confiance, aide, compréhension et leurs contributions à ma formation.

À mes chers : **Yahia, Ahmed, Massinissa, Ghillesse, Anis, Kousseyla et Adem** et les petites anges **ikhlas, hawa, et Mohemed Amine**.

À toute ma famille.

Je tiens à dédier à ce travail a toutes mes amies qui m'ont encouragé et aidé et tous mes collègues, en particulier Spécialité biotechnologie microbienne.

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment...

Atmane Cylia...

Liste des abréviations

ADN :Acide désoxyribonucléique.

ARN : acide Ribonucléique.

Bt. Bacillus thuringiensis.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Cr : cristal.

Cry : Protéines Crystalines.

Cyt : Protéine cytolytique.

GC% : pourcentage en bases Guanine et Cytosine.

KDa : Kilo Dalton.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

Vip : protéines insecticides végétatives.

Z.D.I : zone d'inhibition.

Liste des figures

Fig.01	Photographie de cellules végétative de <i>B. cereus</i> (Nakamura, 1998)	03
Fig.02	Arbre phylogénétique de groupe <i>B. cereus</i> .	05
Fig.03	Cycles de vie des bactéries de groupe <i>B. cereus</i> .	06
Fig.04	Localisation de <i>B. thuringiensis</i> dans l'environnement.	07
Fig.05	Aspect du <i>Bacillus thuringiensis</i> .	11
Fig.06	Colonies de <i>B. thuringiensis</i> formées sur un milieu T3 gélosé.	13
Fig.07	Photographie prise au microscope d'une culture de <i>B. thuringiensis kurstaki</i> au cours de la phase de sporulation.	14
Fig.08	Schéma du cycle de vie de <i>B. thuringiensis</i> .	16
Fig.09	Principales toxines Cry actives contre les différents ordres d'insectes.	18
Fig.10	Schéma décrivant le devenir des sporanges de <i>Bt</i> et des toxines Cry dans l'intestin après leur ingestion par les larves d'insectes cibles.	20
Fig.11	Schéma illustrant les cibles des delta-endotoxines produites par <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
Fig.12	Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques.	26
Fig.13	Structure chimique de l'amphotéricine B.	27
Fig.14	Molécule de surfactant avec des groupements apolaires (hydrophobes) et polaires (hydrophiles).	29
Fig.15	Méthodes de diffusion sur milieu gélose	46
Fig.16	Méthode de microdilution en bouillon d'extrait de plante contre <i>B. subtilis</i> en utilisant la résazurine comme indicateur de croissance.	52
Fig.17	Préparation de l'inoculum microbien par suspension directe de colonies comme recommandé par les directives du CLSI.	53
Fig.18	Microdilution en bouillon pour les tests antibactériens comme recommandé par le protocole CLSI.	53

Liste des tableaux

Tab.01	Structure phylogénétique du groupe <i>B. cereus</i> présentant les sept groupes phylogénétiques du groupe <i>B. cereus</i> et leurs principales caractéristiques.	02
Tab.02	Sérotypes de <i>B. thuringiensis</i> .	12
Tab.03	Les bactériocines utilisées dans le domaine alimentaire	32
Tab.04	Les principaux bactériocines utilisées dans le domaine médical.	34
Tab.05	Les bactériocines produits par <i>B. Thuringiensis</i> .	35
Tab.06	Les bactériocines de <i>Bt</i> et leurs activités biologique contre les bactéries à Gram positif.	36
Tab.07	Les bactériocines de <i>Bt</i> et leurs activités biologique contre les bactéries à Gram négatif.	38
Tab.08	Les bactériocines qui ont une activité antifongique.	39
Tab.09	Effet antimicrobien des toxines Cry et Cyt.	42
Tab.10	Milieux de culture, taille de l'inoculum microbien et conditions d'incubation pour les méthodes de test de sensibilité antimicrobienne recommandées par le CLSI	47

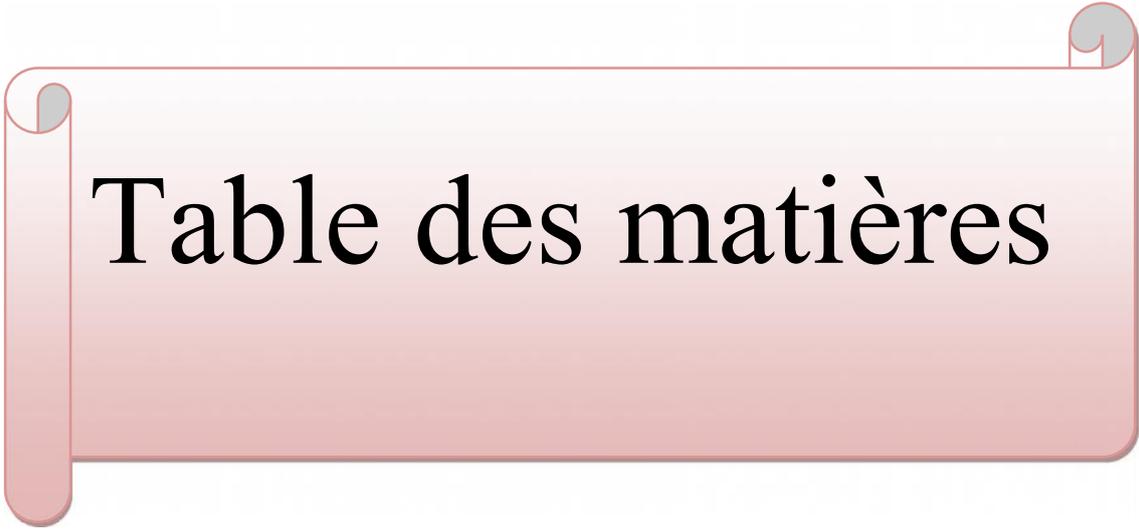


Table des matières

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : Le groupe *Bacillus cereus*

I.1 .Classification.....	01
I.2.Caractéristiques bactériologiques du groupe <i>Bacillus cereus</i>	02
I.3.Biologie	03
1.4. Phylogénie.....	04
I.5.Écologie du groupe <i>B. cereus</i>	05
1.5.1. Réservoir.....	05
I.5.2.Cycles infectieux et transmission de l'infection.....	06
I.6. La sporulation	07
I.6.1. Les différentes étapes de la sporulation.....	07
I.6.2. Régulation de la sporulation	08

Chapitre II : *Bacillus thuringiensis*

II.1. Historique.....	09
II.2.Caractéristiques générale de <i>B. thuringiensis</i>	10
II.3. Classification de <i>B. thuringiensis</i>	11
II.4.Propriétés macroscopique et microscopique de <i>B. thuringiensis</i>	13
II.5. Ecologie et prévalence	14
II.6. Cycle de vie de <i>B. thuringiensis</i>	15
II.7. Génétique de <i>B. thuringiensis</i>	16
II.7.1. Génome de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
II.8.Les facteurs de virulences de <i>Bt</i>	17

II.8.1. Protéines cristallins: Les δ -endotoxines et les β -exotoxines	17
II.8.1.1. Les protéines Cry et Cyt.....	17
II.8.2. Autres toxines de <i>B. thuringiensis</i>	18
II.8.3. Mode d'action de <i>B. thuringiensis</i>	19
II.8.3.1. Activité insecticide de <i>B. thuringiensis</i>	19

Chapitre III : Les molécules antimicrobiennes

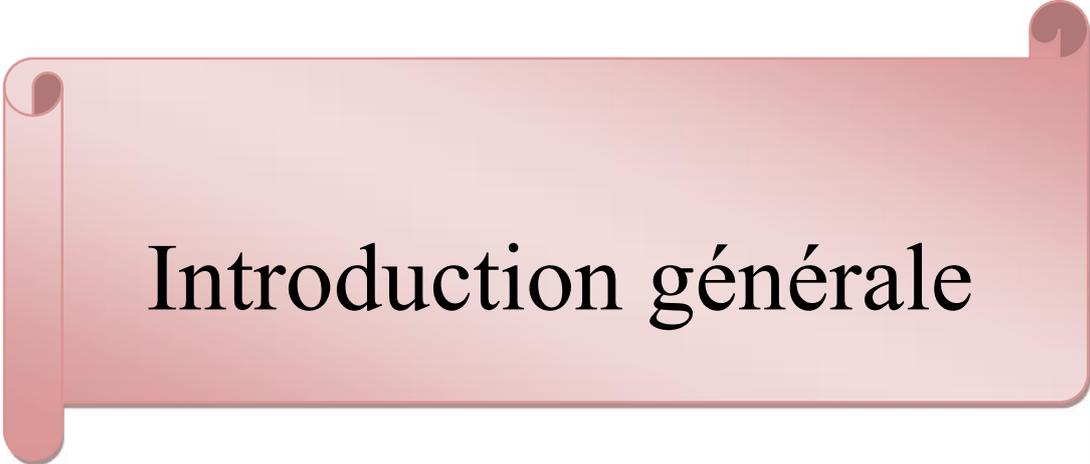
III.1 Les molécules antimicrobiennes.....	22
III.1.1 Les antibiotiques.....	22
III.1.1.1. Historique et intérêt de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques....	22
III.1.1.2. Microorganismes producteurs d'antibiotiques.....	23
III.1.1.3. Classification et mode d'action des antibiotiques.....	23
III.1.1.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	24
III.1.1.3.2 Inhibiteurs de la synthèse protéique.....	25
III.1.1.3.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs...	25
III.1.2. Les antifongiques.....	26
III.1.2.1. Les antifongiques luttant contre les mycoses.....	27
III.1.2.2. Les antifongiques luttant contre les maladies cryptogamiques.....	28
III.1.2.3. Les chitinases.....	28
III.1.2.4. Les biosurfactants.....	28
III.1.2.4.1. Définition.....	28
III.1.2.4.2. Microorganismes producteurs.....	29
III.1.3. Les Bactériocines.....	30
III.1.3.1. Généralités.....	30
III.1.3.2. Classification des bacteriocines.....	31
III.1.3.3. Mécanisme d'action des bacteriocines.....	31
III.1.3.4. Applications et intérêts des bactériocines.....	31
III.1.3.4.1. Applications alimentaires.....	31
III.1.3.4.2. Applications médicales.....	33
III.2. Les molécules antimicrobiennes produites par <i>B. thuringiensis</i>	34
III.2.1. L'antibiotique Zwittermicine A.....	34
III.2.1.1. Rôles dans le biocontrôle.....	35
III.2.2. Les bactériocines de <i>B. thuringiensis</i>	35

III.2.2.1.les bactéries à Gram positive inhibées par les bactériocines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
III.2.2.2. bactéries à Gram négatif inhibées par les bactériocines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
III.2.2.3. Champignons inhibés par les bactériocines de <i>B. thuringiensis</i>	39
III.2.3. Les antifongiques de <i>Bt</i>	39
III.2. 3.1.Les chitinases de <i>B. thuringiensis</i>	39
III.2.3.2. Les biosurfactants de <i>bacillus thuringiensis</i>	41
III.2.3.2.1.Les fengycines.....	41
III.2.3.2.1.1.Définitions.....	41
III.2.3.2.1.2.Rôles dans le biocontrole	41
III.2.4. Les δ -endotoxines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42

Chapitre IV : Les Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

IV.1. Méthodes de diffusion.....	44
IV.1.1.Méthode de diffusion en disques sur milieu gélosé.....	44
IV.1.2. Méthode du gradient antimicrobien (Etest).....	46
IV.1.3. Autres méthodes de diffusion.....	48
IV.1.3.1. Méthodes de diffusion des puits d'agar.....	48
IV.1.3.2. Méthode de diffusion des bouchons d'agar.....	48
IV.1.3.3. Méthode des stries croisées.....	49
IV.1.3.4. Méthode de contamination des aliments.....	49
IV.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) – bioautographie.....	49
IV.2.1. Diffusion de l'agar (agar-diffusion)	50
IV.2.2. Bioautographie directe.....	50
IV.2.3. Essai biologique par recouvrement de gélose.....	50
IV.3. Méthodes de dilution.....	51

IV.3.1. Méthode de dilution du bouillon.....	52
IV.3.2. Méthode de dilution de l'agar.....	55
IV.4. Test temps-mort (courbe temps-mort).....	55
IV.5. Test de bioluminescence de l'ATP.....	56
IV.6.Méthode cytofluorométrique de flux.....	57
Conclusion générale	
Références bibliographiques	



Introduction générale

Les microorganismes sont de remarquables agents de production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés. Parmi ces molécules, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques, les bactériocines, etc. Bien que la plupart des micro-organismes soient très bénéfiques et inoffensifs pour l'homme, les animaux et les plantes, malheureusement certains sont néfastes et pathogènes en provoquant plusieurs maladies qui peuvent être très graves, et d'autres sont à l'origine de plusieurs dégâts en agriculture; Il s'agit de bactéries, de levures unicellulaires et de champignons filamenteux pathogènes. Pour combattre ces microorganismes pathogènes, plusieurs travaux de recherche sont actuellement orientés vers la découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes, à savoir des antibiotiques, des antifongiques et des bactériocines, pour des applications pharmaceutiques, agricoles (remplacement des pesticides chimiques par des molécules bioactives naturelles) et agro-alimentaires. Ceci est dû au développement de l'antibiorésistance qui est la résistance des microorganismes pathogènes aux molécules antibactériennes et antifongiques communément utilisées.

Le moyen le plus utilisé pour la recherche de nouvelles molécules actives est le moyen naturel qui consiste à chercher ces molécules notamment à partir de microorganismes.

Les espèces de *Bacillus* sont capables de produire un large éventail de métabolites secondaires avec des natures et des structures très différentes et affichant de larges spectres d'activités, dont l'espèce *Bacillus thuringiensis* qui est une bactérie très utilisée en biotechnologie, fait parti de groupe *bacillus cereus*, est une bactérie à Gram positif, utilisé en lutte biologique, il a également la capacité de produire un groupe de molécules ayant une activité antimicrobienne très diverse tels que les antibiotiques les bactériocines, les chitinases, les antifongiques, les biosurfactants etc, au cours de sa croissance. Au cours de la sporulation, il produit des toxines pouvant avoir une activité antimicrobienne (toxines Cry et Cyt), qui sont utilisées dans différents domaines (Stein, 2005).

L'objectif initial de notre travail était d'étudier l'activité antimicrobienne de souches locales de *Bacillus thuringiensis*, cependant à cause de la pandémie covid 19, la réalisation de ce travail a été entravée.

Le présent mémoire consiste en un état de l'art sur les molécules antimicrobiennes produites par l'espèce *B. thuringiensis*. Il est structuré comme suit :

Après cette introduction, un premier chapitre décrit le groupe *Bacillus cereus*, sa classification, ses caractères distinctifs, sa biologie et phylogénie, et son écologie. À la fin de

ce chapitre nous avons présenté les trois espèces : *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*. Ainsi que les étapes du processus de sporulation.

Le deuxième chapitre est focalisé sur l'espèce *Bacillus thuringiensis*, ses caractères générales, sa classification, ses propriétés macroscopiques et microscopiques, son cycle de vie, et les facteurs de virulence qu'il produit (toxines Cry et Cyt...), et son mode d'action insecticide.

Les molécules antimicrobiennes (antibiotiques, antifongiques, bactériocines, biosurfactants) sont présentées dans le troisième chapitre. Les méthodes d'évaluations de l'activité antimicrobienne sont données en chapitre quatre.



Chapitre I :
Le groupe *Bacillus*
cereus

I. Le groupe *Bacillus cereus*

I.1 .Classification

Le groupe *B. cereus* comprend sept espèces génétiquement proches et différenciées principalement par des caractères phénotypiques tels que des différences physiologiques , morphologiques, ou de virulence. Récemment, des études phylogénétiques basées sur la gamme de température de croissance des différents souches et espèces du groupe *B. cereus* ont mis en évidence l'existence de sept sous groupes caractérisés par différents thermotypes . Les différents groupes sont présentés dans le tableau 01.

Les groupes I, II, I, V, rassemblent des souches dont les gammes de température de croissance sont respectivement comprises entre 10 et 43°C, 7 et 40°C, 10 et 45°C, 8 et 40°C. Ces groupes sont intermédiaires. Le groupe VI est plus psychrotrophe avec une gamme de température de croissance comprise entre 7 et 37°C. Les groupes III et VII sont les plus thermophiles avec des gammes de température de croissance comprise respectivement entre 15- 45°C et 20-50°C (Guinebretière *et al.*, 2008).

Différentes espèces du groupes *Bacillus cereus* peuvent être retrouvées dans plusieurs groupes phylogénétiques, ainsi *B. weihenstephanesis* et *B. mycoides* correspondent au groupes VI.

B. pseudomycoïdes est retrouvé dans le groupe I. *B. anthracis* se retrouve uniquement dans le groupe III tandis que *B. cytotoxicus* correspond au groupe VII.

B. cereus se retrouve à la fois dans les groupes II, III, IV et V tandis que *B. thuringiensis* est observé dans les groupes II, III, V et VI. Dernièrement il a été constaté que la séquence du gène de ménage *panC* permet d'affecter précisément une souche de *B. cereus* à son groupe phylogénétique (Guinebretiere *et al.*, 2008).

Tableau 01 : structure phylogénétique du groupe *B. cereus* présentant les sept groupes phylogénétiques du groupe *B. cereus* et leurs principales caractéristiques (Guinebretiere *et al* ., 2008)

Groupes phylogénétique	Espèce	Sous –groupes	Gamme de température De croissance en °C.
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	I-1 I-2	10-43
II	<i>B. cereus II</i> <i>B. thuringiensis II</i>	II	7-40
III	<i>B. cereus III</i> <i>B. thuringiensis III</i> <i>B. cereus émétique</i>	III-1 III-2 III-3	15-45
	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus III-4</i> <i>B. thuringiensis</i>	III-4 III-4	15-45
IV	<i>B. cereus 4</i> <i>B. thuringiensis 4</i>	IV-1 IV-2 IV-3	10-45
V	<i>B. cereus 5</i> <i>B. thuringiensis 5</i>	V	8-40
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> <i>B. thuringiensis 6</i>	VI-1 VI-2	5-37
VII	<i>B. cytotoxicus 7</i>	VII	20-50

I.2. caractéristiques bactériologiques du groupe *Bacillus cereus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvés, à Gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0,9 à 10 µm (figure 01) (Euzéby, 2003).

Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par de flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation (Daou, 2008).

Les espèces du genre *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles.

Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes, certains espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes exigent des facteurs de croissance (Daou, 2008).

Le genre *Bacillus* possède un potentiel biotechnologique important. Cela est dû à leur taux de croissance et leurs sécrétions extracellulaires (Schallmey *et al.*, 2004).

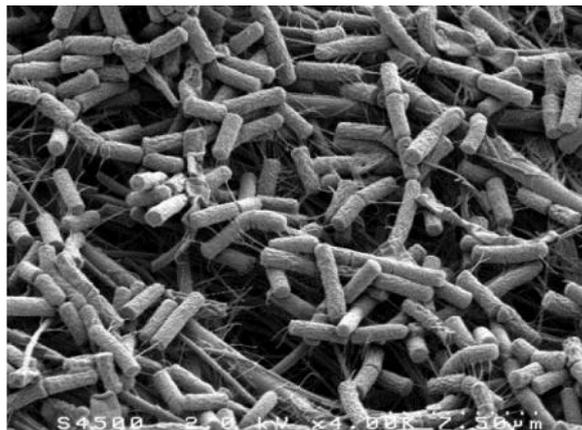


Figure 01: Photographie de cellules végétative de *B. cereus* (Euzéby, 2003).

I.3. Biologie

Le groupe *Bacillus cereus* est constitué de sept espèces bactériennes : *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* (Soufiane, 2013).

Leur ADN présente un faible pourcentage en guanine et cytosine (G+C%) (Environ 35%) (Ivanova *et al.*, 2003).

Les membres du groupe *Bacillus cereus* sont ubiquitaires dans l'environnement et sont isolés à partir du sol, de l'eau, des végétaux, des animaux et d'aliments. Cette propriété est liée à la

capacité de ces bactéries à former des spores dans des conditions environnementales défavorable (Daou, 2008).

Les spores des bactéries de groupe *B.cereus* sont non déformantes et se situent en position centrale ou subterminale. Cette forme «dormante» de la bactérie confère une résistance accrue à de nombreux stress tels que la chaleur, la dessiccation, le pH et les UV.

Historiquement, les espèces de groupe *B.cereus* ont été classées à partir d'un nombre restreint de caractères (caractères macroscopiques et microscopiques, propriétés pathogènes...etc.).

Les souches de *B. anthracis* forment une capsule et sont responsable de la maladie de charbon chez les mammifères (Singleton, 2005).

Les souches de *B. thuringiensis* produisent un cristal protéique parasporal composé de toxines actives sur une grande variété d'insectes et sur certains nématodes.

B. cereus est associée à des toxico-infections alimentaires et à des infections locales ou systémiques. *B. weihenstephanensis* regroupe des bactéries psychrotrophes capable de se développer à des températures inférieures à 7°C.

B. mycoides et *B. pseudomycoides* se caractérisent par des colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide (Dromigny, 2008).

1.4. Phylogénie

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, l'approche phénotypique de la classification des microorganismes a laissé place à une classification génotypique fondée sur l'étude des modifications des acides nucléiques des génomes. Cette dernière a complètement remis en question le concept d'espèce en microbiologie et en taxonomie bactérienne.

Actuellement, la plupart des stratégies utilisées pour établir une relation phylogénétique entre les souches repose sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomiaux (ADNr).

L'étude de Schmidt et ses collaborateurs a permis d'établir l'arbre phylogénétique représenté dans la figure (02).

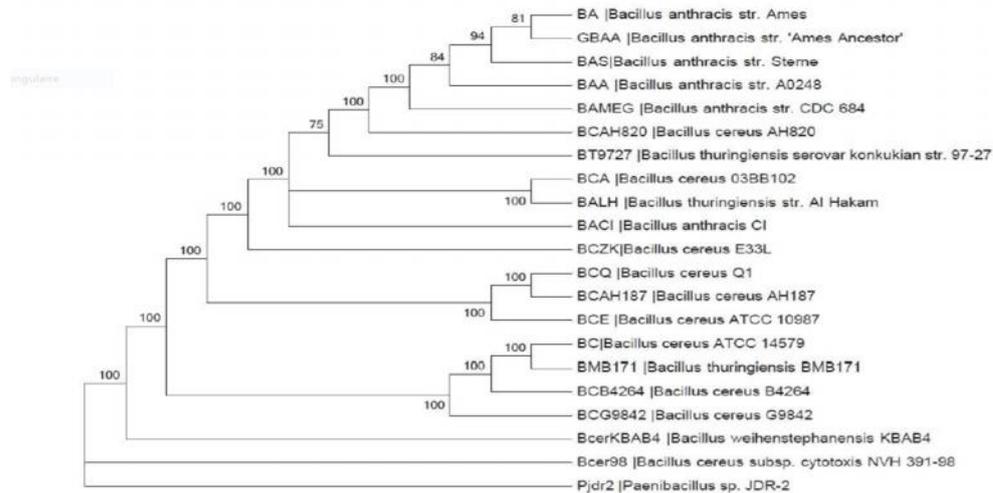


Figure 02 : Arbre phylogénétique de groupe *B. cereus*.

L'arbre a été construit en comparant 157 gènes présents en simple copie au sien de groupe *Bacillus cereus* (Schmidt et al., 2003).

Il a été montré que ces espèces sont taxonomiquement très proches mais phénotypiquement variable notamment en matière de pathogénicité (Pandiani., 2010).

I.5.Écologie du groupe *B. cereus*

1.5.1. Réservoir

Le réservoir est le lieu ou environnement naturel dans lequel un pathogène est normalement retrouvé et à partir duquel l'infection de l'hôte peut se produire.

Le réservoir primaire des bactéries de groupe *B. cereus* est le sol. Plusieurs études suggèrent que les spores de ces bactéries ne peuvent pas germer et se multiplier dans cet environnement (Glare et al., 2000). Cette hypothèse est confortée par l'analyse des génomes des bactéries du groupe *B. cereus* qui indique que leur métabolisme est principalement azoté (Ivanova et al., 2003). Cependant dans certaines niches écologiques où la disponibilité en nutriments est supérieure, notamment dans la rhizosphère ou la phyllosphère, un développement est possible (Bizzarri et bishop, 2008).

Les bactéries de l'environnement pénètrent dans leur hôte suite à l'ingestion, l'inhalation, ou le contact avec des spores ou des cellules végétatives. Jensen et al. suggèrent qu'une fois dans leur hôte, les bactéries du groupe *B. cereus* sont capables de se développer selon deux modes de vie distincts : un mode de vie où les bactéries vivent dans une relation symbiotique avec

leur hôte et un mode de vie pathogène ou les bactéries se multiplient rapidement aux dépens de leur hôte (figure 03) (Jensen *et al.*, 2003).

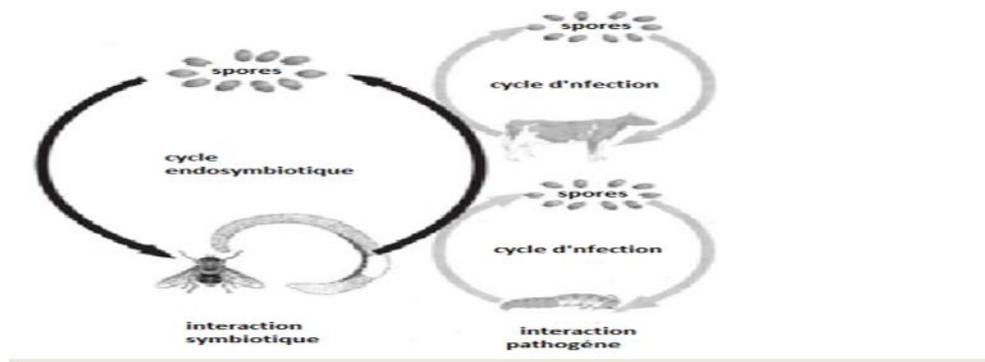


Figure.03 : Cycles de vie des bactéries de groupe *B. cereus* (Jensen *et al.*, 2003).

I.5.2. Cycles infectieux et transmission de l'infection

Bacillus anthracis

B. anthracis est l'agent étiologique de la maladie de charbon. L'anthrax touche essentiellement les ruminants ovines, bovines, et caprines. Les carnivores et les porcins sont généralement considérés comme assez résistants à l'infection et les oiseaux ne sont pas affectés par cette maladie.

L'homme est un hôte accidentelle, il peut être contaminé par contact direct avec des animaux infectés ou des produits dérivés (viandes, peaux, laines). Il existe trois voies d'entrées des spores dans l'hôte : digestive, cutanée, pulmonaire).

Bacillus cereus

B. cereus est un pathogène opportuniste responsable d'infections systémiques (endocardites et péricardites), de pneumonies, et d'infections locales (parodontites et enophtalmies).

B. cereus est également impliqué dans des intoxications alimentaires émétiques et /ou diarrhéiques. Le cycle infectieux de *B. cereus* reste mal connu. Les aliments contaminés sont particulièrement les aliments amylacés; les viandes ; les œufs ; et les produits laitiers.

Bacillus thuringiensis

Le cycle infectieux communément proposé pour *B. thuringiensis* est le suivant: lors de l'ingestion par les insectes sensibles du mélange de spores et de cristaux (endotoxines

insecticides) ces deniers sont solubilisés par le pH alcalin de l'intestin. Les protoxines sont ensuite clivés par des protéases intestinales en toxines actives qui vont se fixer spécifiquement sur des récepteurs de l'épithélium intestinal, provoquant la paralysie de tube digestif et la lyse des cellules épithéliales (Bravo *et al.* , 2007).

La baisse consécutive de pH intestinale peut contribuer à créer des conditions favorables à la germination des spores (Heimpl, 1959). Les bactéries se multiplient et traversent la paroi digestive pour envahir l'hémocoèle de l'insecte, provoquant une septicémie qui s'ajoute à la toxémie (Raymond *et al.*, 2010). Lorsqu'elles sont épuisés les nutriments à leur disposition, les bactéries s'engagent dans le processus de sporulation et synthétisent les protéines Cry qui vont former une inclusion cristalline localisée dans la cellule mère.

La figure 04 fait la synthèse de plusieurs études concernant la localisation de *B. thuringiensis* dans l'environnement.

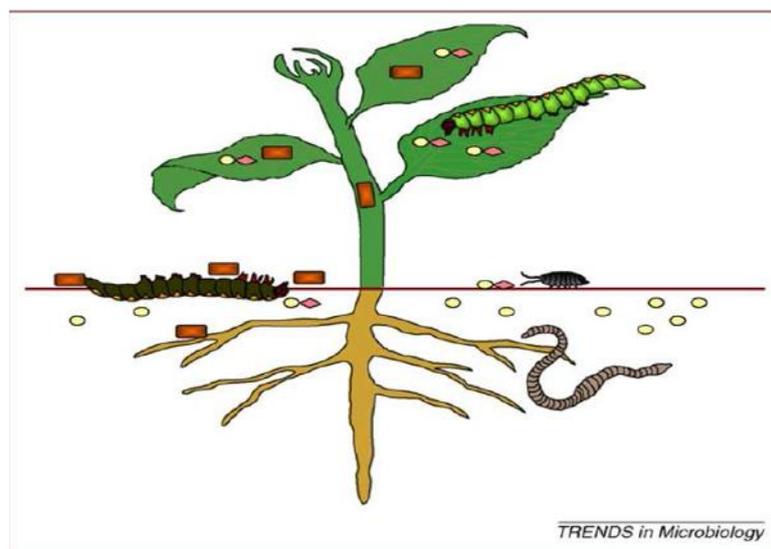


Figure 04 :Localisation de *B. thuringiensis* dans l'environnement (Raymond *et al.* , 2010).

Les formes végétatives de *B. thuringiensis* sont représentées par des rectangles rouges, les spores sont représentées par des ronds jaunes et les toxines Cry sont présentées par des losanges roses.

I.7. La sporulation

I.7.1. Les différentes étapes de la sporulation

La sporulation est un phénomène complexe qui dure de 6 à 8 h et qui se décompose en une série de sept étapes de développement coordonnées. Ces étapes ont été déterminées chez *B.*

subtilis et sont sensiblement les mêmes au sien du groupe *Bacillus cereus*. La cellule végétative correspond au stade 0. La phase 1 Correspond a la réplication de l'ADN en deux chromosomes et à leur ségrégation polaire. Une division asymétrique s'engage. En phase 2: la membrane plasmique s'invagine et sépare la bactérie en deux compartiments de tailles inégale qui possèdent leur propre matériel génétique. Une étape d'invagination se produit ensuite autour du plus petit compartiment, qui est nommé préspore. Cette étape aboutit à la séparation de la préspore et de la cellule mère par deux membranes de polarité inverse (phase 3). Le peptidoglycane de la paroi primordiale et de cortex se forme autour de la préspore, entre les deux membranes (phase 4). La maturation de spore se termine par l'ajout, autour de la préspore de protéines synthétisées dans la cellule mère et constituant le manteau (5). La spore présente une forme ovoïde mesurent de 0,75 à 1 μm , est alors libérée suite à la lyse de la cellule mère (phase 6-7) (Barnabé, 2004).

I.7.2. Régulation de la sporulation

Les différentes étapes de la sporulation sont contrôlées par une cascade de facteurs sigma permettant à l'ARN polymérase de transcrire des gènes spécifiques de chaque étape du développement dans les deux compartiments de la cellule bactérienne (Molle et al., 2003).



Chapitre II :
Bacillus thuringiensis

II. *Bacillus thuringiensis*

II.1. Historique

La bactérie entomopathogène *B. thuringiensis* a été le premier microorganisme homologué dans le monde comme biopesticide. Elle a été isolée pour la première fois par le chercheur japonais S. Ishiwata, en 1901, à partir de larves de vers à soie (*Bombyx mori*) présentant la maladie sotto. Elle a été alors nommée *Bacillus sotto*. En 1911, le biologiste Ernest Berliner a décrit formellement l'espèce à partir de teignes de farine collectées dans une ville allemande, Thuringe qui a donné le nom à l'espèce (Berliner, 1911). En 1916, Aoki et Chigasaki ont constaté que la maladie se produire après l'ingestion des colonies de microorganismes sporulées (son activité était due à une toxine présente dans les cultures sporulées, mais pas dans les cultures de cellules végétatives) (Beegle et Yamamoto, 1992). Elle a été utilisée pour contrôler la pyrale du maïs européenne (Lord, 2005). Le premier insecticide commercial basé sur *B. thuringiensis* dénommé Sporine, a été produit en France en 1938 et utilisé principalement pour contrôler les mites de farine (Nepl, 2000). En 1956, la principale activité insecticide de *B. thuringiensis* contre les insectes lépidoptères a été attribuée à des inclusions parasporales par les chercheurs Hannay et Fitz-James Angus. Cette découverte a augmenté l'intérêt pour les recherches sur les structures cristallines, la biochimie et le mécanisme d'action des toxines. La première procédure industrielle bien documentée pour produire une formulation de biopesticides à base de *B. thuringiensis* date de 1959, avec la fabrication de "Bactospeine" sous Brevet Français. En 1961, *B. thuringiensis* a été enregistrée comme biopesticide à l'agence de protection de l'environnement (EPA) aux Etats-Unis. Jusqu'en 1976, *B. thuringiensis* était disponible seulement pour le contrôle des lépidoptères (papillons diurnes et nocturnes), avec une souche très puissante *B. thuringiensis* supsp. *kurstaki* (Dulmage, 1970). Cette souche constitue toujours la base de nombreuses formulations de *B. thuringiensis*. En 1976, avec la découverte de *B. thuringiensis* supsp. *israelensis* par Margalit et Tahori en Israël, les maladies provoquées par les insectes ravageurs diptères tels que les moustiques et les mouches noires ont été mises sous contrôle (Margalit et Dean, 1985). En 1980, l'évolution des biotechnologies a stimulé le dépistage d'un grand nombre de différentes souches *B. thuringiensis* toxiques contre les autres ordres d'insectes.

B. thuringiensis tenebrionis a montré une efficacité contre les larves d'insectes coléoptères (Krieg *et al.*, 1983). *B. thuringiensis san diego* active contre les coléoptères (Hernstadt *et al.*, 1986) et *B. thuringiensis aizawai* active contre les deux ordres diptères et lépidoptères (Glazer et Nikaido 1994) ont été introduites dans les marchés. A la fin des années 1980, les premiers travaux ont été publiés sur l'insertion de gènes codant de protéines toxiques de

B. thuringiensis dans les plantes. Le tabac et la tomate ont été les premières plantes transgéniques exprimant les toxines de *B. thuringiensis* (Van Frankenhuyzen, 1993).

B. thuringiensis coton de champs a été la première plante pesticide de *B. thuringiensis* enregistrée par l'EPA des États-Unis (EPA, 1998). Le développement rapide de la technologie de l'ADN recombinant après 1990 est devenu un outil important pour développer génétiquement des pesticides *B. thuringiensis*. Aujourd'hui, les principales cultures transgéniques *B. thuringiensis* sont le maïs, le coton, les pommes de terre et le riz. Elles sont commercialisées et largement utilisées au Canada, Japon, Mexique, Argentine, Australie et États- Unis (Frutos *et al.*, 1999).

II.2.Caractéristiques générale de *B. thuringiensis*

Bacillus thuringiensis est une bactérie enthomopathogène, chimioorganotrophe, anaérobie facultative, Gram positif, sporulée, ayant des propriétés de résistance à la chaleur et à la déshydratation, se présente habituellement en paire ou en chaîne, pourvue de flagelles et mobile avec une ciliature péritriche, elle se développe naturellement comme saprophyte et se nourrit de la matière organique morte (Rahbani, 2015).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) est une bactérie Gram-positif appartenant au groupe de *B. cereus* qui comprend plusieurs espèces dont *B. cereus sensu stricto*, une bactérie responsable de toxi-infections alimentaires et *B. anthracis* qui est responsable de la maladie du charbon (Helgason *et al.*, 2000).

L'espèce *thuringiensis* se distingue par la production d'une ou plusieurs inclusions cristallines parasporales en phase de sporulation dont certaines ont une activité entomopathogène. En effet, lors d'un stress nutritionnel, *Bt* sporule et se transforme en un sporange renfermant la spore et un cristal formé par une ou plusieurs toxines.

Quand il se trouve dans un milieu propice, le sporange s'autolyse et libère la spore et le cristal. La spore peut germer pour redonner la cellule végétative qui prolifère si elle trouve les bonnes conditions (figure 05).

Classiquement, à partir de cultures, c'est l'observation microscopique de la présence d'un cristal protéique qui permet de différencier *B. thuringiensis* de *B. cereus* (Ankolekar and Labbé, 2010).

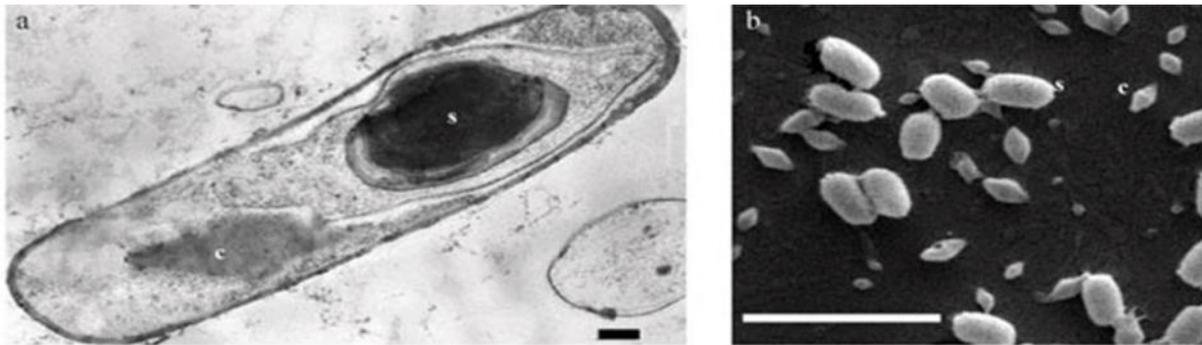


Figure 05: aspect du *Bacillus thuringiensis*.

- a-** photo d'un sporange de *Bt* renfermant la spore (S) et le cristal (C), barre d'échelle 0,2 μm ;
b- photo de spores de *Bt* (S) et de cristaux (C), barre d'échelle 5 μm (Sauka *et al.*, 2010).

B. thuringiensis, est une bactérie sporulant, flagellée, mobile, Gram positif et anaérobie facultative. A l'état végétatif *B. thuringiensis* à la forme d'un bâtonnet. Dans un milieu liquide standard, la taille des bâtonnets varie entre 3 et 5 μm de longueur et 1 μm de largeur. Les endospores de l'organisme comme celles des autres espèces de spores sont plus résistantes que les cellules végétatives à la chaleur, au séchage, à la désinfection et à d'autres agents destructeurs chimiques. Elles peuvent ainsi rester viables pendant plusieurs années.

Elle se caractérise par la formation d'inclusion parasporale (appelée aussi cristal protéique ou δ -endotoxine) dont la structure cristalline résulte de l'assemblage de sous unités protéiques de 130000 Kda (des protéines intracellulaires) au cours de la phase de sporulation de son cycle de croissance (Schnepf *et al.*, 1998). La synthèse des protéines cristallines parasporales est codée par des gènes *cry* qui résident sur des plasmides. Les δ -endotoxines présentent une activité toxique contre certains groupes d'insectes (Gonzales et Carlton, 1980). La formation des protéines cristallines est l'élément clé de discrimination de *B. thuringiensis* des espèces apparentées. Toutefois, les gènes portés par des plasmides peuvent être transférés à d'autres espèces apparentées par conjugaison et il a été constaté que ces espèces pouvaient exprimer la toxine et produire la protéine cristalline (Gonzalez and Carlton, 1982 ; Gonzalez *et al.*, 1981 ; Hu *et al.*, 2004). La production des toxines de *B. cereus*, de type entérotoxine, par *B. thuringiensis* a été observée, suggérant le transfert par conjugaison des gènes de production d'entérotoxine de *B. cereus* à *B. thuringiensis* (Carlson et Kolstø, 1993).

II.3. Classification de *B. thuringiensis*

L'espèce *B. thuringiensis* est subdivisée en plus de 70 sous-espèces. La classification de *B. thuringiensis* en sous espèces est basée sur les propriétés antigéniques de l'antigène flagellaire (Lecadet *et al.*, 1999). Un nouveau numéro de sérotype H et le nom de sous-espèce

sont attribués à chaque nouvelle souche qui porte un type d'antigène flagellaire qui diffère de façon détectable des autres dans les tests immunologiques.

La classification sérologique, bien que toujours utilisée comme méthode de base pour classifier les souches de *B. thuringiensis*, ne peut pas être liée à la pathogénicité (Federici *et al.*, 2010).

En 1999, les résultats issus de la sérotypie ont été mis à jour par Lecad et El khoury., 2013. Maintenant, il existe 69 H-sérotypes différents et 82 sérovars.

Tableau 02: Sérotypes de *B. thuringiensis* (Dromgny., 2008).

Antigènes flagellaires	Sous-especes de <i>B. thuringiensis</i>	Antigènes flagellaires	Sous-especes de <i>B. thuringiensis</i>
H1	<i>Bt subsp. Thuringiensis</i>	H29	<i>Bt subsp. Amagiensis</i>
H2	<i>Bt subsp. Finitimus</i>	H30	<i>Bt subsp. Medellin</i>
H3a,H3c	<i>Bt subsp. Alesti</i>	H31	<i>Bt subsp. Toguchini</i>
H3a,H3b,H3c	<i>Bt subsp. Kurstaki</i>	H32	<i>Bt subsp. Cameroun</i>
H3a, H3d	<i>Bt subsp. Sumiyoshiensis</i>	H33	<i>Bt subsp. Leesii</i>
H3a,H3d,H3e	<i>Bt subsp. Fukuokaensis</i>	H34	<i>Bt subsp. Konkukian</i>
H4a,H4d	<i>Bt subsp. Sotto</i>	H35	<i>Bt subsp. Seoulensis</i>
H4a,H4c	<i>Bt subsp. Kenyae</i>	H36	<i>Bt subsp. Malaysiensis</i>
H5a,H5c	<i>Bt subsp. Galleria</i>	H37	<i>Bt subsp. Anadalousiensis</i>
H5a,H5c	<i>Bt subsp. Canadensis</i>	H38	<i>Bt subsp. Oswaldocruzi</i>
H6	<i>Bt subsp. Entomocidus</i>	H39	<i>Bt subsp. Brasiliensis</i>
H7	<i>Bt subsp. Aizawai</i>	H40	<i>Bt subsp. Huazhongensis</i>
H8a,H8b	<i>Bt subsp. Morrisoni</i>	H41	<i>Bt subsp. Sooncheon</i>
H8a,H8c	<i>Bt subsp. Ostrinia</i>	H42	<i>Bt subsp. Jinghongensis</i>
H8b,H8d	<i>Bt subsp. Nigeriensis</i>	H43	<i>Bt subsp. Guiyanguebsus</i>
H9	<i>Bt subsp. Tolworthi</i>	H44	<i>Bt subsp. Higo</i>
H10a,H10b	<i>Bt subsp. Darmstadiensis</i>	H45	<i>Bt subsp. Roskildiensis</i>
H10a,H10c	<i>Bt subsp. Londrina</i>	H46	<i>Bt subsp. Chanpaisis</i>
H11a,H11b	<i>Bt subsp. Toumanoffi</i>	H47	<i>Bt subsp. Wratislaviensis</i>
H11a,H11c	<i>Bt subsp. Kyushuensis</i>	H48	<i>Bt subsp. Balearica</i>
H12	<i>Bt subsp. Toumanoffi</i>	H49	<i>Bt subsp. Muju</i>
H13	<i>Bt subsp. Pakistani</i>	H50	<i>Bt subsp. Navarrensensis</i>
H14	<i>Bt subsp. Israelensis</i>	H51	<i>Bt subsp. Xiaguangensis</i>

H15	<i>Bt subsp. Dokota</i>	H52	<i>Bt subsp. Kim</i>
H16	<i>Bt subsp. Indiana</i>	H53	<i>Bt subsp. Asturriensis</i>
H17	<i>Bt subsp. Tohokuensis</i>	H54	<i>Bt subsp. Poloniensis</i>
H18a,H18b	<i>Bt subsp. Kumamotoensis</i>	H55	<i>Bt subsp. Palmanyolensis</i>
H18a,H18c	<i>Bt subsp. Yosso</i>	H56	<i>Bt subsp. Rongseni</i>
H19	<i>Bt subsp. Tochigiensis</i>	H57	<i>Bt subsp. Pirenaica</i>
H20a,H20b	<i>Bt subsp. Yunnanensis</i>	H58	<i>Bt subsp. Argentinensis</i>
H20a,H20c	<i>Bt subsp. Pondicheriensis</i>	H59	<i>Bt subsp. Iberica</i>
H21	<i>Bt subsp. Colmeri</i>	H60	<i>Bt subsp. Pingluonsis</i>
H22	<i>Bt subsp. Shandongiensis</i>	H61	<i>Bt subsp. Sylvestriensis</i>
H23	<i>Bt subsp. Japonensis</i>	H62	<i>Bt subsp. Zhaodongensis</i>
H24a,H24b	<i>Bt subsp. Neoleonensis</i>	H63	<i>Bt subsp. Bolivia</i>
H24a,H24c	<i>Bt subsp. Novosibirsk</i>	H64	<i>Bt subsp. Azorensis</i>
H25	<i>Bt subsp. Coreanensis</i>	H65	<i>Bt subsp. Pulsiensis</i>
H26	<i>Bt subsp. Silo</i>	H66	<i>Bt subsp. Gracioensis</i>
H27	<i>Bt subsp. Mexicanensis</i>	H67	<i>Bt subsp. Wazensis</i>
H28a,H28b	<i>Bt subsp. Monterry</i>	H68	<i>Bt subsp. Thailandensis</i>
H28a,H28c	<i>Bt subsp. Jegathesan</i>	H69	<i>Bt subsp. Pahangi</i>

II.4. Propriétés macroscopique et microscopique de *B. thuringiensis* :

B. thuringiensis forme des colonies blanches, mâtes et à bord dentelée, qui se multiplient rapidement sur un milieu gélosé (Figure.06). Les spores de *B. thuringiensis* sont ovalaires, et réfringentes (Figure.07).



Figure 06 : Colonies de *B. thuringiensis* formées sur un milieu T3 gélosé.

Les inclusions de cristaux parasporaux peuvent être facilement observées à l'aide d'un

microscope de contraste de phase. La morphologie, la taille et le nombre d'inclusions cristallines peuvent varier selon les souches de *B. thuringiensis* : cristaux typiques bipyramidaux (Aronson et Fritz-James, 1976) (Figure 07), inclusions cubiques (Ohba et Aizawi, 1986), cristaux amorphes et composites (Federici *et al.*, 1990), cristaux carrés plats (Hernstand *et al.*, 1986; Lopez-Meza et Ibarra, 1996), cristaux sphériques (Guan *et al.*, 2014) et cristaux irréguliers pointus (Srinivas *et al.*, 1997).

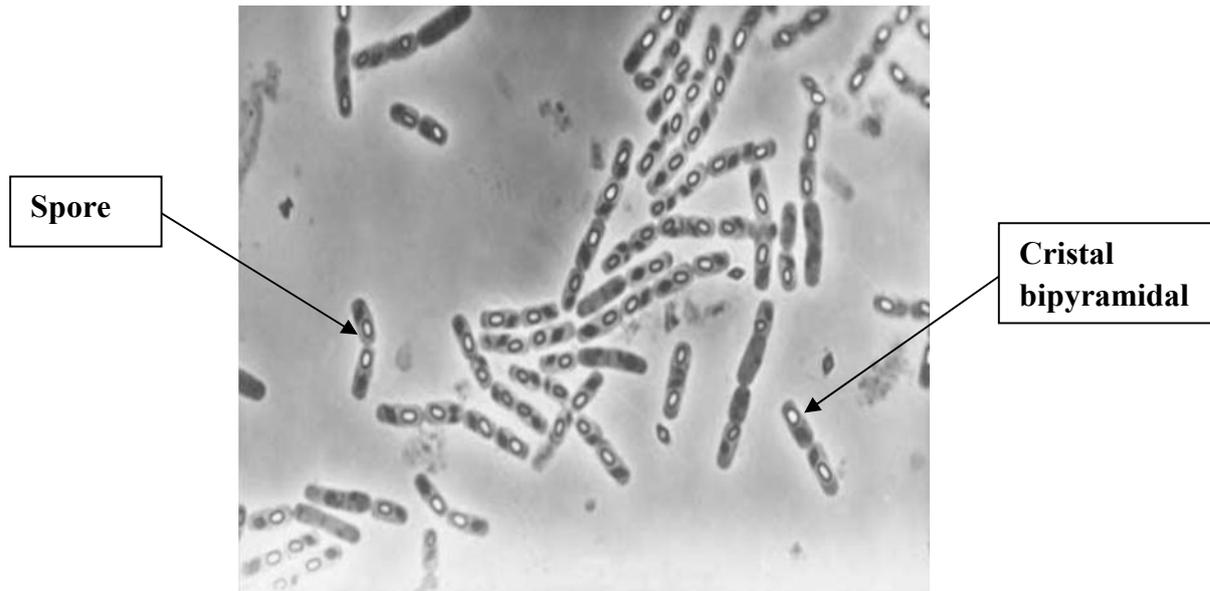


Figure.07: Photographie prise au microscope d'une culture de *B. thuringiensis kurstaki* au cours de la phase de sporulation (Aronson et Fritz-James, 1976).

Parmi différentes souches de *B. thuringiensis* isolées dans plusieurs régions du monde, 47 % des isolats formant des cristaux bipyramidaux se sont révélés toxiques contre les lépidoptères, 1 % contre les diptères, 0,5 % à la fois contre les diptères et les lépidoptères et 34 % non-toxiques. Aucune relation évidente entre morphologie des cristaux et toxicité n'a pu ainsi être démontrée (Martin et Travers, 1989). La morphologie des cristaux, bien qu'importante, ne permet donc pas toujours de prédire la toxicité.

II.5. Ecologie et prévalence

B. thuringiensis est une bactérie du sol, vivant à la fois comme saprophyte, utilisant les matières organiques provenant des organismes morts, et parasitaire, colonisant les insectes vivants (Glazer et Nikaido, 1994). Elle peut être naturellement présente dans différents habitats comme les grains, la poussière des produits stockés, les cadavres d'insectes, les terres agricoles, et différentes plantes et milieux aquatiques (Martin et Travers, 1989; Meadows *et al.*, 1992; Ben-Dov *et al.*, 1997; Bel *et al.*, 1997 ; Theunis *et al.*, 1998 ; Mizuki *et al.*, 1999;

Iriarte *et al.*, 2000). Au cours des dernières années, *B. thuringiensis* a également été retrouvé dans d'autres milieux tels que les boues activées (Mizuki *et al.*, 2001, Mohammedi *et al.*, 2006).

Le vrai rôle écologique de *B. thuringiensis* est mal compris. Meadows *et al.* (1992) ont analysé *B. thuringiensis* comme un entomopathogène, comme un habitant de phylloplan et un microorganisme du sol. Bien qu'il soit connu que *B. thuringiensis* produise différentes protéines toxiques efficaces contre de nombreux ordres d'insectes, certaines souches ne présentent pas de toxicité (Maeda *et al.*, 2000). Les activités insecticides de *B. thuringiensis* sont rares dans la nature. Itoquou-Apoyolo *et al.* (1995) ont suggéré que les habitats à forte densité de mortalité d'insectes sont le résultat de l'action pathogène de *B. thuringiensis* alors qu'Iriarte *et al.* (2000) n'ont pas trouvé de relation entre les sites de reproduction des moustiques et le niveau d'action pathogène de *B. thuringiensis* dans les habitats aquatiques étudiés.

II.6. Cycle de vie de *B. thuringiensis* :

Le cycle de vie de *B. thuringiensis* (Figure 08) se caractérise par deux phases principales qui comprennent la division cellulaire végétative et le développement des spores (Bulla *et al.*, 1980). 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. La cellule végétative 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 (Lui et Tzeng, 2000). Dans ces conditions, la bactérie sporule produisant une spore et une inclusion cristalline. La sporulation est une manifestation physiologique de la bactérie soumise à des conditions environnantes difficiles. Lors du passage de la phase végétative à la sporulation, des changements significatifs sont observés au niveau du métabolisme et de la cinétique cellulaire (Rivera, 1998).

La production de protéines cristallines de *B. thuringiensis* pendant la sporulation est un Phénomène biologique unique régulé génétiquement qui, probablement, soulage, le stress Physique par compensation de la perte d'eau au cours de la formation de spores. De plus, elle

Offre un avantage de survie supplémentaire en exerçant une action létale contre les insectes hôtes qui sous l'action toxique offrent des nutriments permettant la germination de la spore et son retour à la croissance végétative.

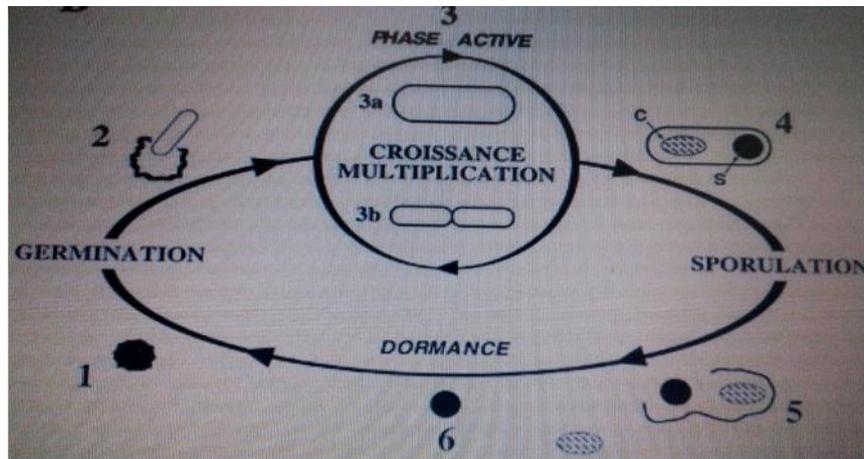


Figure 08: Schéma du cycle de vie de *B. thuringiensis* (Bulla *et al.*, 1980).

1) germination : réhydratation de la spore ; 2) germination : production de la cellule végétative ; 3) croissance et multiplication des cellules végétatives ; 4) sporulation : formation de la spore (s) et de l'inclusion cristalline (c) ; 5) lyse : éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et du cristal ; 6) période de dormance : la spore résiste aux conditions.

II.7. Génétique de *B. thuringiensis*

II.7.1. Génome de *Bacillus thuringiensis*

Les souches de *B. thuringiensis* ont une taille génomique d'environ 2,4 à 5,7 Mb (Carson *et al.*, 1994). Une carte chromosomique a été établie pour *B. thuringiensis* (Carson *et al.*, 1996). Une comparaison avec la carte chromosomique de *B. cereus* suggère que tous ces chromosomes ont une organisation similaire dans la moitié située près de l'origine de la réplication, tout en affichant une plus grande variabilité dans la moitié terminale (Carson *et al.*, 1994).

La plupart des isolats de *B. thuringiensis* ont plusieurs éléments extra-chromosomiques (plasmides) dont la taille varie de 2 à 200 kb. Certains de ces plasmides sont circulaires et certains sont linéaires. Les protéines de cristal parasporal sont généralement codées par de grands plasmides. Des études d'hybridation des séquences avec des sondes de gène de cry ont démontré que des gènes cry sont également trouvés dans le chromosome bactérien (Carson *et al.*, 1996). *B. thuringiensis* contient également une grande variété d'éléments transposables (Mahillon *et al.*, 1994). Ces éléments transposables seraient impliqués dans l'amplification des gènes cry dans la cellule bactérienne.

Un autre rôle possible de ces éléments pourrait être de faciliter le transfert du plasmide par processus de conjugaison impliquant des formations de structures cointégrées auto-conjuguées

entre les plasmides et l'ADN chromosomique ou plasmides non conjugués. La dernière fonction de ces éléments peut être le transfert horizontale du matériel génétique, y compris les gènes cry, au sein des espèces de *B. cereus* et de *B. thuringiensis* (Schnepf *et al.*, 1998).

II.8. Les facteurs de virulences de Bt

B. thuringiensis est classée comme entomopathogène et développe un arsenal de mécanismes participant à sa virulence (Raymond *et al.*, 2010). Parmi ces facteurs de virulence, les toxines Cry et Cyt sont responsables de l'essentiel de la toxicité et sont donc largement utilisées pour lutter contre les insectes ravageurs ou vecteurs de maladies (Raymond *et al.*, 2010).

II.8.1. Protéines cristallins: Les δ -endotoxines et les β -exotoxines

II.8.1.1. Les protéines Cry et Cyt

Les inclusions cristallines produites par *Bacillus thuringiensis* sont appelées δ -endotoxines ; Il existe deux types de protéines cristallines insecticides, Cry et Cyt.

La nomenclature des toxines Cry est basée sur l'ordre de découverte des toxines Cry et sur l'identité de séquence des acides aminés.

Les gènes codant pour plus de 150 protéines Cry et 12 protéines Cyt ont été clonés et séquencés (Raymond *et al.*, 2010). Certains gènes cry (comme cry I A) dépendent de la sporulation. Ils sont contrôlés par des facteurs sigma spécifiques de la sporulation Sig K et/ou Sig E (Federici *et al.*, 2010). D'autres, tel cry III A, sont exprimés à partir d'un promoteur dont l'activation est indépendante de tous les gènes impliqués dans l'initiation de la sporulation ou des facteurs impliqués dans la sporulation (Agaisse et Lereclus, 1995). La plupart des gènes cry sont localisés sur de grands plasmides de conjugaison, Le transfert de ces plasmides par conjugaison entre différentes sous-espèces favorise la diversité génétique (Thomas *et al.*, 2001).

La production de 760 types de protéines cristallines par *B. thuringiensis* a été rapportée ;

Les différentes δ -endotoxines Cry ont été classées, Ces protéines sont groupées en 72 classes Cry (723 sous-familles) et 3 classes Cyt (37 sous-familles). Les gènes de chaque classe sont identiques les uns aux autres à plus de 45 %. Le produit de chaque gène cry a généralement un spectre d'activité restreint, limité au stade larvaire d'un petit nombre d'espèces (Sanchis et Bourguet, 2008).

Parmi les 335 toxines Cry connues et produites par les différentes souches de *Bacillus thuringiensis*, au moins 125 ont une activité insecticide. Une vingtaine seulement ont été sélectionnées pour leurs spécificités d'action contre certains nuisibles et sont utilisées commercialement soit sous formes de bioinsecticides (spores contenant des combinaisons

de toxines Cry) soit dans des OGM (Organismes Génétiquement Modifiés: plantes dans lesquelles sont insérés un ou plusieurs gènes codant pour les toxines Cry insecticides) (Frankenhuyzen, 2011).

Les toxines Cry partagent une homologie de leur structure tridimensionnelle et sont composées de trois domaines principaux : un domaine à hélices alpha (domaine 1) et deux domaines à feuillets beta (domaine 2 et 3) (Bravo et al., 2011). Le domaine 1 participe à la formation d'un pore par l'insertion de certaines hélices alpha dans la membrane des cellules. Les domaines 2 et 3 sont responsables de la fixation au récepteur membranaire et de la spécificité des toxines Cry contre les différents ordres d'insectes (Palma et al., 2014) (Figure 09).

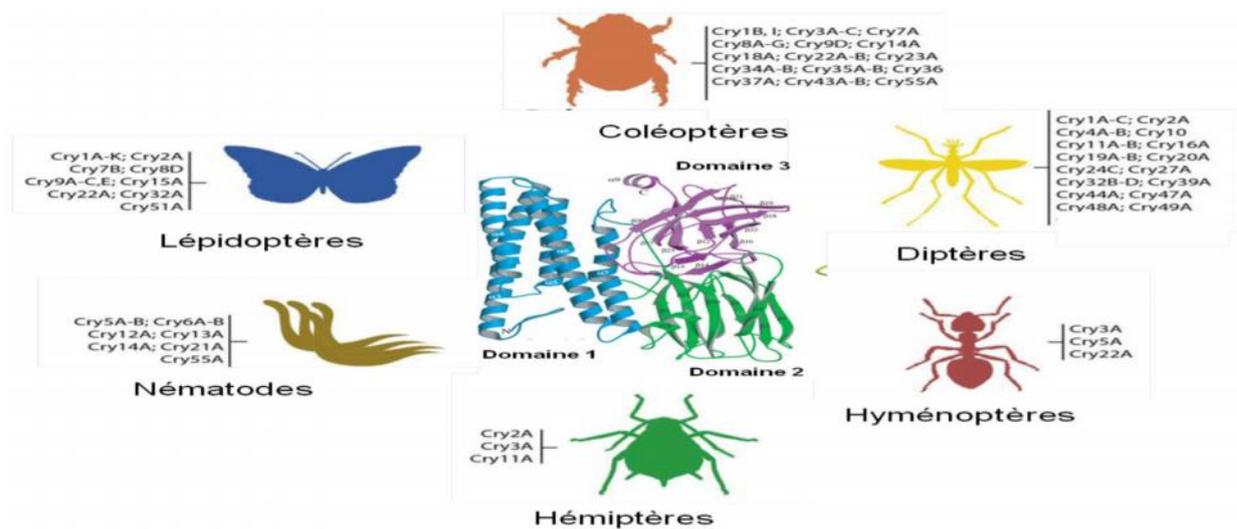


Figure.09: Principales toxines Cry actives contre les différents ordres d'insectes (Coléoptères, Diptères, Hyménoptères, Hémiptères, Lépidoptères) et contre les Nématodes et la structure tridimensionnelle de la toxine Cry4Ba active contre les Diptères. Le domaine 1 (hélices alpha) est coloré en bleu, le domaine 2 (feuillets bêta) est coloré en vert et le domaine 3 (feuillets bêta) est coloré en violet (Palma et al., 2014).

II.8.2. Autres toxines de *B. thuringiensis*

D'autres toxines sont produites pendant la phase végétative de *Bacillus thuringiensis*: les Vip (pour vegetative insecticidal proteins) et les Sip (pour secreted insecticidal proteins), les β -exotoxines et certaines entérotoxines diarrhéiques (hémolysine BL, l'entérotoxine non hémolytique et la Cytotoxine K). Les Vip et les Sip ont aussi une activité insecticide et ont pour cible aussi le tube digestif (formation de pores dans les membranes des cellules intestinales). Les β -exotoxines sont de petits oligosaccharides actifs sur différents ordres d'insectes. Elles peuvent aussi avoir une activité même sur des organismes non cibles comme les nématodes et les mammifères (leur mode d'action n'est pas encore bien caractérisé mais elles sont capables d'affecter la mue et la pupaison de certains insectes par l'inhibition de

l'ARN polymérase) (Boonserm et al., 2005). Les entérotoxines diarrhéiques (connues pour être produites par *Bacillus cereus*) ont été trouvées dans la plupart des souches de *Bacillus thuringiensis* utilisées comme bioinsecticides (Ginsburg, 2006).

les PIV, protéines insecticides sont sécrétées par la cellule dans le milieu de croissance (Arora et al., 2003). Outre les PIVs, *B. thuringiensis* est aussi capable de produire des α -exotoxines, β -exotoxines, hémolysines, entérotoxines, chitinases et phospholipases (Hansen et Salamiton, 2000).

Les observations indiquent que les β -exotoxines interfèrent avec les cellules en mitose. Il y a une réglementation stricte dans de nombreux pays pour limiter les β -exotoxines dans la lutte contre les insectes ravageurs en raison du risque pour les organismes non-cibles et les mammifères (Glare et O-Callaghan, 2000). Cependant, Tsuchiya *et al.* (2002) ont proposé d'examiner la possibilité de l'application pratique des β -exotoxines dans la lutte contre les coléoptères ravageurs, comme le dendroctone de cigarette et le doryphore, *Leptinotarsa decemlineata*.

II.8.3. Mode d'action de *B. thuringiensis*

II.8.3.1. Activité insecticide de *B. thuringiensis*

Connaître précisément les protéines insecticides produites par un isolat de *B. thuringiensis* ne suffit pas pour expliquer sa toxicité vis à vis d'une espèce d'insecte ou de nématode particulière. Plusieurs éléments autres que les endotoxines de *B. thuringiensis* contribuent à cette activité.

Dans certains insectes cibles, les protéines Cry seules sont suffisantes pour intoxiquer les larves en détruisant assez de cellules épithéliales de l'intestin pour permettre au jus alcalin de l'intestin de s'écouler dans l'hémolymph et augmenter le pH du sang, ce qui provoque la paralysie et l'arrêt de l'alimentation (Heimpel and Angus, 1960). C'est généralement suivi de la mort en quelques jours comme dans le cas des moustiques et des mouches noires.

Il existe trois modèles différents et non exclusifs expliquant le mode d'action des toxines Cry sur les cellules intestinales. Le premier modèle suggère que les toxines Cry activées se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques et forment des pores non sélectifs permettant la fuite des ions, des acides aminés et des sucres. Ces pores provoquent la lyse des cellules épithéliales et la destruction de l'intestin et par conséquent la mort de l'insecte (Kirouac *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2012).

Le deuxième modèle suggère que les toxines Cry actives se fixent sur des cadhérines épithéliales. Cela induit un changement de conformation favorisant l'oligomérisation des Cry. La fixation de l'oligomère à un récepteur secondaire (plusieurs récepteurs semblent être

impliqués comme l'aminopeptidase-N, des alpha amylases, et des alcaline phosphatases) permet la formation d'un pore dans la membrane induisant ainsi une lyse osmotique des cellules épithéliales et par la suite la mort de l'insecte (Bravo et al., 2011; Pardo-López *et al.*, 2013). Le troisième modèle suggère que la fixation des toxines à leur récepteur (les cadhérines épithéliales) affecteraient des voies de signalisation cellulaire cadhérine dépendantes induisant l'apoptose des cellules (Vachon *et al.*, 2012).

Dans tous ces cas, les altérations cellulaires se produisent rapidement après l'ingestion des sporanges de *Bt* et l'épithélium intestinal est détruit en quelques heures (Figure.10), provoquant ainsi un arrêt de la prise alimentaire. De plus, les spores sont capables de coloniser l'hémolymphe et germer induisant ainsi une septicémie pouvant être responsable de la mort de l'insecte dans les 24-72 heures qui suivent l'intoxication (Raymond *et al.*, 2010; Soberón *et al.*, 2009).

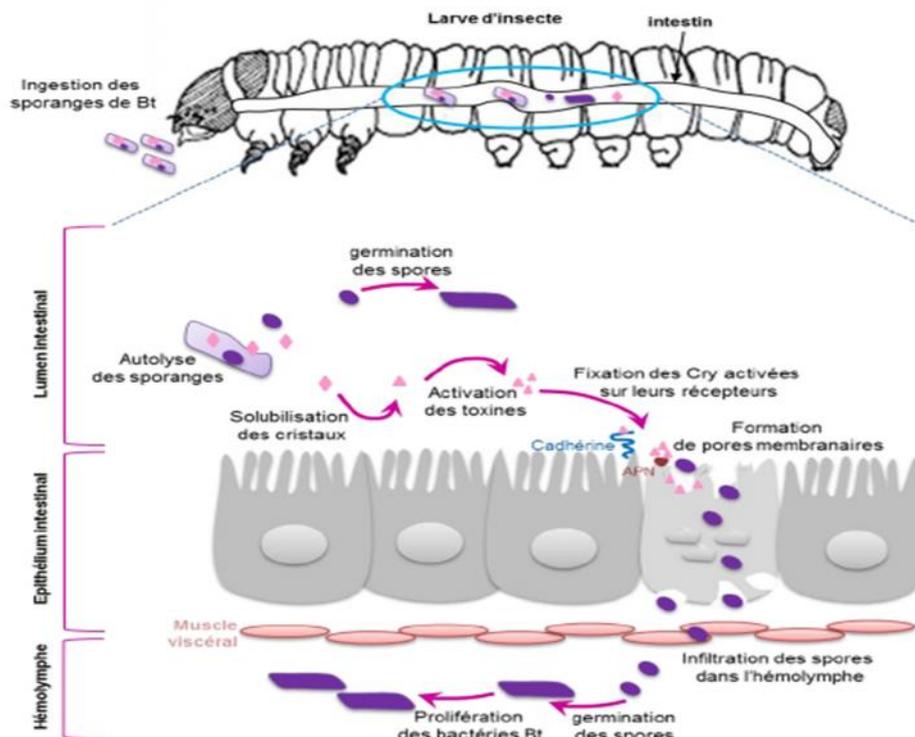


Figure.10: Schéma décrivant le devenir des sporanges de *Bt* et des toxines Cry dans l'intestin après leur ingestion par les larves d'insectes cibles.

Grace à ses propriétés entomopathogènes, *B. thuringiensis* est utilisé à hauteur de 90% du total des ventes des bioinsecticides dans le monde. L'activité insecticide de ces toxines est spécifique d'un ordre d'insectes: par exemple, les protéines Cry1 et Cry2 sont actives sur certains Lépidoptères, alors que les toxines Cry3 sont actives sur certains Coléoptères et les toxines Cry4 sur des espèces de Diptères (Figure II. 6), (Bravo *et al.*, 2011).

Certaines toxines Cry sont actives sur d'autres invertébrés comme les nématodes (Cry 5 et

Cry 6) et les Gastéropodes (Cry1Ab), alors que d'autres Cry n'ont pas d'effets sur les invertébrés (comme Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A et Cry64A) mais ont une activité spécifique contre différentes cellules cancéreuses humaines, (**Figure.11**) (Palma et al., 2014).

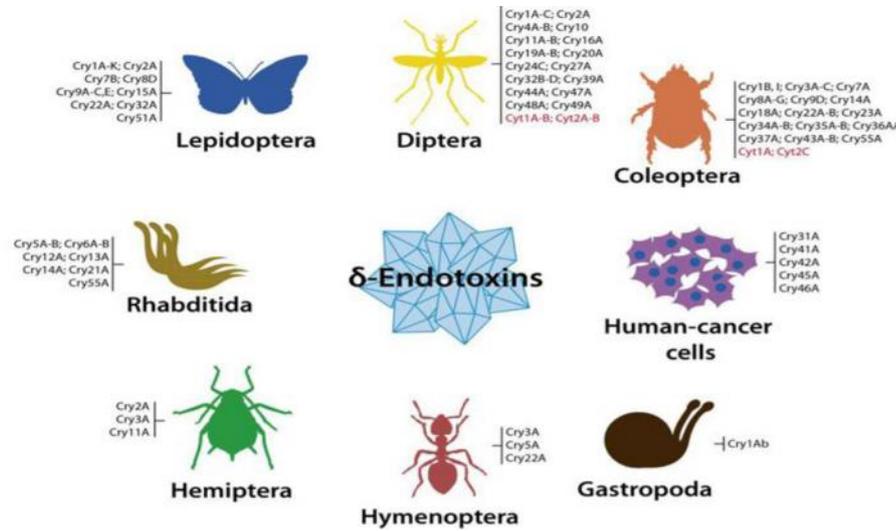
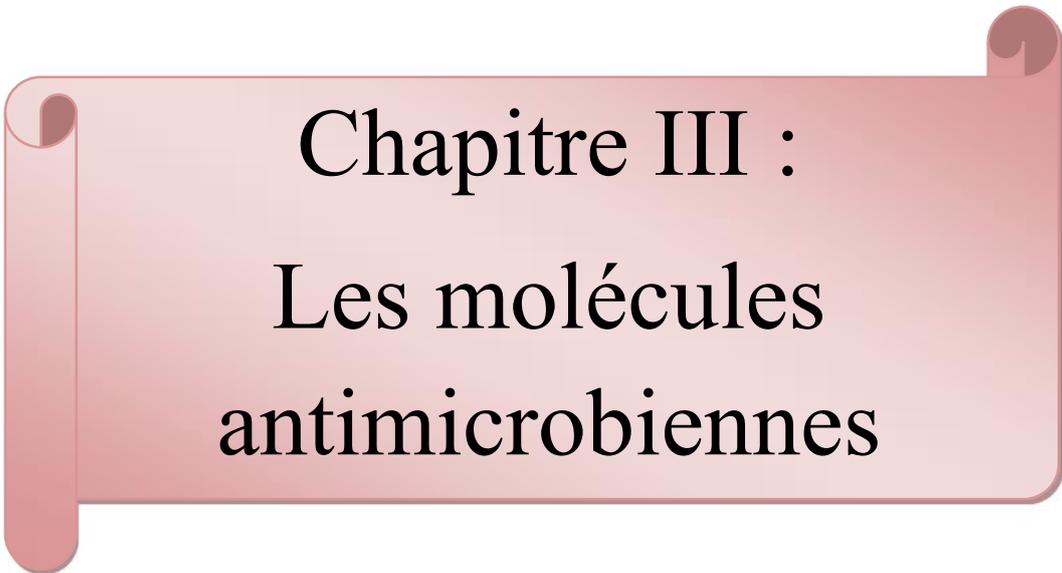


Figure.11: Schéma illustrant les cibles des delta-endotoxines produites par *Bacillus thuringiensis* (principalement les toxines Cry), (Palma et al., 2014).

En plus des toxines Cry, les différentes souches de *Bt* sont capables de produire d'autres δ-endotoxines en phase de sporulation, ce sont les toxines Cyt aux propriétés cytolytiques. Les toxines Cyt ont une activité insecticide spécifique contre certains diptères (Thomas et Ellar, 1983). De plus, la présence des toxines Cyt semble être importante pour renforcer l'action de certaines toxines Cry (Wirth *et al.*, 2005)



Chapitre III :
Les molécules
antimicrobiennes

III. Les molécules antimicrobiennes

III.1 Les molécules antimicrobiennes

Pour combattre la pathogénicité des microorganismes, l'homme a utilisé depuis, l'antiquité des pâtes moisisées sur les plaies infectées et malgré les effets bénéfiques, il ne comprenait pas le phénomène en question. En 1928, le microbiologiste Alexander Fleming a constaté que l'une de ses cultures bactériennes, une souche de *Staphylococcus aureus*, était envahie par la moisissure, *Penicillium notatum*. Cette observation miraculeuse était à l'origine d'une des plus grandes révolutions du monde médical par l'ouverture de l'ère des antibiotiques.

Par cette observation, Fleming déduisait que *Penicillium notatum* avait secrété une substance qui avait inhibé la croissance de la souche *Staphylococcus aureus*. Il a nommé cette substance la pénicilline. En 1938, le Français René Dubos a purifié le premier antibiotique, la Gramacidine ce qui a permis à Florey et Chain en 1939 de purifier la pénicilline G. Cet antibiotique a été utilisé pour la première fois en médecine humaine en 1941 pour le traitement des infections bactériennes. Depuis, la quête de nouveaux antibiotiques se poursuit de plus belle. Avec la découverte des antibiotiques, l'humanité a disposé d'un moyen et d'un remède extrêmement efficace contre les bactéries pathogènes qui l'accablaient depuis des millénaires (Coates et Hu, 2007).

Lors de la découverte des antibiotiques, le mot antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») désigne une substance naturelle qui a une action d'inhibition ou de destruction spécifique contre les bactéries. Actuellement, cette définition s'est encore élargie pour devenir : toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique qui a le pouvoir d'inhiber ou détruire des microorganismes (bactéries et champignons) et également d'avoir des actions anti-inflammatoires, anti-suppresseurs et anti-tumorales.

Concernant l'action antifongique des antibiotiques, il est à noter que plusieurs de ces molécules, notamment celles de la famille des macrolides, en plus de leurs activités antibactériennes possèdent des activités antifongiques. Au contraire, un antifongique possède une action spécifique uniquement contre les champignons.

Ci-après, nous allons développer les différents types de molécules antimicrobiennes : les antibiotiques, les antifongiques et les bactériocines.

III.1.1 Les antibiotiques

III.1.1.1. Historique et intérêt de recherche de nouvelles molécules antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire. L'âge

d'or dans la découverte des antibiotiques a été la période des années 1940 - 1960 (Coates et Hu, 2007) et la lutte contre les maladies infectieuses a pris alors une importance pour atteindre son apogée au cours des années 70. Les programmes de recherche des nouveaux antibiotiques a fortement ralenti par la suite. A partir des années 80, l'apparition de nouvelles maladies et l'émergence du phénomène de la multirésistance aux antibiotiques, ont suscité de nouveau le besoin de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques originales. A partir des années 90, la découverte de nouvelles molécules à propriété antibiotique a commencé à se raréfier même si plusieurs composés bioactifs d'origine microbienne ont été découverts mais la majorité se sont révélés être des analogues de molécules déjà connues (Berdy, 2005).

Actuellement, face au phénomène de la multirésistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques qui ne cesse malheureusement de progresser et continue de causer de véritables échecs thérapeutiques en Algérie et dans le monde (Paterson, 2006; Touati, 2006; Touati *et al.*, 2006; Aggoune-Khinache *et al.*, 2008; Messai *et al.*, 2008; Okesola et Makanjuola, 2009 ; Nordmann *et al.*, 2011), la recherche perpétuelle de nouvelles molécules antibiotiques doit être la priorité des chercheurs et cliniciens dans le monde.

III.1.1.2. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Le genre *Streptomyces* est le producteur du plus grand nombre de molécules actives connues, soit 80% des antibiotiques d'origine actinobactérienne (Demain, 2006; Jose *et al.*, 2011 ; Solecka *et al.*, 2012). Par ailleurs, beaucoup d'autres genres d'actinobactéries comme *Saccharothrix*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Streptosporangium*, etc., ont déjà montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes (Flatt *et al.*, 2013; Nakae *et al.*, 2013).

Concernant les bactéries non mycéliennes, les *Bacillaceae* (ex.: *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*) et les *Pseudomonadaceae* (ex.: *Pseudomonas*) occupent une place très importante suivis par d'autres genres tels que *Micrococcus*, *Proteus*, *Chromobacterium* (Solecka *et al.*, 2012).

Au cours de ces dernières années, le nombre de champignons producteurs d'antibiotiques a augmenté en passant de 10% (Breton *et al.*, 1989; Sanglier, 1990) aux environs de 38% (Solecka *et al.*, 2012). La plupart des champignons producteurs de molécules bioactives sont des ascomycètes ou des formes imparfaites telles qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium* (Barrett, 2002).

III.1.1.3. Classification et mode d'action des antibiotiques

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents

infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques. En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les β -lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicol, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptides cycliques, etc.

Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire nos cellules.

En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte.

Comme le montre la figure 1, le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre.

On distingue des antibiotiques : Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane ; Inhibiteurs de la synthèse protéique ; et Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs.

III.1.1.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram+ et à Gram-. La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives : la première qui se passe à l'intérieur de la bactérie, consiste en la formation des unités de base, l'UDP-N-acétyl-glucosamine et l'UDP-N-acétylmuramyl-pentapeptide. La deuxième étape permet le passage par un système de transporteurs lipidiques à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former une molécule de disaccharide-pentapeptide. Au cours de la troisième étape, cette molécule s'intègre au peptidoglycane préexistant et, à ce stade, deux enzymes essentielles interviennent: une transglycosylase qui permet l'attachement des disaccharides-pentapeptides entre elles aboutissant à la formation des chaînes polysaccharidiques, et une transpeptidase qui réticule les chaînes entre elles par formation d'une liaison peptidique entre l'alanine-4 d'un disaccharide –pentapeptide et le peptide d'une chaîne voisine.

Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple, les β -lactames inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (Davies et Mazel, 1997).

III.1.1.3.2 Inhibiteurs de la synthèse protéique

Plusieurs antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes et la biosynthèse des protéines des microorganismes. Dans cette classe on peut citer :

* Les phénicol, qui se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl. Ils inhibent l'élongation de la chaîne peptidique ce qui arrête le mouvement des ribosomes le long de l'ARN messager.

* Les tétracyclines, qui se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl et aussi au niveau du site peptidyl. La conséquence est l'arrêt de la fixation du nouvel aminoacyl-tRNA sur le ribosome et un arrêt de l'élongation des chaînes peptidiques.

* L'acide fusidique, qui en se liant au site aminoacyl, bloque l'adjonction d'un nouvel acide aminé dans la chaîne peptidique en formation (blocage de la translocation).

* Les aminosides agissent sur divers métabolismes cellulaires dont la synthèse des protéines. Ils pénètrent dans le cytoplasme par un mécanisme actif nécessitant de l'énergie (systèmes de transporteurs d'électrons et ATP). Ces antibiotiques sont des inhibiteurs de la traduction. En effet, ils provoquent des erreurs de lecture du message porté par l'ARN messager ce qui engendre plusieurs perturbations : altération fonctionnelle de la membrane cytoplasmique, blocage des systèmes de sécrétion et de respiration, etc.

* Les macrolides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. Les macrolides empêchent la translocation et par suite l'incorporation des aminoacides (Davies et Mazel, 1997).

III.1.1.3.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs

Dans cette classe, on trouve deux groupes d'antibiotiques. Un premier agit directement sur la synthèse des acides nucléiques, et un deuxième groupe intervient au niveau de leurs précurseurs de synthèse. Dans le premier groupe on peut distinguer :

* Les quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN tel que les topoisomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN.

* Les nitroimidazoles sont des antibiotiques limités aux bactéries anaérobies. La condition nécessaire à l'activité de ces antibiotiques est la réduction partielle de leurs groupements NO₂. Les dérivés réduits se fixent sur l'ADN, notamment au niveau des régions riches en adénine et en thymine, provoquant ainsi des coupures des brins et le déroulement de l'ADN (Le Minor et Veron, 1989).

* Les nitrofuranes nécessitent la réduction préalable du groupement NO₂ pour leur action.

Cette réduction est réalisée par les nitroréductases des bactéries aérobies. Les dérivés réduits réagissent de façon électrostatique avec l'ADN, provoquant ainsi des coupures, substitutions de bases et même un effet mutagène.

Le deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines.

Comme nous venons de le décrire, on distingue plusieurs classes d'antibiotiques qui diffèrent selon leur structure chimique mais également selon leur mode d'action. Plusieurs travaux de recherche ont été effectués sur les différentes classes d'antibiotiques (Davies et Mazel, 1997).

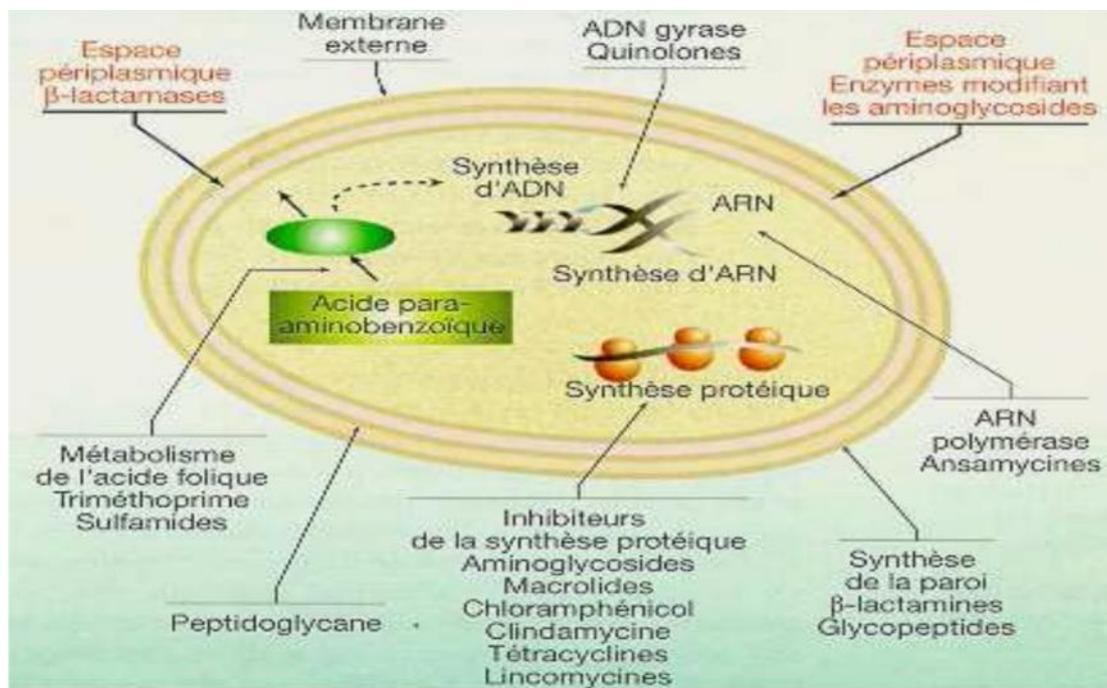


Figure.12 : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Davies et Mazel, 1997)

III.1.2. Les antifongiques

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons. Ces organismes forment un groupe phylogénétique homogène constitué de champignons macroscopiques et de champignons microscopiques (mycètes) à savoir les levures et les moisissures qui peuvent être saprophytes ou parasites. Dans ce dernier cas, ils peuvent attaquer soit l'être humain et on parle de mycose, soit les plantes causant ainsi des maladies cryptogamiques (Baginski *et al.*, 2005).

III.1.2.2. Les antifongiques luttant contre les maladies cryptogamiques

Une maladie cryptogamique est une maladie causée par un champignon microscopique parasitant une plante. Les différentes formes de maladies cryptogamiques représentent environ 90% des maladies des végétaux. Pour que la maladie d'une plante se développe, trois composantes sont nécessaires : la plante et le pathogène, qui doivent se mettre en contact et interagir, et les conditions de l'environnement qui favorisent la prolifération du pathogène (Bouزيد, 2002).

III.1.2.3. Les chitinases

La chitine est un polymère composé d'unités répétitives de N-acétyl- D-glucosamine et on le trouve dans les champignons, les coquilles de crevettes, écailles de poissons, mollusques, ainsi que dans le plumage des oiseaux et des papillons ailes (Morganti, 2012).

Les Chitinases sont produits et sécrétés par les les procaryotes et les eucaryotes, y compris les humains, les plantes, les champignons et les insectes. Les bactéries synthétisent une myriade d'enzymes chitinolytiques pour transformer la chitine en carbone et en azote. Auparavant, les chitinases ont été classés comme endochitinases, exochitinases (chitobiosidases, chitobiasés) et N-acétylglucosaminidases, selon les produits générés lors de processus d'hydrolyse. Actuellement, et selon la base de données CAZy1, les enzymes chitinolytiques sont classées en deux groupes généraux : chitinases (CE 3.2.1.14) et b-N-acétylhexosaminidases (CE) 3.2.1.52), précédemment appelées les endochitinases et les exochitinases, respectivement. Les Chitinases hydrolysent les chaînes de chitine sur les sites internes au hasard, alors que les b-N-acétylhexosaminidases hydrolysent la chitine de l'extrémité non réductrice de la molécule en enlevant les Résidus de GlcNAc. Ces enzymes sont regroupées en différentes familles d'hydrolases de glycosides (GH) selon la similitudes de séquences d'acides aminés : les endochitinases représentent quatre groupes (GH18, GH19, GH23 et GH48), tandis que b Nacetylhexosaminidases représentent six groupes (GH3, GH5, GH18, GH20, GH84, GH116).

III.1.2.4.les biosurfactants

III.1.2.4.1.Définition

La famille des surfactines est considérées comme étant la première famille de lipopeptides et englobe les variantes héptapeptidiques ; d'espérine , la lichenysine, la pumilacidine et la surfactine .

Les surfactants sont des composés amphipathiques avec des groupements hydrophiles et hydrophobes (**figure 14**). Le cycle héptapeptidiques est directement lié a une longue chaîne

hydrocarbonée (C12-C16), par une liaison ester interne entre la fonction hydroxyle de l'acide α -amine C-Terminal, la D-Tyr et la fonction carboxyle de la D-allo Thr. (Zihahirwa , 2017).

Les surfactines synthétiques sont généralement toxiques et difficiles à décomposer par l'action des micro-organismes. Ces dernières années, de tels problèmes ont incité à rechercher des agents de surface plus respectueux de l'environnement, tels que ceux obtenus par la production microbienne, connue sous le nom de biosurfactants (Vijayakumar *et al.*, 2015).

Les études sur les biosurfactants ont commencé dans les années 1960 et l'utilisation de ces composés a augmenté au cours des dernières décennies (Silva *et al.* , 2014 ; Cerqueira *et al.*, 2011). Les biosurfactants ont attiré l'intérêt de différentes industries en raison de leurs avantages comme la diversité structurale, une faible toxicité, une plus grande biodégradabilité, la capacité de fonctionner dans de vastes plage du pH, de la température et de la salinité ainsi qu'une plus grande sélectivité (Rosa *et al.*, 2015 ; Makkar *et al.*, 2011) . Les biosurfactants présentent également un taux élevé de propriétés anti-microbien, antitumorales et anti-inflammatoires (Velikonja *et al.*, 1993).

Les raisons pour lesquelles les biosurfactants sont considérés comme les matériaux multifonctionnels du XXI^e siècle, avec une description des concepts, des propriétés, de la classification, des modes de production, de la physiologie et des utilisations dans les industries les plus diversifiées.

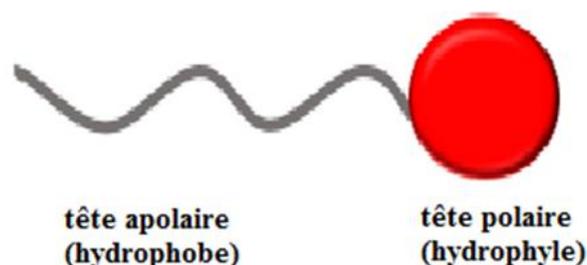


Figure 14 : Molécule de surfactant avec des groupements apolaires (hydrophobes) et polaires (hydrophiles) (Zihahirwa, 2017).

III.1.2.4.2. Microorganismes producteurs

Les micro-organismes utilisent un ensemble de sources de carbone et d'énergie pour la croissance. La combinaison des sources carbonées avec des substrats insolubles facilite la diffusion intracellulaire et la production. Les Microorganismes (levures, bactéries et certains

champignons filamenteux) sont capables de la production de biosurfactants ayant des structures moléculaires et des activités de surface différentes (Campos *et al.*, 2013).

Des décennies, il y a eu une augmentation de l'intérêt scientifique concernant l'isolement des micro-organismes qui produisent des molécules tensioactives.

La littérature décrit les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* comme de grands producteurs de biosurfactants (silva *et al.*, 2014). Toutefois, la plupart des biosurfactants d'origine bactérienne industrie en raison de leur nature pathogène possible (Shepherd *et al.*, 1995).

III.1.3. Les bactériocines

III.1.3.1. Généralités

La première découverte des bactériocines a été signalée il y a presque un siècle, lorsque Gratia (1925) a démontré l'inhibition de souches d'*Escherichia coli* S par une substance thermostable provenant d'une culture d'*E. Coli* V. Ces substances inhibitrices ont été appelées colicines en références à l'espèce productrice (Frederiq, 1946).

La définition d'une bactériocine a considérablement évolué au cours des années. Aujourd'hui, les bactériocines sont définies comme des petits peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique et produits par des bactéries qui sont immunisées contre leurs propres bactériocines (Cotter *et al.*, 2013).

L'effet est généralement bactéricide, mais un effet bactériostatique a été constaté (Tagg et Wannamaker, 1976; Klaenhammer, 1988).

Les bactériocines sont de nature cationique et sont généralement organisées en une ou plusieurs structures hélicoïdales amphiphiles (Rodriguez *et al.*, 2003; Heng *et al.*, 2007).

Leur nature protéique permet leur dégradation par les enzymes protéolytiques en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ce qui les rend sans danger pour la consommation humaine (Zacharof & Lovittb, 2012).

La famille des bactériocines est très diverse, deux grands groupes peuvent être différenciés. D'une part, les bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif. D'autre part, les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif.

Les bactériocines ne sont pas des antibiotiques, mais peuvent, en revanche, être une alternative viable aux antibiotiques (Cotter *et al.*, 2013).

La différence majeure entre les antibiotiques et les bactériocines est que ces dernières sont synthétisées par voie ribosomique et produites au cours de la phase primaire de la croissance alors que les antibiotiques sont, en majorité, des métabolites secondaires. En outre, les

bactériocines ont des spectres d'activités relativement étroits comparés à ceux constatés chez les antibiotiques (Margaret & John, 2002).

III.1.3.2. Classification des bactériocines

La classification de Klaenhammer (1993) reste la classification de base, la plus modifiée. Les bactériocines sont divisées en quatre classes principales:

La **classe I** comprenant les lantibiotiques.

La **classe II** comprenant les bactériocines thermostables non modifiées.

La **classe III** comprenant les bactériocines thermolabiles de grande taille.

La **classe IV** bactériocines plus complexes composées de protéines et portant une (ou plusieurs) composantes non-protéique, lipidique et/ou oligo-saccharidique (Klaenhammer, 1993; Ennahar *et al.*, 2000; McAuliffe *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007).

III.1.3.3. Mécanisme d'action des bactériocines

Les bactériocines agissent en général par le même mécanisme d'action, en perturbant le fonctionnement de la membrane cytoplasmique (Nes *et al.*, 2007).

La première étape est une interaction initiale de la bactériocine avec des récepteurs cellulaires spécifiques (reconnaissance d'une cible) ou non spécifiques (interactions électrostatiques ou hydrophobes) (Brogden, 2005).

par la suite s'adsorber sur la membrane cytoplasmique et la perméabiliser par formation de pores conduisant à la mort de la cellule cible (Ecker, 1992; Ennahar *et al.*, 2000; Peschel, 2002; Brogden, 2005).

L'action de la bactériocine se traduit, d'une part par l'augmentation de la perméabilité membranaire, provoquant un déséquilibre ionique et une fuite de phosphate inorganique et d'autre part par une perte de la Force Proton Motrice (FPM) qui implique la dissipation totale du potentiel transmembranaire et du gradient de pH (Nicholls & Ferguson, 1992; Montville & Chen, 1998; Ennahar *et al.*, 2000).

III.1.3.4. Applications et intérêts des bactériocines

III.1.3.4.1. Applications alimentaires

Plusieurs travaux ont permis de montrer l'efficacité des bactériocines ou de souches productrices de bactériocines dans différentes matrices alimentaires (tableaux 03 et 04).

Tableau03 : Les bactériocines utilisées dans le domaine alimentaire

Application	bactériocine	Classe	Effet
Dans les produits laitiers	Nisine	I	Prévenir la prolifération d'endospores de <i>Clostridium botulinum</i> et la contamination par <i>Listeria monocytogenes</i> dans le fromage
	Lacticine 3147	I	Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé
	Pediocine PA-1	Iia	<i>Inhibition de L. monocytogenes</i>
	Enterocine AS-4S	I Ic	empêché le développement de <i>L. monocytogenes</i> et inhibition lente de <i>staphylococcus aureus</i> dans le lait écrémé.
Dans les viandes et les volailles	Nisine	en combinaison avec des acides organiques lysozyme et chélateurs	Décontaminations des surfaces de préparation de viandes crues .

		sous forme de film, activée par de l'EDTA		Inhibitions des entérobactéries et des espèces appartenant à <i>Carynebacterium</i> dans des tranches de bœuf pendant la réfrigération
		En combinaison avec hautes pression hydrostatiques (HPH)		Inhibition d' <i>Escherichia coli</i> et des <i>staphylococcus sp.</i> dans le jambon cuit.
	Pédiocine			Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les viandes crues.
Dans les poissons	Nisine	Traité a la chaleur (65°C)		Inhibition totale de <i>Listeria innocua</i> dans le caviar desturgeon ou de saumon
		Immobilisée à des films plastiques		Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans le saumon fumé pendant la réfrigération

III.1.3.4.2.Applications médicales

La résistance aux antibiotiques ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens tels que les bactériocines (Tableau04).

Tableau 04 : Les principaux bactériocines utilisées dans le domaine médical.

La bactériocine	Espèce productrice	microorganismes sensibles	Le traitement	références
La mersacidine	<i>Bacillus</i> sp.HIL Y-85,54728	<i>Listeria</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	Traitements d'infections cutanées	Sass et al.,2008
Salivaricine A2 et B	<i>Streptococcus salivarius</i>	Bactéries responsables de la mauvaise haleine	Traitements de la gingivite	Tagg 2004
La subtilosine A	<i>B. subtilis</i>	<i>L.monocytogenes</i> <i>Gardnerella vaginalis</i>	Traitements des infections vaginales	Sutyak et al. 2008
La nisine A	<i>Staphylococcus</i> sp.et <i>streptococcus</i> sp.	<i>S.aureus</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i>	Traitements de la mastite	Cotter et al.2005

III.2. Les molécules antimicrobiennes produites par *B. thuringiensis*

En plus de synthétiser bon nombre de protéines insecticides, *B. thuringiensis* produit aussi d'autres métabolites tels des antibiotiques, antifongiques et des bactériocines.

III.2.1.L'antibiotique Zwittermicine A

La zwittermicine A est un antibiotique qui a été isolé pour la première fois à partir de *Bacillus cereus* UW85 pour son effet protecteur de la plante alfalfa (luzerne) et contre l'oomycète *Phytophthora medicaginis* (Auger, 2015). La zwittermicine A fût par la suite identifiée chez plusieurs *Bacillus* grâce à une nouvelle méthode d'identification qui consiste à établir si la souche inhibe la croissance d'*E. herbicola* et si la souche est sensible au phage P7. La découverte de ce nouvel antibiotique est importante pour la protection des plantes. puisqu'il est actif contre les oomycètes, les bactéries Gram négatives et un grand nombre de fungi pathogènes (Augar, 2015).

Bacillus thuringiensis est également un producteur de Zwittermicine A, un antibiotique aminopolyol linéaire de 396 Da produit au cours de la sporulation de *Bt*. Ce composé a

d'abord été isolé chez *B. cereus* pour sa capacité à supprimer la maladie de la fonte des semelles causée par *Phytophthora medicaginis*. La biosynthèse de la Zwittermicine A 14 ne provient pas dans le métabolisme des glucides, mais par une voie peptidique synthétase /polyketides synthèse non ribosomale (NRPS/PKS) impliquant deux unités de prolongation de la PKS de type 1 nouvellement décrites : la protéine de transport hydroxymaloni-acyle (ACP) et l'aminomalonyl-ACP. (Rogers et Molinski., 2007,2009).

III.2.1.1. Rôles dans le biocontrôle

Activité fongistatique plus importante encore, la Zwittermicine A obtenue à partir de *Bacillus cereus* peut augmenter l'activité insecticide de *B. thuringiensis subsp.kurstaki*, alors, elle ne montre aucune activité insecticide lors d'un essai contre la spongieuse (*Lymantria dispar*) (Brodericke et al., 2000,2003).

III.2.2. Les bactériocines de *B. thuringiensis*

Plusieurs bactériocines produites par des bactéries du groupe *Bacillus cereus* ont été étudiés et totalement ou partiellement caractérisées. Les bactériocines sont des peptides avec un masse moléculaire variant de près de 1 kDa (thuricine, 0,950 kDa) à 12,4 kDa (entomocine 9). En termes de poids moléculaire, nous proposons de diviser ces bactériocines, en groupes A et B. Le groupe A est composé des bactériocines d'un poids inférieur à 5 kDa et du groupe B qui pèsent plus de 5 kDa. Bien qu'à partir d'un point de vue, au sein du groupe A, on peut trouver deux types : peptide simple et peptide à deux composants (tableau 05).

Tableau05 : les bactériocines synthétisées par les souches *bacillus thuringiensis*

groupes	bactériocines	La masse moléculaire	La souche productrice (subsp).	Les références
AI	Thuricin	0.950	<i>thuringiensis HD2</i>	Favret and Younsten 1989
	Thuricin S	3.137	<i>entomocidus HD198</i>	Chehimi et al. 2007
			<i>entomocidus 9</i>	Chehimi et al. 2012
			<i>entomocidus HD110</i>	Chehimi et al. 2012
			<i>(tolworthy) HD125</i>	Chehimi et al. 2012
	Thuricin Bn1	3.139	<i>(kurstaki) Bn1</i>	Ugras et al. 2013
	Thurincin H	3.140	<i>SF361</i>	Lee et al. 2009
	Bacthuricin F4	3.160	<i>(kurstaki) BUPM4</i>	Kamoun et al. 2005
Thuricin 17	3.172	<i>Bt non</i>	Gray et al. 2006	
Entomocin 110	4.800	<i>Bradyrhizobium</i>	Cherif et al. 2008	

AII	Thuricin CD	Trn- α 2.760	<i>entomocidus HD110</i>	Rea et al. 2010
	Thuricin 439	Trn- β 2.860 (A) 2.919 (B) 2.803	<i>DPC 6431</i> <i>B439</i>	
BI	Morricin 269	~ 10.000	<i>morrisoni LBIT269</i>	Barboza-Corona et al. 2007
	Kurstacin 287	~ 10.000	<i>kurstaki LBIT287</i>	Barboza-Corona et al. 2007
	Kenyacin 404	~10.000	<i>kenyae LBIT404</i>	Barboza-Corona et al. 2007
	Entomocin 420	~10.000	<i>EntomocidusLBIT420</i>	Barboza-Corona et al. 2007
	Tolworthcin 524	~10.000	<i>tolworthi LBIT524</i>	Barboza-Corona et al. 2007
	Tochicin	10.500	<i>tochigiensis HD868</i>	Paik et al. 1997
	BacthuricinF103	~11.000	<i>BUMP103</i>	Kamoun et al. 2011
	Thuricin 7	11.600	<i>BMG1.7</i>	Cherif et al. 2001
	Entomocin 9	12.400	<i>entomocidus HD9</i>	Cherif et al. 2003

La plupart des bactériocines synthétisées par *B. thuringiensis* sont à large spectre, inhibant plusieurs espèces bactériennes. Les bactéries sensibles aux bactériocines produits par *Bt* sont présentées dans les tableaux 06 et 07.

III.2.2.1. les bactéries à Gram positif inhibées par les bactériocines de *Bacillus thuringiensis*

Tableau 06 : les bactériocines de *Bt* et leurs activités biologiques contre les bactéries à Gram positif.

Les bactériocines	Les bactéries Gram positive cibles	Les références
Thuricin	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> ,	Favret and Younsten 1989
	<i>S. aureus</i> , <i>E. epidermidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> .	
Thuricin S	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bt</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Pediococcus acidolacticis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .	Chehimi et al. 2007

Thuricin Bn1	<i>B. cereus, Lactococcus lactis, L. monocytogenes.</i>	Ugras et al. 2013
Thurincin H	<i>B. cereus, B. subtilis, B. megaterium, L. monocytogenes, L. innocua, L. ivanovii, S. aureus, Carnobacterim psicola, Geobacillus stearothermophilus.</i>	Lee et al. 2009
Bacthuricin F4	<i>B. cereus, B. subtilis, Bacillus licheniformis, S. aureus, Brevibacterium flavum</i>	Kamoun et al. 2005
Thuricin 17	<i>B. cereus</i>	Gray et al. 2006
Entomocin 110	<i>B. cereus, Bacillus coagulans, B. megaterium, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Lactococcus lactics, L. monocytogenes, Paenibacillus larvae, Paenibacillus polymyxa.</i>	Cherif et al. 2008
Tochicin	<i>B. cereus, Leuconostoc mesenteroides.</i>	Paik et al. 1997
Bacthuricin F103	<i>B. cereus, B. subtilis, B. licheniformis, L. monocytogenes.</i>	Kamoun et al. 2011
Thuricin 7	<i>B. cereus, B. subtilis, B. pseudomycoides B. mycoides, Staphylococcus pyogenes, L. monocytogenes, B. weihenstephanensis.</i>	Cherif et al. 2001
Entomocin 9	<i>B. cereus, B. pseudomycoides, B. mycoides, B. weihenstephanensis, Lactobacillus sp. Lactococcus lactics, L. monocytogenes.</i>	Cherif et al. 2003
Morricin 269 Kurstacin 287 Kenyacin 404 Entomocin 420 Tolworthcin 524	<i>B. cereus, B. weihenstephanensis, C. difficile, Listeria innocua, S. aureus, Staphylococcus, S. pyogenes, Enterococcus faecium.</i>	Barboza-Corona et al. 2007

Thuricin CD	<i>B. cereus</i> , <i>Bacillus firmus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>Clostridium lithuseburense</i> , <i>Clostridium indolis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Li. innocua</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>La. johnsonii</i> , <i>La. crispatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> .	Rea et al. 2010
Thuricin 439	<i>B. cereus</i> , <i>Li. innocua</i> 4202	Ahern et al. 2003

III.2.2.2. bactéries à Gram négatif inhibée par les bactériocines de *Bacillus thuriengiensis*

Le tableau 07 présente les bactéries Gram négatif inhibée par les bacteriocines de *Bacillus thuringiensis*

Tableau07 : les bactériocines de *Bt* et leurs activités biologique contre les bactéries à Gram négatif.

Les bactériocines	Les bactéries gram négatives cibles	Les références
Thuricin S	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomona srynigae</i> . <i>S. enterica ser. Cholerae</i> .	Chehimi et al. 2007
Thuricin Bn1	<i>Paucimonas lemoignei</i> , <i>Pseudomonas savastanoi</i> .	Ugras et al. 2013
Bacthuricin F4	<i>K. pneumoniae</i> .	Kamoun et al. 2005
Thuricin 17	<i>E. coli</i> MM294.	Gray et al. 2006
Entomocin 110	<i>P. aeruginosa</i> .	Cherif et al. 2008
Bacthuricin F103	<i>A. tumefaciens</i> .	Kamoun et al. 2011
Entomocin 9	<i>P. aeruginosa</i> .	Cherif et al. 2003
Morricin 269 Kurstacin 287 Kenyacin 404 Entomocin 420	<i>V. cholerae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> .	Barboza-Corona et al. 2007

Tolworthcin 524		
-----------------	--	--

III.2.2.3. Champignons inhibés par les bactériocines de *B. thuringiensis*

Les champignons peuvent également être ciblés par certaines bactériocines (tableau 08).

Tableau 08 : les bactériocines qui ont une activité antifongique.

Les bactériocines	Les champignons ciblent	Les références
Entomocin 9	<i>Aspergillus nidulans, Fusarium gramineis</i>	Cherif et al. 2003
Morricin 269	<i>Rizophus sp, Fusarium oxysporum,</i>	De la Fuente-Salcido et al. 2008
Kurstacin 287	<i>Mucor rouxii IM80, Trichoderma sp.</i>	
Kenyacin 404	<i>SH1, Trichoderma sp. SD3.</i>	
Entomocin 420		
Tolworthcin 524		

III.2.3. Les antifongiques de *Bt*

III.2. 3.1.les chitinases de *B. thuringiensis*

Les chitinases produites par *B. thuringiensis* peuvent jouer différents rôles qui contribuent à la survie de cette bactérie sous différentes conditions. Par exemple, ces enzymes peuvent être utilisées : pour assimiler la chitine et l'utiliser comme source unique de carbone ; agir comme un facteur de virulence qui favorise l'établissement d'une infection par *B. thuringiensis* ; et peut participer à la destruction de la cuticule facilitant ainsi la libération et la dissémination des toxines et des spores, et l'établissement de la bactérie dans d'autres niches écologiques (ex., sol, phylloplane) (Argola-Filho et Loguercio, 2014; Malovichko et coll., 2019).

Les chitinases sont utilisées Pour améliorer l'activité toxique contre les Insectes, champignons phytopathogènes et Nématodes.

Des études antérieures ont révélé que *B. thuringiensis* à une activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes en raison de la production d'enzymes lytiques, y compris les chitinases. Par conséquent, les chitinases sont également considérées comme des produits de lutte biologique.

Pour protéger les plantes, Le mode d'action de *B. thuringiensis* contre les champignons diffère selon les souches. Par exemple, les différents effets morphologiques sur les parois des cellules fongiques ont été notés, comme l'inhibition de croissance mycélienne et de

germination des spores, lyse des spores et les extrémités hyphales et l'allongement du tube germinal (Öztopuz *et al.*, 2018). Plus précisément, l'inhibition des champignons phytopathogènes utilisant des suspensions bactériennes, des surnageants, des préparations brutes concentrées contenant des chitinases et chitinases purifiées de *B. thuringiensis* ont été décrits. Il a également été rapporté qu'il n'y a pas de différence significative dans les activités antifongiques de *B. thuringiensis* entre l'extrait brut et la chitinase purifiée (Morales de la Vega *et al.*, 2006), bien que Melent'ev *et al.*, (2001) a montré que la chitinase purifiée était incapable d'inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* et *Helminthosporium sativum* par rapport à l'activité observée avec les extraits bruts. Les isolats de *B. thuringiensis* présentent un potentiel antifongique en double culture. Par exemple, Hollensteiner *et al.* (2017) a montré un antagonisme *in vitro* envers *Verticillium dahlia*, un agent pathogène ayant une vaste gamme d'hôtes, y compris les cultures économiquement importantes comme la tomate.

Les auteurs ont suggéré que l'effet inhibiteur sur la croissance des phytopathogènes a été attribué à la présence des chitinases dans la culture bactérienne. Des résultats similaires ont été obtenus avec préparations de surnageant contre *Aspergillus niger*, *A. foetidus*, et *A. ochraceus* (Driss *et al.*, 2005; Öztopuz *et al.*, 2018) dans laquelle l'effet antifongique a été attribué non seulement à la présence des chitinases mais aussi à un complexe d'enzymes hydrolytiques, y compris les protéases et les gluconases. Peu importe, les effets inhibiteurs contre les champignons ont été démontrés en utilisant les chitinases partiellement purifiées ou purifiées de *B. thuringiensis*, et ces enzymes spécifiques à l'espèce étaient plus efficaces que ceux produits par *B. licheniformis* contre les espèces de *Fusarium*, *Rhizopus* et *Trichoderma* (Morales de la Vega *et al.*, 2006; Gomaa, 2012; Mehmood *et al.*, 2015). Seo *et al.* (2012) ont signalé que la chitinase produite par *B. thuringiensis* GS1 inhibe la croissance de *Rhizoctonia solani* dans les plantes de concombre.

Enfin, il est également intéressant de noter que les chitinases peuvent induire des défenses végétales contre ces microbes pathogènes. Par exemple, lorsque des semis de riz ont été traités avec la chitinase purifiée immobilisée de *B. thuringiensis* H3, une augmentation de la synthèse des enzymes de défense, y compris peroxydase et phénylalanine ammoniac-lyase, a été observée (Tang *et coll.*, 2012).

Aussi l'étude de José E. Barboza Corona et ses collaborateurs (2004), a montré que les chitinases de *Bacillus thuringiensis* peut être envisagé pour la lutte biologique de *Sclerotium*

rolfsii dans le soja et a le potentiel pour la lutte biologique d'autres champignons phytopathogènes.

III.2.3.2. Les biosurfactants de *Bacillus thuringiensis*

R. Deepak, R. Jayapradha., (2014) ont étudié la propriété antifongique d'un biosurfactant de *Bacillus thuringiensis* contre le pathogène humains *F. oxysporum*. Dans cette étude, le biosurfactant (lipopeptide) de *Bacillus thuringiensis pak2310* a été produit, caractérisé et son innocuité a été évaluée comme un anti-biofilm et comme un agent thérapeutique non toxique. Il s'agit du premier rapport sur un biosurfactant lipopeptidique ayant un effet significatif sur le pathogène humain *Fusarium oxysporum* et son innocuité sur les lignées cellulaires épithéliales humaines, ces résultats pourraient ouvrir la voie au développement d'un lipopeptide comme médicament contre la fusariose.

III.2.3.2.1. Les fengycines

III.2.3.2.1.1. Définitions

Les fengycines sont des lipopeptides antifongiques à large spectre, elles sont particulièrement efficaces contre plusieurs espèces de champignons et agissent à des faibles concentrations. Ils sont antagonistes contre les champignons pathogènes de plusieurs cultures et ont été suggérés pour l'agriculture (Ongena et Jacques, 2008). Les fengycines ont également une cytotoxicité limitée, nécessitant jusqu'à 40 fois la concentration des surfactines pour provoquer une hémolyse comparable dans les globules rouges humains (Zihahirwa ., 2017).

Les fengycines ont été classées en deux classes, à savoir la fengycine A et la fengycine B.

La fengycine A contient de l'Ala à la position 6 qui est remplacée par Val dans le cas de la fengycine B (Zihahirwa K., 2017).

III.2.3.2.1.2. Rôles dans le biocontrôle

Le mode d'action complet des fengycines n'est pas connu, mais les études actuelles sur les interactions entre les fengycines avec les systèmes des modèles lipidiques suggèrent qu'ils fonctionnent à travers un mécanisme de perturbation et de la déstructuration membranaire (Deleu *et al.*, 2008).

Concernant l'antagonisme envers les mycètes, les fengycines, présentent une forte activité antifongique .particulièrement sur les champignons filamenteux (Deleu *et al.*, 2008).

En revanche, les fongycines ont une activité antibactérienne très limitée.

Cette famille moléculaire est donc principalement importante dans le cadre de l'antagonisme envers les mycètes. Cela pourrait partiellement s'expliquer par le fait qu'elles entrent en interaction avec eux dans certains de leurs processus physiologiques intracellulaires.

Une des conséquences notables est l'inhibition de la synthèse de toxines (Hu *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2014). L'action de ce LPc a été démontrée sur plusieurs espèces de champignons (Wang *et al.*, 2007).

III.2.4. Les δ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis*

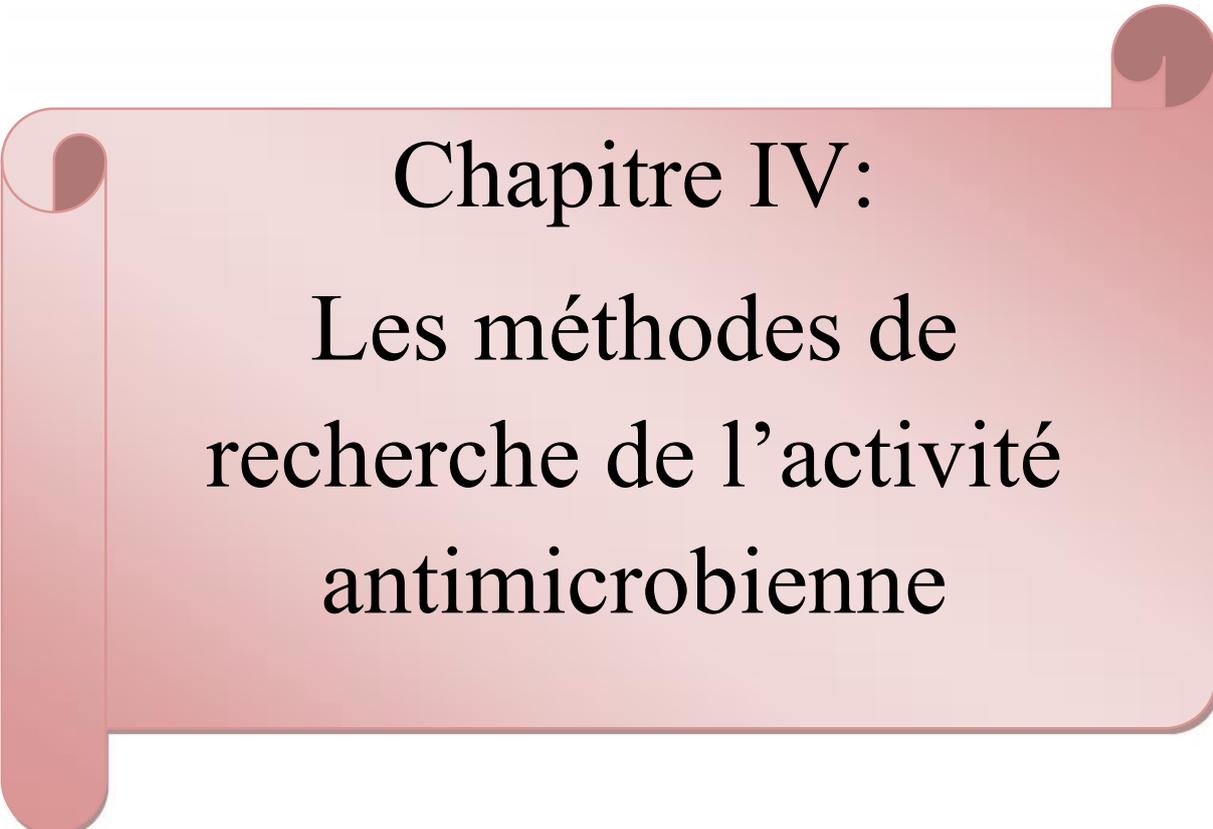
Quelques travaux (Yudina *et al.*, 2004 ; Yudina *et al.*, 2007 ; Cahan *et al.*, 2008 ; Knaak *et al.*, 2007) ont traité de l'effet antimicrobien des toxines Cry et Cyt.

L'effet antimicrobien des toxines Cry a été étudié seulement sur des bactéries anaérobies strictes (archaebactéries et clostridium) et des moisissures. L'effet antimicrobien des toxines Cyt de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* a été étudié sur *Escherichia coli* et *staphylococcus*. Les résultats sont représentés dans le tableau 06.

Tableau 09: effet antimicrobien des toxines Cry et Cyt.

Etude	Souches de <i>Bt</i>	Toxines Cry et Cyt	Microorganismes testés	Effet antimicrobien
(Yudina <i>et al.</i> , 2004)	<i>kurstaki</i>	Cry1Aa Cry1Ab CryAc, Cry2A et Cry 2B	<i>Methanobrevibacter</i> <i>Arboriphilus</i> , <i>methanosarcina</i> <i>barkeri</i>	Bactériostatique
	<i>amgiensis</i> <i>monterry</i> <i>israelensis</i>	Cry Cry11A	<i>Methanobrevibacter</i> <i>arboriphilus</i> et <i>Methanosarcina</i> <i>barkeri</i>	Bactériostatique
(Yudina <i>et al.</i> , 2007)	<i>kurstaki</i>	Cry1A	<i>Clostridium butyricum</i> et <i>Clostridium acetonobutylicum</i>	Bactériostatique
	<i>tenebrionis</i> <i>galleriae</i>	Cry3Aa Cry1D	<i>Clostridium butyricum</i> et <i>Clostridium acetonobutylicum</i> et <i>Methanosarcina barkeri</i>	Bactériostatique
(Cahan <i>et al.</i> , 2008)	<i>israelensis</i>	Cyt1Aa	<i>Escherichia coli</i>	Bactericide
			<i>Staphylococcus aureus</i>	bacteriostatique

(Knaak et al, 2007)	<i>thuringiensis</i> 407 <i>kurstaki</i> HD-73	Cry1Ab Cry1Ac	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pyricularia grisea</i> , <i>fusarium oxysporum</i> et <i>Fusarium solani</i>	Absence d'effet
---------------------	--	------------------	---	-----------------



Chapitre IV:
Les méthodes de
recherche de l'activité
antimicrobienne

IV. Les Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Diverses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne *In vitro* d'un extrait ou d'un composé criblé pur. Les méthodes les plus connues et de base sont la diffusion en disque et la dilution du bouillon ou de milieu gélosé. D'autres méthodes sont utilisées particulièrement pour les essais antifongiques, telle que la technique des aliments contaminés a fin d'approfondir l'étude de l'effet antimicrobien d'un agent, les méthodes de cytofluorométrie en flux et le test du temps mort sont recommandées, qui fournissent des informations sur la nature de l'effet inhibiteur (bactéricide ou bactériostatique) (dépendant du temps ou de la concentration) et les dommages cellulaires infligés au micro-organisme-test.

En raison de la nouvelle attirance pour les propriétés des nouveaux produits antimicrobiens comme la lutte contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques, Il est important de mieux comprendre les méthodes disponibles pour le criblage et/ou de quantification de l'effet antimicrobien d'un extrait ou d'un composé pur pour ses applications dans la santé humaine, l'agriculture et l'environnement.

IV.1. Méthodes de diffusion

IV.1.1.Méthode de diffusion en disques sur milieu gélosé

Cette technique a été développée en 1940 (Heatley *et al.*, 1944), c'est une méthode utilisée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de susceptibilité antimicrobienne de routine. Aujourd'hui, plusieurs normes approuvées sont publiées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour tester des bactéries et des levures (CLSI, 2012). Bien que toutes les bactéries fastidieuses ne peuvent pas être testées avec précision par cette méthode, la standardisation a été faite pour tester certaines bactéries pathogènes fastidieuses comme les streptocoques, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, en utilisant des milieux de culture spécifiques, diverses conditions d'incubation et critères d'interprétation pour les zones d'inhibition (CLSI, 2012).

Dans le cadre de cette procédure bien connue, le milieu gélosé est inoculé avec un inoculum normalisé du micro-organisme-test. Ensuite, les disques de papier filtre (environ 6mm de diamètre), contenant le composé à tester à la concentration désirée, sont placés sur la surface du milieu gélosé.

Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions appropriées. En général, l'agent

antimicrobien diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du microorganisme-test, puis les diamètres des zones d'inhibition de la croissance sont mesurés (figure.15). Le tableau 10 montre le milieu de croissance, la température, la période d'incubation et la taille de l'inoculum requise par les normes du CLSI.

L'antibiogramme fournit des résultats qualitatifs en catégorisant les bactéries comme susceptibles, intermédiaires ou résistante (Jorgensen *et al.*, 2009). par conséquent, il s'agit d'un outil de typage basé sur le phénotype de résistance de la souche microbienne testée. Ses résultats guident également les cliniciens dans la sélection appropriée des traitements empirique initiaux, et les antibiotiques utilisés pour certains patients dans des situations particulières (Caron., 2012). Toutefois, l'inhibition de la croissance bactérienne ne signifie pas la mort bactérienne, cette méthode ne peut pas distinguer les effets bactéricides de l'effet bactériostatiques.

De plus, la méthode de diffusion en disques n'est pas appropriée pour déterminer la concentration inhibitrice minimale (CMI), car il est impossible de quantifier la quantité de l'agent antimicrobien qui a diffusé dans le milieu gélose. Néanmoins, une CMI approximative peut être calculé pour certains microorganismes et antibiotiques par comparaison des zones d'inhibition avec des algorithmes (Nijs *et al.* , 2003).

Néanmoins, le test de diffusion en disque, offre de nombreux avantages par rapport à autres méthodes : la simplicité, un faible coût, la capacité de tester nombre énorme de microorganismes et d'agents antimicrobiens, ainsi que la facilité à interpréter les résultats fournis. De plus, plusieurs études ont démontré le grand intérêt pour les patients qui souffrent d'une infection bactérienne de l'antibiothérapie basée sur l'antibiogramme de l'agent causal (Kreger B.E., et al ., 1980). Ce fait est dû à la bonne corrélation entre les données *In vitro* et l'évolution *In vivo* (Caron., 2012).

Avant sa normalisation, la méthode de diffusion sur disque a déjà été utilisée pour tester le posaconazole contre les champignons filamenteux (Lopez-Oviedoet *et al.*, 2006) contre *Aspergillus* (Arikan *et al.*,2003) , et caspofungin contre *Aspergillus* et *Fusarium*(Arikan S et al.,2002). Actuellement, une approche normalisé de la Méthodes de diffusion en disque pour tester les antifongique est utilisées pour tester les champignons filamenteux non dermatophytes.

Le milieu de culture, la taille de l'inoculum et les conditions d'incubation sont mentionnés dans le tableau 10 (Espinel-Ingroff *et al.*, 2011).

Les avantages mentionnés ci-dessus de cette méthode, sont principalement la simplicité et le faible coût, ont contribué à son utilisation commune pour le criblage d'extraits antimicrobien de plantes, d'huiles essentielles et d'autres médicaments (Fourati-BenFguira *et al.*, 2005 ; Konaté *et al.*,2012 ; DeBillerbeck ,2007 ; Das *et al.*,2010).

IV.1.2. Méthode du gradient antimicrobien (Etest)

La méthode de gradient antimicrobien combine le principe des méthodes de dilution avec celles des méthodes de diffusion afin de déterminer la valeur CMI. Elle repose sur la possibilité de créer un gradient de concentration de l'agent antimicrobien testé dans un milieu gélosé. Les Etests (BioMérieux) est une version de cette technique. Dans cette procédure, une bandelette imprégné d'un gradient de concentration croissante de l'agent antimicrobien d'une extrémité à l'autre est déposée sur la surface du milieu gélosé, inoculé avec le micro organisme test. Cette méthode est utilisée pour la détermination des CMI des antibiotiques, antifongiques et antimycobactéries (Hausdorfer *et al.*,1998).

La valeur de la CMI est déterminée, à l'intersection de la bande et de l'ellipse d'inhibition de la croissance. Elle est simple à mettre en œuvre ; Par conséquent, elle est couramment utilisée pour répondre aux demandes des cliniciens. Cependant, les bandelettes Etests coûtent cher (environ 2 à 3 \$ chacune), et la méthode devient très couteuse si on test plusieurs composés.

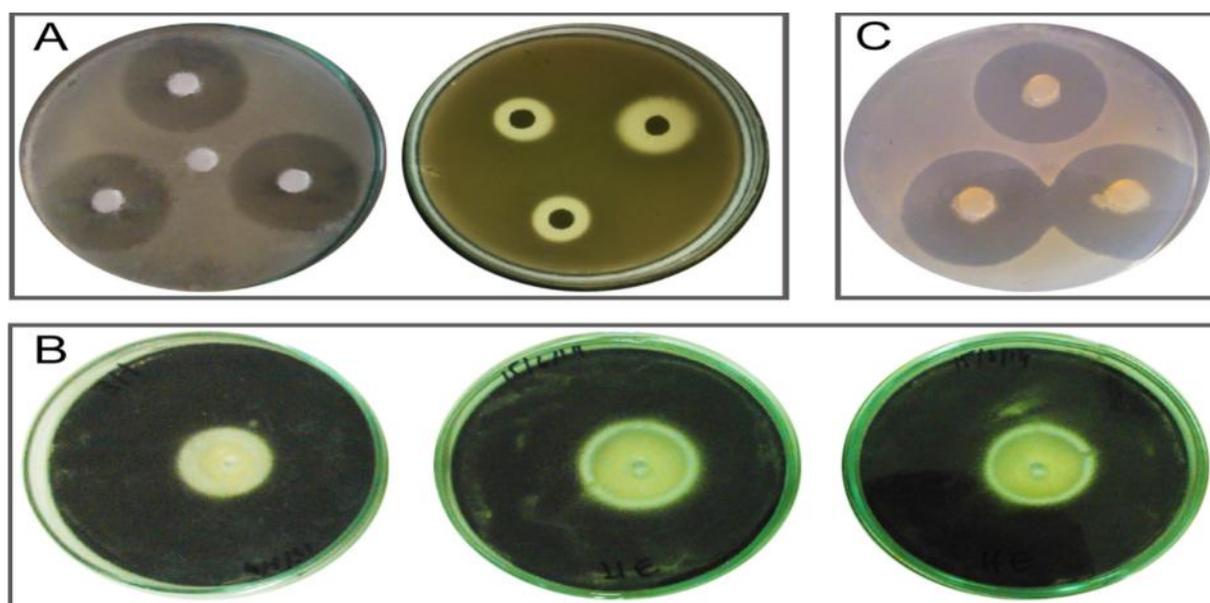


Figure 15 : Méthodes de diffusion sur milieu gélose (CLSI, 2012) :

(A)méthode de diffusion sur disque de l'extrait microbien utilisant *C. albicans* comme micro-organisme-test, (B)méthode de diffusion sur milieu gélose de l'huile essentielle utilisant *Aspergillus niger* comme microorganisme-test, et (C) méthode de diffusion de *Bacillus sp.* contre *C. albicans*.

Cette technique peut également être effectuée pour étudier l'interaction antimicrobienne entre deux composés (White *et al.*, 1996). Pour Étudier l'effet combiné de deux antibiotiques, une bande Etest, imprégnée d'un premier antibiotique, est placée sur une surface de milieu gélosé pré-inoculée. Après une heure, la bande est retirée et remplacée par une autre imprégnée d'un deuxième antibiotique. La synergie est détectée par une diminution de la CMI de la combinaison d'au moins deux dilutions comparée à celle de l'antibiotique le plus actif testé seul (É. Denes *et al.*, 2009).

Tableau 10 : Milieux de culture, taille de l'inoculum microbien et conditions d'incubation pour les méthodes de test de sensibilité antimicrobienne recommandées par le CLSI (CLSI, 2012).

Méthodes	les micro organismes	Les milieux de cultures	Taille final D'inoculum	T (°C) D'incubation	La durée d'incubation (h)
Diffusion de disques	Les bactéries	GMH	(0.5McFarland)(1-2)x 10 ⁸ UFC/ml	35	16-18
	Les levures	GMH+BMGa	(0.5 McFarland)(1-5)x 10 ⁶ UFC/MI	35	20-24
	Les moisissures	Pas de supplément au GMH	(0.4-5)x 10 ⁶ UFC/mL	-	-
Microdilution	Les bactéries	BMH	5x 10 ⁵ xUFC/ml	35	20
	Les levures	RPMI1640b]	(0.5-2.5)x10 ³ UFC/mL	35	24-48
	Les moisissures	RPMI1640b	(0.4-5)x10 ⁴ UFC/mL	35	48
Macrodilution	Les bactéries	BMH	5x10 ⁵ UFC/MI	35	20
	Les levures	RPMI1640b	(0.5-2.5)x10 ³ UFC/mL	35	46-50
	Les moisissures	RPMI1640b	(0.4-5)x 10 ⁴ UFC/mL	35	48
Diffusion sur gélose	Les bactéries	GMH	104 UFC/spot	35	16-20
Test de temps mort	Les bactéries	BMH	5x10 ⁵ UFC/mL	35	0,4, 18 et 24.

GMH: Gélose Mueller Hinton . BMH: Bouillon Mueller Hinton.

a GMB: molieu suplementé avec 2% de glucose et 0.5mg/MI blue d méthylène.

b RPMI 1640: milieu avec glutamine, sans bicarbonate, et avec rouge de phénol comme indicateur de pH)

IV.1.3. Autres méthodes de diffusion

D'autres méthodes de diffusion sont utilisées dans les laboratoires de recherche en microbiologie pour tester les extraits, les fractions ou les substances pures pour leur pouvoir antimicrobien ou pour étudier l'antagonisme entre les micro-organismes. Parmi ces méthodes, les plus courantes sont énumérées ci-dessous.

IV.1.3.1. Méthodes de diffusion des puits d'agar

La méthode de diffusion des puits d'agar est largement utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des plantes ou des extraits microbiens (Bassol *et al.*, 2004; Magaldi *et al.*, 2012).

Tout comme la procédure utilisée dans la méthode de diffusion en disque, la surface est inoculée par étalement de l'inoculum microbien sur toute la surface de l'agar.

Puis, un trou ayant un diamètre de 6 à 8 mm est creusé aseptiquement avec un emporte-pièce stérile et un volume (20 à 100 µL) de l'agent antimicrobien ou de la solution d'extrait à la concentration désirée est introduit dans le puits. Ensuite, les boîtes sont incubées dans des conditions favorables au micro-organisme-test.

L'agent antimicrobien se diffuse dans le milieu gélosé et inhibe la croissance de la souche microbienne-teste (figure.15 B).

IV.1.3.2. Méthode de diffusion des bouchons d'agar

La méthode de diffusion par bouchon d'agar est souvent utilisée pour mettre en évidence l'antagonisme entre les micro-organismes (Jiménez-Esquilín *et al.*, 2005 ; Elleuch *et al.*, 2010), cette procédure est similaire à celle utilisée dans la méthode de diffusion sur disque. Il s'agit de faire une culture solide de la souche d'intérêt sur son milieu de culture approprié par des stries serrées en surface.

Pendant la croissance, les cellules microbiennes sécrètent des molécules qui diffusent dans le milieu gélosé. Après incubation, un cylindre de ce milieu gélosé est coupé aseptiquement avec un emporte-pièce stérile et déposé sur la surface d'un autre milieu préalablement inoculée par le micro-organisme-test. Les substances diffusent du bouchon au milieu gélosé.

Puis, l'activité antimicrobienne des molécules microbiennes sécrétées par le microorganisme est détectée par l'apparition de la zone d'inhibition autour du bouchon de l'agar (figure.15C)

IV.1.3.3. Méthode des stries croisées

La méthode des stries croisées est utilisée pour cribler rapidement l'antagonisme chez les microorganismes (Lertcanawanichakul *et al.*, 2008). La souche microbienne d'intérêt est ensemencée par une seule strie au centre du milieu gélosé. Après une période d'incubation en fonction de la souche microbienne, le milieu est ensemencé avec le micro-organisme à tester par une seule strie perpendiculaire à la strie centrale. Les interactions antimicrobiennes sont analysées en mesurant la taille de la zone d'inhibition.

IV.1.3.4. Méthode de contamination des aliments

La méthode des aliments contaminés est principalement utilisée pour évaluer l'activité antifongique contre les moisissures (Kumar *et al.*, 2013). L'agent antifongique ou l'extrait est incorporés dans la gélose fondue à une concentration finale adéquate et bien mélangé.

Ensuite, le milieu est versé dans des boîtes de Pétri.

Après une pré-incubation d'une nuit, l'inoculation peut être effectuée par un disque de mycélium de 2 à 5 mm, qui est déposé au centre de la boîte. Après incubation supplémentaire dans des conditions appropriées pour la souche fongique testée, les diamètres de la croissance fongique dans les boîtes témoins et d'échantillon sont mesurés, l'effet est estimé au moyen de la formule suivante :

$$\text{Activité antifongique(\%)} = \frac{D_c - D_s}{D_c} \times 100$$

Où D_c : diamètre de croissance sur la boîte témoin.

D_s : diamètre de croissance sur la boîte contenant l'agent antifongique test.

IV.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) – bioautographie

En 1946, Goodall et Levi (Goodall *et al.*, 1946) combinaient la méthode chromatographie de (PC) avec contact bioautographie pour détecter différents pénicillines. Par la suite, Fischer et Lautner (Fischer *et al.*, 1961), introduit la CCM dans le même domaine. Cette technique combine la CCM avec des méthodes de détection biologique et chimique. Plusieurs travaux ont été effectués sur le criblage des extraits organiques, extraits de plantes, pour l'activité antibactérienne et antifongique par CCM-bioautographie (Horváth *et al.*, 2010 ; Mehrabani *et al.*, 2013).

Comme indiqué ci-dessous, les techniques bioautographiques: diffusion de l'agar, la bioautographie directe et agar overlay assay, ont été décrits pour l'investigation des composés antimicrobiens par cette approche.

IV.2.1. Diffusion de l'agar (agar-diffusion)

Aussi connu sous le nom de méthode de contact avec l'agar. C'est la méthode la moins utilisée. Il s'agit du transfert par diffusion de l'agent antimicrobien du chromatogramme (PCouCCM) à une gélose en boîte préalablement inoculée avec le micro-organisme-test. Après quelques minutes ou heures pour permettre la diffusion, le chromatogramme est enlevé et la boîte d'agar est incubée. Les zones d'inhibition de la croissance apparaissent où les, où les composés antimicrobiens étaient au contact avec la couche d'agar (Marston., 2011).

IV.2.2. Bioautographie directe

La bioautographie directe est la méthode la plus appliquée parmi les trois méthodes. La plaque de CCM développée est immergée ou pulvérisée avec une suspension microbienne. Ensuite, le bioautogramme est incubé à 25 °C pour 48h sous condition humide (Dewanjeet *et al.*, 2015). Pour la visualisation de la croissance microbienne, les sels de tétrazolium sont fréquemment utilisés. Ces sels sous une conversion en formazan de couleur intense correspondant par les déshydrogénases de cellules vivantes (Choma *et al.*, 2011 ; Grzelak *et al.*, 2011). p-Iodoni-trotetrazolium violet est l'agent de détection le plus approprié (Dewanjeet *et al.*, 2015 ; Marston, 2011). Ces sels sont pulvérisés sur le bioautogramme, réincubés à 25 °C pendant 24 h (Silv *et al.*, 2005) ou à 37 °C pendant 3 à 4 h (Runyoro *et al.*, 2006).

Le bouillon Mueller Hinton supplémenté d'agar a été recommandé pour donner un milieu suffisamment fluide pour permettre une meilleure adhérence à la plaque CCM et maintenir une humidité appropriée pour la croissance bactérienne (Shahat *et al.*, 2008).

La bioautographie directe peut être utilisée avec des champignons ou des bactéries. C'est la technique la plus facile pour la détection des substances antifongiques et donne des résultats cohérents pour les bactéries sporulées, les champignons comme *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium* (Suleiman *et al.*, 2010). Les souches de, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont fréquemment utilisées pour identifier les composés antibactériens (Horváth *et al.*, 2010).

IV.2.3. Essai biologique par recouvrement de gélose

Également connu sous le nom d'immersion bioautographique, c'est un hybride des deux

méthodes précédentes. La plaque CCM est recouverte d'un milieu gélosé semi-solide ensemencé Afin de permettre une bonne diffusion du composé testée dans le milieu gélosé, les plaques peuvent être placées à faible température pendant quelques heures avant l'incubation. Après l'incubation dans des conditions appropriées en fonction du micro organisme-test, une coloration peut être faite avec le colorant tétrazolium. Comme la bioautographie directe, cette méthode peut être appliquée à tous les micro-organismes tels que *Candida albicans*(Balouiri *et al.*, 2015) et les moisissures(Mehrabani *et al.*, 2013. Elle permet l'obtention de zones d'inhibition de la croissance bien définies et elle n'est pas sensible à la contamination (Marston *et al.*, 2011).

Dans l'ensemble, la bioautographie CCM est une méthode simple, efficace et pas coûteuse pour la séparation d'un mélange complexe, en même temps, elle localise les constituants actifs sur la plaque CCM. Elle peut donc être réalisée à la fois dans des laboratoires sophistiqués ainsi que dans de petits laboratoires qui n'ont accès qu'à un minimum d'équipements (Marston *et al.*, 2011) . Bien qu'ayant développé la technique couplée à l'HPLC (chromatographie liquide à haut performance), qui devient de plus en plus populaire comme méthode de choix pour purification finale des fractions d'extraits afin d'obtenir des composés purs, la CCM–bioautographie offre une technique rapide pour le criblage d'un grand nombre d'échantillons pour la bioactivité et dans le fractionnement guidé par la bioactivité (Dewanjee S. *et al.*, 2015). Il peut être utilisé pour la détection des antimicrobiens dans les échantillons d'environnement et d'aliments ainsi que pour la recherche de nouveaux médicaments antimicrobiens.

IV.3. Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs CMI, car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (agar dilution) ou le bouillon (macrodilution ou microdilution). Une méthode de dilution du bouillon ou de l'agar peut être utilisée pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *In vitro* de bactéries et champignons. La valeur CMI enregistrée est définie comme la plus faible concentration de l'agent antimicrobien testé qui inhibe la croissance visible du micro-organisme test, et elle est habituellement exprimée en mg/mL ou mg/L.

Il existe de nombreuses lignes directrices approuvées pour des tests de sensibilité antimicrobienne par dilution des bactéries non exigeants ou fastidieuses, des levures et des champignons filamenteux. Les normes les plus reconnues sont fournies par le CLSI et le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST).comme

recommandé, ces lignes directrices fournissent une procédure uniforme pour les essais pratique à réaliser dans la plupart des laboratoires de microbiologie clinique. L'élaboration de telles normes méthodologiques ne peut pas garantir la pertinence clinique de ces tests. Néanmoins, elle permet d'effectuer l'essai biologique selon une approche normalisée afin d'évaluer la pertinence clinique des résultats (Pfaller *et al.*, 2004).

IV.3.1. Méthode de dilution du bouillon

La micro-dilution ou macro-dilution du bouillon est l'un des méthodes d'essai de sensibilité antimicrobienne. La procédure implique la préparation de deux dilutions de l'agent antimicrobien (p. ex., 1,2,4, 8, 16 et 32 mg/mL) dans un milieu de croissance liquide distribué dans des tubes contenant un volume minimal de 2mL (macrodilution) ou de plus petits volumes utilisant une plaque de microtitrage à 96 puits (microdilution) (Figure. 16). Ensuite, chaque tube ou puits est inoculé avec un inoculum préparé dans le même milieu après dilution de la suspension microbienne normalisée ajustée à 0,5 de l'échelle Mc Farland(Figure. 17). Après avoir mélange ; les tubes inoculés ou les plaques de microtitrage sont incubées (la plupart du temps sans agitation) dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme-test (Tableau10). La méthodologie expérimentale pour la microdilution est schématisée à la figure. 18.

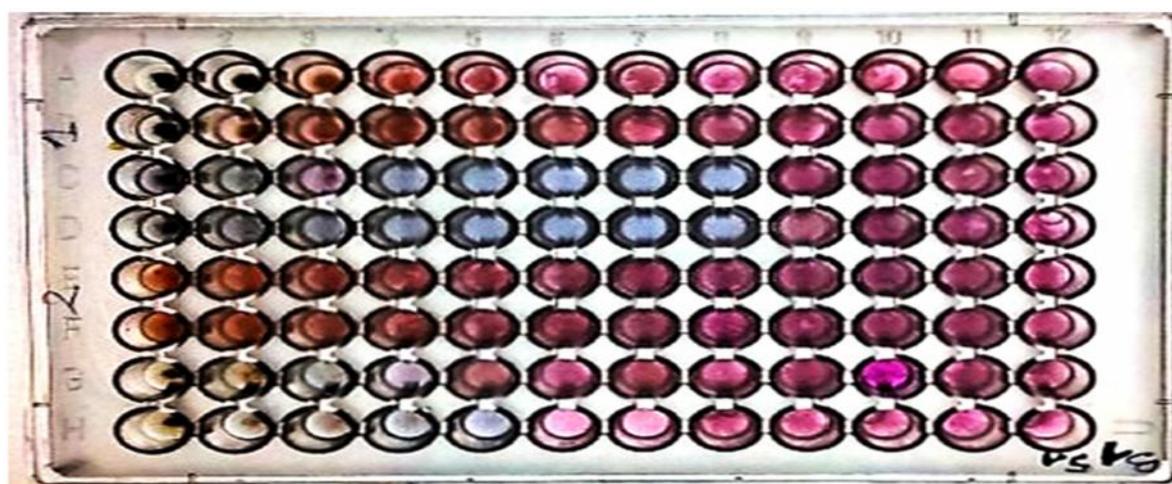


Figure 16 : Méthode de microdilution en bouillon d'extrait de plante contre *B. subtilis* en utilisant la résazurine comme indicateur de croissance (CLSI,2012).

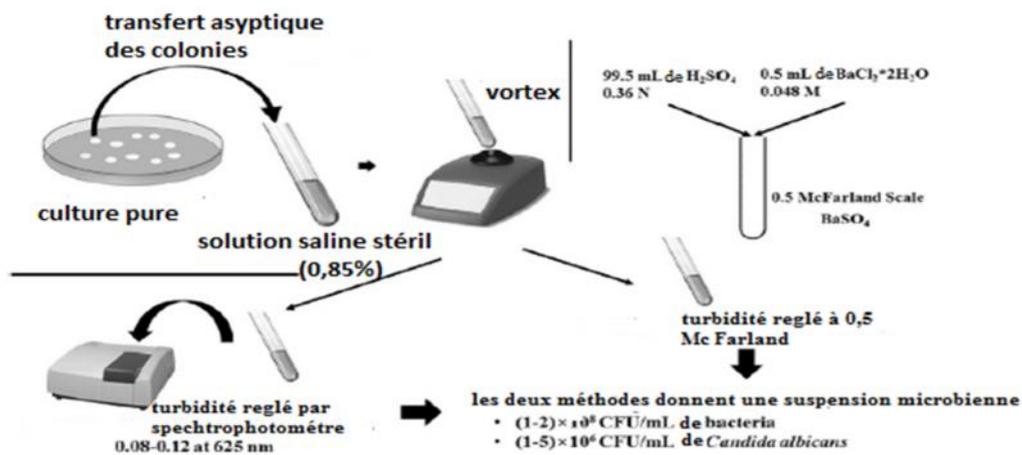


Figure 17 : Préparation de l'inoculum microbien par suspension directe de colonies comme recommandé par les directives du CLSI (CLSI, 2012).

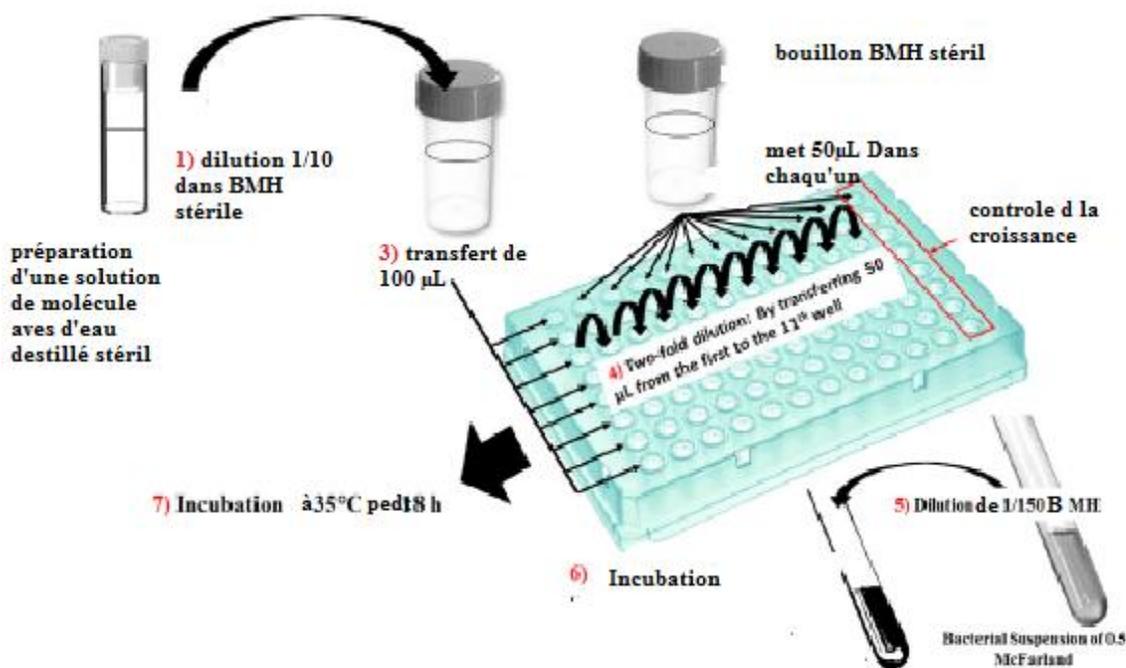


Figure 18 : Microdilution en bouillon pour les tests antibactériens comme recommandé par le protocole CLSI (CLSI, 2012).

La CMI est la plus faible concentration d'agent antimicrobienne qui inhibe complètement la croissance de l'organisme dans les tubes ou puits de dilution détectés par l'œil nu (CLSI, 2012). Contrairement à la méthode de microdilution, les principaux inconvénients de la méthode de macrodilution sont l'ardeur de la préparation de solutions antimicrobiennes

pour chaque essai, une quantité comparativement importante de réactifs et de l'espace requis (Jorgensen *et al.*, 2009).

Ainsi, la reproductibilité et l'économie des réactifs et de l'espace qui se produit en raison de la miniaturisation de l'essai sont les principaux avantages de la méthode de microdilution.

Néanmoins, le résultat est fortement influencé par cette approche, qui doit être soigneusement contrôlé si les résultats ne sont pas reproductibles (CLSI, 2012).

Il est bien connu que la taille de l'inoculum (Gehrt *et al.*, 2016) le type de croissance (Meletiadis *et al.*, 2001), temps d'incubation et préparation de l'inoculum peut influencer les valeurs de MIC (Gomez-Lopez A. *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003). Par conséquent, la dilution du bouillon a été normalisé par le CLSI pour tester les bactéries aérobies (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003), les levures (CLSI, 2002) et les champignons filamenteux (CLSI, 2008). La méthode de dilution du bouillon de l'EUCAST est principalement similaire à celle du CLSI avec des modifications concernant habituellement certains paramètres de test tels que la préparation de l'inoculum, la taille de l'inoculum, et la lecture de la CMI qui est visuelle dans le test CLSI et la méthode spectrophotométrique dans le guide de l'EUCAST (Arikan, 2007).

En ce qui concerne les champignons formant conidies et spores, la microdilution standardisée par CLSI permet d'obtenir un inoculum de spores ajusté spectrophotométriquement à $0,4 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^4$ UFC/mL.

Toutefois, dans le test EUCAST, l'inoculum peut être ajusté à $(2-5) \cdot 10^5$ UFC/mL par comptage hémostométrique (Lass-Flörl *et al.*, 2006). Nombreuses études ont montré l'importance de la préparation d'inoculum par comptage hémostométrique pour une préparation reproductible et appropriée indépendamment de la couleur et la taille des conidies (Petrikkou *et al.*, 2001 ; Aberkane *et al.*, 2002). La Détermination de la concentration bactéricide minimale (CBM) ou concentration fongicide minimale (CFM), connue aussi par la concentration létale minimale (CML), est la méthode la plus courante pour l'estimation de l'activité bactéricide ou fongicide. La CBM est défini comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour tuer 99,9% de l'inoculum final après incubation pendant 24h sous un ensemble de conditions normalisées, dans lequel le CBM peut être déterminé après une macrodilution du bouillon ou microdilution par sous-culture d'un échantillon provenant de puits ou de tubes, produisant une croissance microbienne négative après incubation à la surface de boîte de milieu gélosé non sélectives afin de déterminer le nombre de cellules survivantes (UFC/mL) après 24h d'incubation. Le paramètre bactéricide

(CBM) a été subjectivement défini comme étant la plus faible concentration, à laquelle 99,9 % de l'inoculum final est tué (CLSI, 1998). CFM est également défini comme la plus faible concentration du médicament qui donne un Effet létal de 98 à 99,9 % par rapport à l'inoculum initial (Arikan, 2007).

Plusieurs études ont été réalisées pour l'évaluation des paramètres du test pour la détermination de la CFM de diverses drogues contre *Candida isolé* (Cantón *et al.*, 2003), *Aspergillus* (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002) et autres (Espinel-Ingroff, V. Chaturvedi *et al.*, 2002).

IV.3.2. Méthode de dilution de l'agar

La méthode de dilution de la gélose comporte l'incorporation de concentrations désirées de l'agent antimicrobien dans milieu gélosé fondue, habituellement utilisé en série de dilutions de deux, suivies de l'inoculation de l'inoculum microbien adéquat sur la surface de la boîte du milieu gélosé. Le paramètre MIC est enregistré comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe la croissance sous des conditions d'incubation appropriées (tableau 10).

Cette technique convient aux tests de sensibilité antibactérienne et antifongique si plusieurs isolats sont testés sur un seul composé, ou si le composé (ou l'extrait) testé masque la détection de la croissance microbienne dans le milieu liquide avec sa coloration, la méthode de dilution de gélose est souvent préférée à la dilution de bouillon pour la détermination de la CMI. Les répliqueurs d'inoculum produits commercialement sont disponibles et peuvent transférer entre 32 et 60 inocula bactériens différents sur chaque boîte. La dilution d'agar est souvent recommandée comme méthode normalisée pour les organismes fastidieux (CLSI, 2010) tels que les espèces anaérobies et *Helicobacter*. Il a également été utilisé pour les combinaisons agent antifongiques médicaments contre *Candida sp.*, *Aspergillus*, *Fusarium* et les dermatophytes (Menon *et al.*, 2001 ; Imhof *et al.*, 2003).

Cette méthode présente une bonne corrélation avec Etest principalement pour les tests antibactériens contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

IV.4. Test temps-mort (courbe temps-mort)

Le test temps-mort est la méthode la plus appropriée pour déterminer l'effet bactéricide ou fongicide. C'est un outil puissant pour obtenir l'interaction dynamique entre l'agent antimicrobien et la souche microbienne. Le test temps-mort révèle que l'effet antimicrobien est temps-dépendant ou concentration-dépendant (Pfaller *et al.*, 2004).

Pour les bactéries, ce test a été bien standardisé et décrit dans CLSI (CLSI, 1998). Il est réalisé en culture liquide utilisant trois tubes contenant une suspension bactérienne de 5×10^5 UFC/mL. Le premier et le deuxième tube contiennent la molécule ou l'extrait testé habituellement aux concentrations finales de 0,25 MIC et 1 MIC, et le troisième est considéré comme le contrôle de la croissance. L'incubation se fait dans des conditions appropriées pour des intervalles de temps variés (0, 4, 6, 8, 10, 12 et 24h) (CLSI,1998). Ensuite, le pourcentage de cellules mortes est calculé relativement à la croissance du témoin en déterminant le nombre de cellules vivantes (UFC/mL) de chaque tube en utilisant la méthode de comptage sur gélose. Généralement, l'effet bactéricide est obtenu avec un pourcentage de létalité de 90 % pour 6h, ce qui est équivalent à 99,9 % de létalité par 24 h. En plus, cette méthode peut être utilisée pour déterminer le synergisme ou l'antagonisme entre les composés (un ou plusieurs) en combinaison. De même, plusieurs substances antifongiques ont été étudiées par cette méthode.

IV.5. Test de bioluminescence de l'ATP

le test de bioluminescence de l'ATP est fondé sur la capacité de mesurer de d'adénosine triphosphate (ATP) produit par des bactéries ou des champignons. Comme L'ATP est la forme chimique de l'énergie de toutes les cellules vivantes, elle est présente en quantité (+ou -) constante dans une cellule. Par conséquent, sa quantification est utilisée pour estimer la population microbienne d'un échantillon. D-luciférine en présence de l'ATP est convertie par luciférase à oxyluciferin ce qui génère de la lumière. La quantité de la la lumière émise est mesurée par un luminomètre et exprimée comme suit : unité de lumière relative (RLU) qui peut être convertie en RLU/mole de ATP. Ainsi, il existe une relation linéaire entre la viabilité des cellules et la luminescence mesurée (Bozorg *et al.*, 2015).

Le dosage de bioluminescence a une large gamme d'applications, telles que le test de cytotoxicité , l'évaluation de l'impact des biofilms *In situ*(Bozorg *et al.*, 2015), et le criblage de drogues sur *Leishmania*(Paloque *et al.*, 2013) . De plus, il a été utilisé par plusieurs auteurs pour des tests antibactériens (Finger *et al.*, 2013), essai antimycobactérien (Andreu *et al.*,2012), antifongique contre les levures (Finger *et al.*, 2012) et les moisissures (Galiger *et al.*, 2013). La rapidité est le principal avantage de cette technique qui fournit des résultats quantitatifs. En effet, il a été démontré que cette technique peut fournir des résultats en 3 à 5 jours pour tests antimycobactériens (Andreu *et al.*, 2012) en comparaison avec la technique de dilution conventionnelle, qui nécessite de 3 à 4 semaines d'incubation(Andreu *et al.*,2012).

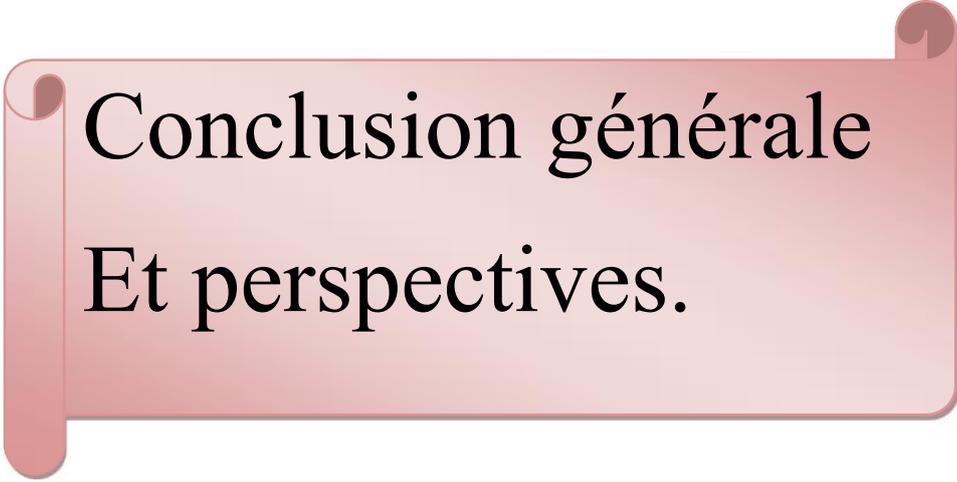
Le dosage de bioluminescence a aussi l'avantage d'être utilisé pour les tests antimicrobiens *in vivo* ou *in situ* (Vojtek *et al.*, 2014).

IV.6.Méthode cytofluorométrique de flux

Il y a plusieurs années, l'utilité de la cytométrie de flux pour les tests de susceptibilité des micro-organismes a été suggérée. Ainsi, de nombreux auteurs ont étudié les activités antibactériennes et antifongiques, de nombreuses drogues utilisant cette méthodologie (Paparella *et al.*, 2008 ; Ramani *et al.*, 2000). La détection rapide des cellules endommagées par cette approche dépend de l'utilisation de colorants appropriés (Ramani *et al.*, 2000). Par conséquent, l'iodure de propidium (PI), est un agent fluorescent et intercalant, qui est largement utilisé comme colorant d'ADN (Ramani *et al.*, 2000). Plusieurs études ont été publiées sur l'efficacité du cytomètre comme un outil pour les tests antibactériens d'huiles essentielles contre *Listeria monocytogenes*, en utilisant une coloration combinée avec PI pour l'évaluation des dommages à la membrane et fluorescence de carboxy dans le diacétate (cFDA) pour la détection de l'activité de l'estérase (Paparella *et al.*, 2008). Par conséquent, en plus des cellules lysées, trois sous-populations (cellules mortes, cellules viables et cellules endommagées) peut être clairement discriminé par cette méthode. Les cellules endommagées sont décrites comme des cellules stressées présentant des dommages au niveau des composants cellulaires et par conséquent diminution de la croissance et de la reproduction (Yousef *et al.*, 2003).

La quantification des cellules blessées présente un intérêt en microbiologie alimentaire, car cette sous-population pourrait être critique si la récupération des cellules devient possible, à cause du changement des conditions telles que la température pendant la conservation des aliments. En effet, la méthode cytofluorométrique en flux permet de détecter la résistance antimicrobienne et d'estimer l'impact de la molécule testée sur la viabilité et les dommages cellulaires du micro-organisme testé (Tang *et al.*, 2013).

En outre, il donne des résultats reproductibles rapidement (2-6 h par rapport à 24-72h pour la méthode de microdilution) (Ramani *et al.*, 2000). Cependant, l'utilisation généralisée de cette méthodologie pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens, semblent actuellement peu probables en raison de l'inaccessibilité de l'équipement de cytométrie de flux requis dans divers laboratoires.



Conclusion générale
Et perspectives.

Bacillus thuringiensis est connue depuis environ 70 ans comme étant une bactérie entomopathogène et est utilisée comme bioinsecticide contre plusieurs ordres d'insectes nuisibles. Ceci est dû à sa capacité à produire des inclusions cristallines au cours de sa sporulation qui renferment les protéines Cry et Cyt, ainsi que la sécrétion d'une panoplie de toxines (VIP, SIP, etc.) au cours de la croissance végétative.

B. thuringiensis a fait l'objet de plusieurs études exhaustives en raison de son potentiel biotechnologique dans le domaine de la lutte biologique. Cependant, seulement depuis moins de 20 ans, les recherches se sont orientées vers l'investigation de molécules antimicrobiennes de *B.thuringiensis*.

Dans cette revue bibliographique nous avons présenté les molécules antimicrobiennes à savoir les antibiotiques, les antifongiques, les bactériocines, les chitinases et les biosurfactants.

Notre recherche bibliographique a permis de montrer une énorme diversité des molécules antimicrobiennes produites par *bacillus thuringiensis*.

Nous avons relaté toutes les données existantes sur ces différentes molécules antimicrobiennes qui comprennent :

L'antibiotique : Zwittermicine A qui est produit par *B.thuringiensis* durant la sporulation.

Les bactériocines : Tochicin, Thuricin, Thuricin 7, Thuricin 439, Entomocin 9, Bacthuricin F4, Thuricin 17, Entomocin 110, Morricin 269, Kurstacin 287, Kenyacin 404, Entomocin 420, Tolworthicin 524, Thurincin H, Thuricin CD, BacthuricinF103, Thuricin S, et Thuricin Bn1.

Les antifongiques qui peuvent être ;

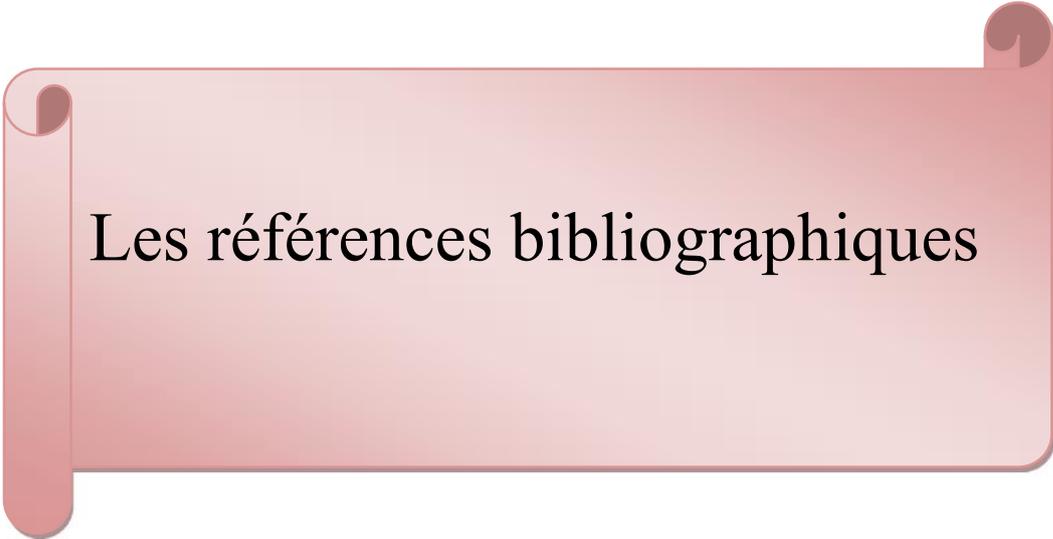
Des biosurfactants tels que les fengycines, Deepak et Jayapradha (2014) ont étudiés un biosurfactant lipopeptidique ayant un effet significatif sur le pathogène humain *Fusarium oxysporum* ;

des chitinases (enzymes) : *B. thuringiensis* à une activité antagoniste en raison de la production des chitinases envers *Verticillium dahliae*, des résultats similaires ont été obtenus contre *Aspergillus niger*, *A. foetidus*, et *A. ochraceus*. La chitinase produite par *B. thuringiensis* GS1 inhibe la croissance de *Rhizoctonia solani* dans les plantes de concombre, aussi, les chitinases de *Bacillus thuringiensis* peuvent être envisagés pour la lutte biologique

de *Sclerotium rolfsii* dans le soja et ont le potentiel pour la lutte biologique contre d'autres champignons phytopathogènes.

Concernant les protéines cristallines parasporales (Cry et Cyt), La production de 760 types de ces protéines par *B.thuringiensis* a été rapportée. Cependant, seulement très peu de travaux ont traité l'effet antimicrobien de ces dernières. Il s'agit des protéines Cry1Aa, Cry1Ab, CryAAc, Cry2A, Cry 2B, Cry, et Cry11A, ainsi que les protéines Cry3Aa, Cry1D et Cry1A qui ont montré une activité bactériostatique, et la protéine Cyt1Aa qui a montré une activité bactéricide.

Enfin, cette revue montre un grand potentiel d'utilisation de *B. thuringiensis* comme source de molécules antimicrobiennes dans différents domaines (alimentaire, médical, lutte biologique contre bactérie et champignons phytopatogènes, etc.



Les références bibliographiques

Les références bibliographiques

- A -

Aberkane A., Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., 2002. Comparative evaluation of two different methods of inoculums preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, *J. Antimicrob. Chemother.* 719–722.

Ahern M, Verschueren S, Van Sinderen D., 2003. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol Lett*; 220:127–131.

Agaisse H., Lereclus D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology* 177: 6027-6032.

Aggoune-Khinache N., Bensorsa D., Henniche F.Z., Daoudi M., Abdouni MA., Chabani A., Tiouit D. and Naim M., 2008. Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med. Mal. Infect.*, 39, 413-414.

Andreu N, Fletcher T, Krishnan N, et al., 2012. Rapid measurement of anti- tuberculosis drug activity in vitro and in macrophages using bioluminescence, *J. Antimicrob. Chemother.* 67,40 [92] S. Finger, C. Wiegand, H. Buschmann, et al., 2012. Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay, *Int. J. Pharm.* 436,851–856.

Ankolekar C., and Labbé R.G., 2010. Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 982–984.

Arikan S., Paetznick V, J.H. Rex., 2002. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of *caspofungin* against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.* 3084–3087.

Arikan S., P. Yurdakul, G. Hascelik, 2003. Comparison of two methods and three end points in determination of in vitro activity of *Micafungin* against *Aspergillus spp.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2640–2643.

Arikan S., 2007. Current status of antifungal susceptibility testing methods, *Med. Mycol.* 569–587.

Argola-Filho, R. C., and Loguercio, L. L., 2014. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects* 5, 62–91. doi: 10.3390/insects5010062.

Aronson J.N., 1976. Ammonia assimilation and glutamate catabolism by *Bacillus thuringiensis*, pp. 444-449. In D. Schlessinger, (ed.). *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Arora N., Selvapandiyan A., Agrawal N., and Bhatnagar R.K., 2003. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Bioph Res Com* 310 : 158–162.

Auger P., 2015. Activité anti- cancéreuse d'une parasporine de *Bacillus thuringiensis* 4R2. Mémoire. Université du Québec. 95P.

-B-

Baginski M., Sternal K., Czub J. and Borowski E., 2005. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim. Polon.* **52(3)**: 655–658.

Balouiri M., Bouhdid S, Harki E., 2015. Antifungal activity of *Bacillus* spp. isolated from *Calotropis procera* AIT. Rhizosphere against *Candida albicans*, *Asian J.Pharm.Clin.Res.* 213–217.

Barboza-Corona JE, Va'zquez-Acosta H, Bideshi DK, Salcedo- Hernandez R., 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*; 187:117–126.

Barrett D., 2002. From natural products to clinically useful antifungals. *Biochim Biophys Acta* 1587:224–233.

Barnbé S., 2004. Hydrolyse et oxidation partielle de boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-1. Thèse de Doctorat en science de l'eau, Institut national de la recherche scientifique-Centre Eau, Terre et Environnement.

Bassolé I.H.N., Juliani H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties, *Molecules*, 3989–4006.

Berliner E., 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Z. gesamte Getreidewesen* 3: 63- 70.

Beegle C.C. and Yamamoto T., 1992. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis berliner* research and development. *Canadian Entomologist* 124:587-616.

Berdy J., 2005.- Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics* 58, 1–26.

Bizzarri, M. F.; BISHOP, A. H., 2007. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 94, n. 1, p. 38–47.

Bouzi N., 2002. Fungal disease development and means of control Main fungal diseases of food legumes in Tunisia. *Collection M, Sciences de l'ingénieur*. 22-30.

Bravo A., Gill S.S., Soberon M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-35.

Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., and Soberón M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

Brogden, 2005. «Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? » *Nature reviews* 3 (): 238-250.

Brodrick N., Goodmean R., Raffa K., Handelsman J O., 2000. Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera Lymantriidae).

Bozorg A, Gates I.D., Sen A., 2015. Using Bacterial bioluminescence to evaluate the impact of biofilm on porous media hydraulic properties, *J. Microbiol. Methods* 109, 84–92.

Boonserm P., Davis P., Ellar D.J., Li J., 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363–382.

Bulla L.A., Bechtel D.B., Kramer K.J., Shethna Y.I., Aronson A.I., and Fitz-James P.C., 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*, pp. 147- 195. CRC Critical Reviews in Microbiology.

-C-

Cahan R., Friman H., and Nitzan Y., 2008. Antibacterial activity of Cyt 1 Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis. Ariel university of Samaria, Microbiology. Israel.154,3529-35.

Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Sarubbo, L.A.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Banat, I.M. 2013. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Prog.*, 29, 1097–1108.

Cantón E., Pemán J., Viudes A., 2003. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for blood stream *Candida* species, *Diagn.Microbiol.Infect.* 203–206.

Carlson, C. R. & Kolsto, A. B., 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.* 175: 1053-1060.

Carlson CR., Caugant DA., & KolstrA-B ., 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol*, 60: 1719–1725.

Caron F., 2012. Antimicrobialsusceptibilitytesting:afourfacetstoolfortheclin-ician, *J.Des.Anti-Infect.*14186-174.

Cerqueira, V.S.; Hollenbach, E.B.; Maboni, F.; Vainstein, M.H.; Camargo, F.A.; do Carmo, M.; Peralba, R.; Bento, F.M. , 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour. Technol.* 102, 11003–11010.

Chehimi S, Delalande F, Sable S, Hajlaoui MR, Van Dorsselaer A, Limam F, et al.,2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 2007; 53:284–290.

Chehimi S, Limam F, Lanneluc I, Delalande F, Van Dorsselaer A, Sable' S., 2012. Identification of three novel *B. thuringiensis* strains that produce the Thuricin S bacteriocin. *Bt Res*; 3:3–10.

Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, et al. A., 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1. 7, a new strain isolated from soil. *Lett Appl Microbiol*; 32:243–247.

Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, et al., 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9. *J Appl Microbiol*; 95:990–1000.

Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A., 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol Res*; 163:684–692.

Choma I.M., Grzelak E.M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography, *J.Chromatogr.* 2684–2691.

CLSI ., 1998. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guide line, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CLSI., 2002.Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard,2nded.,NCCLS documentM27- A2. CLSI, 940 WestValleyRoad,Suite1400,Wayne,Pennsylvania19087- 1898,USA.

CLSI., 2004. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania19087-1898, USA.

CLSI., 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal SusceptibilityTesting Filamentous Fungi,Approved Standard,2nded.,CLSI documentM38-A2,950 WestValleyRoadnSuite2500, Wayne, Pennsylvania19087,USA.

CLSI, 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Frequently Isolated or Fastidious Bacteria, Approved Guide line, 2nd.ed., CLSI document M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA,.

CLSI., 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CLSI., 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

Coates A.; Hu Y., 2007. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152, 1147–1154.

Cotter P.D., Hill C., Ross R.P., 2005. Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature reviews microbiology* .3:777-788.

Cotter , P, P Ross, et C Hill., 2013. «Bacteriocin - a viable alternative to antibiotics ?» *Nature Reviews Microbiology* 11: 95-105.

-D-

Daou N., 2008. Identification de nouveaux hôtes-dépendants chez *Bacillus cereus* caractérisation moléculaire et fonctionnelle de l'IIsA , une protéine de surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection. Thèse de doctorat de l'institut des sciences et industrie du vivant et de l'environnement (Agro Paris Tech), l'université Saint Joseph de Beyrouth (USJ).

Davies J. and Mazel D., 1997. Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur*. **170**: 14-17.

Das K., Tiwari R.K.S., Shrivastava D.K., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends, *J. Med. Plants Res.* 104–111.

DeBillerbeck V.G., 2007. Huiles Essentielles et Bactéries Résistantes aux Antibiotiques , *Phytotherapie* 5249–253.

De la Fuente-Salcido N, Alani's-Guzma'n MG, Bideshi DK, Salcedo-Herna'ndez R, Bautista-Justo M, Barboza Corona JE., 2008.Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*; 190:633–640.

Deleu M., Paquot M., Nylander T., 2008. Effect of fengycin , a Lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* , on Model Biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667-2679.<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>.

Demain A.L., 2006. From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:486–495.

Deepak R., Jayapradha R., 2014. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. Centre for Research on Infectious Diseases (CRID), School of Chemical and Biotechnology, SASTRA University, Tamilnadu, India.

Denes É., Hidri N., 2009. Synergie et Antagonisme en Antibiothérapie, *Antibiotique*, 106–115.

Dewanjee S., Gangopadhyay M., Bhattacharya N., 2015.Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry,*J.Pharm.Anal.*) 75–84.

Dromigny E.,2008.*Bacillus cereus*.(monography de microbiologie),collection dirigée par jean-paul Larpent. Edition :TEC&DOC lavoisier.

Driss F., Kallassy-Awad M., Zouari N., and Jaoua S., 2005. Molecular Characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Microbiol.* 99, 945–953. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02639.x.

Dulmage H.T., 1970. Production of the spore- δ -endotoxin complex variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 16:385-389.

-E-

Ecker, K.F., 1992.«Bacteriocin and food applications.» *Dairy Food Environ Sanit* 12 (1992): 204-209.

Elleuch L., Shaaban M., Smaoui S., 2010. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262, *Appl.Biochem.Biotechnol.* 579–593.

Ennahar , S, T Sashihara, K Sonomoto, and A Ishizaki ., 2000. "Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity." *FEMS Microbiol Rev* 24: 85–106.

Espinel-Ingroff A., Fothergill A., Peter J., 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus spp.*: NCCLS collaborative study, *J.Clin. Microbiol.* 3204–3208.

Espinel-Ingroff A., Canton E., Fothergill A., 2011. Quality control guide lines for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and Voriconazole disk diffusion susceptibility tests with non supplemented Mueller–Hinton Agar (CLSI M51 A document) for non dermatophyte Filamentous Fungi, *J.Clin.Micro- biol.* 2568–2571.

EPA Guidance for the registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient, (Registration Standard 540/RS-89-023, December, 1998).

Euzéby J.P.?2003. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, *Bacillus cereus*.

-F-

Favret ME, Yousten AA., 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*; 53:206–216.

Favret ME, Yousten AA., 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* ; 53:206–216.

Federici B.A., Lüthy P., Ibarra J.E., 1990. The parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: structure, protein composition and toxicity, In *Bacterial Control of Mosquitos and Blackflies: Biochemistry, Genetics and Applications of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus*, edited by H. de Barjac and S.Sutherland, (Rutgers University Pres, New Brunswick, N.J., 1990).

Federici B.A., Park H.W., and Bideshi D.K., 2010. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. *The Open Toxinology Journal* 3: 83-100.

Fischer R., Lautner H., 1961. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations, *Arch. Pharm.* 1–7.

Finger S, Wiegand C, Buschmann H. J, 2013. Antibacterial properties of cyclodextrin–antiseptics–complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay, *Int. J. Pharm.* 452, 188–193.

Frankenhuyzen K., Van., 2011. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 1–16.

Frutos R., Rang C., and Royer M., 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Critical Reviews of Biotechnology* 19: 227-276.

Fourati-BenFguira L., Fotso S., BenAmeur-Mehdi R., 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces sp.* Strain US80, *Res. Microbiol.* 341–347.

Flatt PM, Wu X, Perry S, Mahmud T., 2013. Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. *J Nat Prod* 76:939–946.

Frederiq, P., 1946. «Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'E.coli.» *C.R Soc Biol* 140: 1189-1194.

Galiger C, Brock M, G.Jouvion, et al., 2013. Assessment of efficacy of antifungals against *Aspergillus fumigatus* : value of real-time bioluminescence imaging, Antimicrob. Agents Chemother. 57,3046–3059.

Ginsburg, C., 2006. Aerial Spraying of *Bacillus Thuringiensis* Kurstaki (Btk). J. Pestic. Reform 26, 26–29.

Glazer A. N. and Nikaido H., 1995. Microbial insecticides, In Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology, (W.H. Freeman and Company, New York, 1995), p. 209-229.

Glare, T. R., O’Callaghan, M., 2000. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety.* John Wiley and Sons edition., 350 p, Chichester, Great Britain.

Goodall R.R, Levi A., 1946. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture, Nature 158,675.

Gonzales J.M., and Carlton B.C., 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous strains of *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 3: 92-98.

Gonzalez J.M., Dulrnage H.T., Carlton B.C., 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5: 351-365.

González J.M., and Carlton B.C., 1982. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*, p. 85-95. In U. Streips, S. Goodgal, W. Guild, and G. Wilson (ed.), Genetic Exchange: A Celebration and a New Generation. Marcel-Dekker, Inc., New York.

Gomez-Lopez A., Aberkane A., Petrikkou E., 2005. Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus spp*, J.Clin.Microbiol. 1251–1255.

Gomaa E. K., 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. J. Microbiol. 50, 103–111. doi: 10.1007/s12275-012-1343-y.

Gray EJ, Lee KD, Souleimanov AM, Di Falco MR, Zhou X, Ly A, et al., 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. J Appl Microbiol 100:545–554.

Grzelak E.M., Majer-Dziedzic B., Choma I.M., 2011.Development of a novel direct bioautography-thin-layer chromatograph ytest:optimization of growth conditions for gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, J.AOACInt. 1567–1572.

Guan P., Dai X., Zhu J., Li Q., Li S., Wang S., Li P., Zheng A., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *sichuansis* strain MC28 produces a novel crystal protein with activity against *Culex quinquefasciatus* larvae. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30 (4): 1417-1421.

Guinbretière m., thompson f., sorokin a., normand p., dawyndt p., ehlingschulz m., svensson v., nguyen-the c., heyndrickx m., de vos p., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. Environ Microbiol, 10, 851-860.

-H-

Hansen B.M. and Salamiou S., 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application (Charles, J. et al., eds), Kluwer Academic Publishers, 41–64.

Hausdorfer J., Sompek E., Allerberger F., 1998.E-testforsusceptibilitytesting of *Mycobacterium tuberculosis*, Int.J.Tuberc.LungDis.2(1998)751–755.

Heimpel A.M. and Angus T.A., 1960. Bacterial insecticides. Bacteriology Reviews 24: 266.

Heng, N.C.K, P.A Wescombe, J.P Burton, R.W Jack, et J.R Tagg., 2007. *The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria*. Édité par M.A Riley, & M.A Chavan. Berlin: Springer Verlag.

Heimpel A.M. and Angus T.A., 1960. Bacterial insecticides. Bacteriology Reviews 24: 266.

Hernstand C., Soares G.G., Wilcox E.R., Edwards D.I., 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. Nature Biotechnology 4: 305-308.

Helgason E., Økstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B., 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- one species on the basis of genetic events. Applied and Environmental Microbiology 66: 2627-2630.

Hernstand C., Soares G.G., Wilcox E.R., Edwards D.I., 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Nature Biotechnology* 4: 305-308.

Hollensteiner, J., Wemheuer F., Harting R., Kolarzyk A. M., Diaz Valerio S. M., Poehlein A., 2017. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* Inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. *Front. Microbiol.* 17:2171. doi: 10.3389/fmicb.2016.02171.

Horváth G., Jámboor N., Végh A., 2010. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography, *FlavourFragr.J.* 178–182.

Hu L., Zhang T., Yang Z., Zhou W., Shi Z., 2009. Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B 1 from *Fusarium verticillioides*, 48, 84-89.

-I-

Imhof A., Balajee S.A., Mar K.A, 2003. New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to *caspofungin*, *J.Clin.Microbiol.* 5683–5688.

Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., et al., 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**: 87–91.

-J-

JENSEN, G. B. et al., 2003 .The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, v. 5, n. 8, p. 631–640.

Jiménez-Esquilín A.E., Roane T.M., 2005. Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude Sagebrush Rhizosphere, *J. Ind. Micro- biol. Biotechnol.* 378–381.

Jose PA, Santhi VS, Jebakumar SRD ., 2011. Phylogenetic-affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic *Streptomyces* sp. inhabiting an Indian saltpan. *J Basic Microbiol* 51:348–356.

José E., Barboza Corona., Maria Guadalupe Aguilar-Uscanga, Blanca I Escudero-Abarca., 2004. Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. *Journal of Food Science*.

Jorgensen J.H., M.J.Ferraro., 2009. Antimicrobialsusceptibilitytesting: areviewof general principles and contemporary practices, *Clin.Infect. Dis.* 49:1749–1755.

Jorgensen J.H., Ferraro M.J., 2016. Antimicrobial susceptibility testing:a review of general principles and conte[65] A.Gehrt,J.Peter,P.A.Pizzo,etal.,Effectofincreasinginoculumsizeof M. Balouiri et al. / *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 , 71–7978 pathogenic filamentous fungionMICsofantifungalagentsbyBrothmicro- dilution method,*J.Clin.Microbiol.*33(1995)1302–1307.

-K-

Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, Jaoua S., 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*; 98:881–888.

Kamoun F, Fguira IB, Hassen NBB, Mejdoub H, Lereclus D, Jaoua S., 2011 Purification and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. *J Appl Microbiol*; 165:00–314.

Kirouac, M., Vachon, V., No??l, J.F., Girard, F., Schwartz, J.L., and Laprade, R.,2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1561, 171–179.

Klaenhammer, T.R.,1993. «Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.» *FEMS Microbiol Rev* 2: 39-85.

Klaenhammer., 1998. T.R. «Bacteriocins of lactic acid bacteria.» *Biochimie* 70 : 337-349.

Knaak N., Rohr A.A.,Fiuza L.M.,2007. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice field, Brazil.*Journal of Microbiology*.Vol 38,N°3.

Konaté K, Mavoungou J.F., Lepengué A.N., 2012.Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistant Staphylococcus aureus: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination, Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 18.

Kreger B.E., D.E.Craven, W.R.McCabe., 1980.Gram-negative bacteremia.IV.

Re- evaluation of clinical feature and treatment in 612 patients, Am.J.Med. 344–355.

Krieg A., Huger A.M., Langenbruch G.A., Schnetter W., 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. Z. Angew. Entomol. 96:500–508.

Kumar S.A., Nambisan B., Sundaresan A., 2013. Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a Rhabditid Entomopathogenic Nematode, Ann. Microbiol. , 209–218.

-L-

Lass-Flörl C., Cuenca-Estrella M., Denning D.W., 2006. Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus spp.* According to EUCAST methodology, Med. Mycol. 319–325.

Lecadet M.M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripouteau H., Hamson S., Laurent P., Thiéry I., 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Applied Microbiology 86: 660–672.

Le Minor L. and Veron M., 1989. Bacteriologie medicale. 2ème édition. *Medecine. Sciences Flammarion.*

Lee KD, Gray EJ, Mabood F, Jung WJ, Charles T, Clark SR, et al., 2009. The class II bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. Planta; 229:747–755.

Lertcanawanichakul M., Sawangnop S., 2008. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species, Walailak J. Sci. 161–171.

Li B., Li Q., Xu Z., Zhang N., Shen Q., Zhang R., 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soil borne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. Front. Microbiol. 5,1-10. Doi:10.3389/fmicb.2014.00636.

Liu C.M., Tzeng Y.M., 2000. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 11–17.

Lord, J.C., 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 19-29.

Lopez-Oviedo E., A.I.Aller, C.Martín, et al., 2006. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1108–1111.

-M-

Magaldi S., Mata-Essayag S., Hartung C. de Capriles., 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing, *Int.J.Infect.Dis.* 39–45.

Mahillon J., Rezsöhazy R., Ballet B., and Delcour J., 1994 .IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review., *Genetica*, **93**, 13-26.

Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1, 1–19.

Marston A., 2011. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, *J.Chromatogr.* 2676–2683.

Margaret, A.R, et E.W John., 2002. «BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application.» *Annu Rev Microbiol* 56 : 117–137.

Margalit J. and Dean D., 1985. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.). *Journal of the American Mosquito Control Association* 1: 1-7.

Malovichko, Y., Nizhnikov, A. A., and Antonets, K. S., 2019. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions. *Toxins* 11:347. doi: 10.3390/toxins11060347.

Menon T., Umamaheswari K., Kumarasamy N ., 2001. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients, *Acta Trop.* 151–154.

Meletiadis J., Meis J.F.J.M., Mouton J.W., 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media, *J.Clin.Microbiol.* 478–484.

Mehrabani M., Kazemi A., Ayatollahi Mousavi S.A., 2013. Evaluation of antifungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method, Jun- dishapur J. Microbiol. 1–7.

Mehmood M. A., Latif M., Hussain K., Gull M., Latif F., and Rajoka M. I., 2015. Heterologous expression of the antifungal b-chitin binding protein CBP24 from *Bacillus thuringiensis* and its synergistic action with bacterial chitinases. Protein Pep. Lett. 22, 39–44. doi: 10.2174/0929866521666140901143114.

Messai Y, Iabadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R., 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol Biol* 56:319–325.

MOLLE, V. et al., , 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 50, n. 5, p. 1683–1701, 2003.

Morales de la Vega, L., Barboza-Corona, J. E., Aguilar-Uscanga, M. G., and Ramírez-Lepe, M., 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* 52, 651–657. doi: 10.1139/w06-019.

Morganti, J., 2012. Nanoparticles and nanostructures man-made or naturally recovered: the biomimetic activity of chitin nanofibrils. *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.* 1:2. doi: 10.4172/2324-8777.1000101

-N-

Nakae K, Kurata I, Kojima F, Igarashi M, Hatano M, Sawa R, et al., 2013. Sacchathridine, A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J Nat Prod* 76:720–722.

Neppl C.C., 2000. Management of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins: The Environmental Studies Program, The University of Chicago.

Nes, I. F., S.S Yoon1, et D.B Diep.,2007. «Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria.» *Review Food Sci Biotechnol* 16: 675-690 .

Nijs A., Cartuyvels R., Mewis A., 2003. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical micro- biology laboratory, *J.Clin.Microbiol.*3627–3630.

Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh T ., 2011. Does broadspectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 66:689–692.

-O-

Ohba M., Aizawa K., 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 277–282.

Okesola AO, Makanjuola O., 2009. Resistance to Third-Generation Cephalosporins and Other Antibiotics by Enterobacteriaceae in Western Nigeria. *Am J Infect Dis* 5(1):17–20.

Öztopuz, Ö., Pekin, G., Park, R. D., and Eltem, R., 2018. Isolation and evaluation of new antagonist *Bacillus* strains for the control of pathogenic and mycotoxigenic fungi of fig orchards. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 186, 692–711. doi: 10.1007/s12010-018-2764-9.

-P-

Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I., 2008. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*, *Food Control.* 19,1174–1182.

Paik HD, Bae SS, Pan JG., 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 19:294–298.

Paloque L, Vidal N, Casanova M, et al., 2013. A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania*, *J. Microbiol. Methods* 95, 320–323.

Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., and Caballero P., 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins (Basel).* 6, 3296–3325.

Pandiani F., 2012. Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène *B. cereus* : rôle des hélicases à ARN. Thèse pour obtenir le titre de Docteur de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse Discipline : Biotechnologie, Microbiologie. Pp 6-9.

Pardo-López, L., Soberón, M., and Bravo, A., 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 3–22.

Paterson DL., 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 34:S20–8.

Petrikkou E., Rodri J.L., Gómez A., 2001.Inoculum standardization for anti-fungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans, *J. Clin. Microbiol.* 1345–1347.

Pfaller M.A., Sheehan D.J., Rex J.H., 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds :lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization, *Clin.Microbiol.Rev.* 268–280.

-R-

Rahbani J.,2015.Optimisation, etud’e de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides a base de souches de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol libanais.Thèse en vue de l’obtention du doctorat de l’Université de Toulouse.Institut National Polytechnique de Toulouse(INP Toulouse).234P.

Ramani R, Chaturvedi V, 2000. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test, *Antimicrob. Agents Chemother.*44,2752–2758.

Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., and Crickmore N., (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* 18, 189–194.

Rea M C., Sit CS., Clayton E., O’Connor P M., Whittal R M., Vederas J C., 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *PNAS* 2010; 107:9352–9357.

Rivera D., 1998. Growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* batch, Fed-batch and continuous bioreactor cultures. M.E.Sc Thesis, The University of Western Ontario, London, Canada.

Rodriguez-Tudela J.L., Chryssanthou E., Petrikkou E., 2003. Inter laboratory evaluation of hemato cytometer method of inoculums preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi, *J.Clin.Microbiol.* 5236–5237.

Rogers E., Molinski T., 2009. Zwittermicin A. Rapid assembly of C9-C15 and a formal total synthesis. *J Org Chem* 74:7664.

Rodriguez, E., M.I Martinez., N Horn., and H.M Dodd., 2003. "Heterologous production of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria." *Int J Food Microbiol* 80: 101-116.

Rosa, C.F.C.; Freire, D.M.G.; Ferraz, E.C., 2015. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 89–94.

Runyoro G.K., Matee M.I., Ngassapa O.D., 2006. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity, *BMC Complement. Altern. Med.* 6 ,11.

-S-

Sass P.,jansen A.,Szekat C ., SassV.,Sahl H.G.,Bierbaum G.,2008.the lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress reponse of staphylococcus aureus.*BMC Microbiology* .8:186pp.

Shahat A.A., El-Barouty G., Hassan R.A., 2008.Chemicalcompositionand antimicrobial activitiesoftheessentialoilfromtheseedsof *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae), *J. Environ. Sci. Health.* 519–525.

Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A., 2012. Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol* 7:373–390.

Silva, R.C.F.S.; Almeida, D.G.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. ,2014.Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 12523–12542.

Shepherd, R.; Rockey, J.; Shutherland, I.W.; Roller, S., 1995 . Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.*, 40, 207–217.

Stuyak k.E., Wirawan R. E.,Aroutcheva A. A.,Chikindas M. L., 2008.isolation of the bacillus subtilis antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product 6derived bacillus amyloliquefaciens .*journal of applied microbiology.*104:1067-1074.

Seo D. J., Nguyen D. M., Song Y. S., and Jungo W. J., 2012. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 407–415. doi: 10.4014/jmb.1107.07027.

Schallmey M., Singh A., Ward O., 2004. Developments in the use of bacillus species for industrial production.*Can. J. Microbiol.*50(1): 1-17.

Soufiane B., 2013. Propriétés physiologiques et génétiques –communes entre *Bacillus weihenstephanensis* et des souches de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus mycoides*. Thèse. Université du Québec. 222p.

Singleton P.,2005. Bactériologie (pour la médecine ,la biologie et les biotechnologies).La cellule bactérienne.©Dunode,Paris,2005.542p.

Schmidt, T. R., Scott, E. J., & Dyer, D. W. (2011). Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics*, 12(1), 430. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-430>.

Sauka D.H., Basurto-Ríos R.E., Ibarra J.E., and Benintende G.B., 2010. Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotrop. Entomol.*

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum JR, Feitelson J., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:705–806.

Srinivas G., Vennison S.J., Sudha S.N., Balasubramanian P., and Sekar V., 2014. Unique regulation of crystal protein production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis* is mediated by the cry protein-encoding 103-megadalton plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7): 2792–2797.

Sanchis V., and Bourguet D., 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. *Agron. Sustain. Dev.* 28: 11–20.

Soberón, M., Gill, S.S., and Bravo, A.,2009. Review Signaling versus punching hole : How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells ? *66*, 1337–1349.

Silva M.T.G., Simas S.M., Batista T.G., 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and Physalin B bringing out the importance of assay determination, *Mem.Inst.* 779–782.

Suleiman M., McGaw L., Naidoo V., 2010. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species, *Afr.J.Tradit.Complement.Altern.Med.* 64–78.

-T-

Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Champs C ., 2006. First report of CTX-M-15 and CTX- M-3 B-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 27:408–413.

Touati A., (2006).- Caractérisation des phénotypes de résistance acquis aux β -lactamines des souches d'entérobactéries isolées dans les hôpitaux de Béjaia. Doctorat soutenu à l'Université A. Mira de Béjaia.

Tagg J., 2004 .prevention of streptococcal pharyngitis by anti-streptococcus pyogenes bacteriocine – like inhibitory substances(BLIS)produced by streptococcus salivarius .Indian journal of medical research .119:13-16.

Tang, Y., Zou, J., Zhang, L., Li, Z., Ma, C., and Ma, N., 2012. Anti-fungi activities of *Bacillus thuringiensis* H3 chitinase and immobilized chitinase particles and their effects to rice seedling defensive enzymes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12, 8081–8086. doi: 10.1166/jnn.2012.6639.

Tajkarimi M .,2007 .*Bacillus cereus*.PHR 250. 6p.

Thomas D. J., Morgan A. W., Whipps J. M., and Saunders J. R., 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in labrotory culture, river water, and dipteran larvae..., *Appl. Environ. Microbiol*, **67**, 330-338.

Thomas, W.E., and Ellar., D.J., 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal 6-endotoxin : effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *197*, 181–197.

Tang Y.W, Stratton C.W., 2013.Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, 2nd ed., Springer, New York Heidelberg Dordrecht, London, pp. 937.

-U-

Ugras S, Kazim S, Hatice K, Zihni D., 2013. Purification and characterization of the bacteriocin thuricin bn1 produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 isolated from a Hazelnut Pest. *J Microbiol Biotechnol* 2013; 23:167–176.

-V-

Vijayakumar, S.; Saravanan, V., 2015. Biosurfactants-types, sources and applications. *Res. J. Microbiol.*, 10, 181–192.

Velikonja, J.; Kosaric, N., 1993. Biosurfactants in food applications. In *Biosurfactants: Production, Properties, Applications*; Kosaric, N., Sukan, F.V., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA,; pp. 419–448.

Van Frankenhuyzen, K., 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*, in *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, edited by P.F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, S. Higgs, (John Wiley & Sons, Chichester, UK, p. 1-35.

Vachon, V., Laprade R., and Schwartz J.L., 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *J. Invertebr. Pathol.* *111*, 1–12.

Vojtek L, Dobes P, Buyukguzel E, et al., 2014. Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph, *Eur.J.Entomol.* *111*,335–340.

-W-

Wang J., Liu J., Chen H., Yao J.,2007. Characterization of fusarium graminearum inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB, 889-894.

Wirth M.C., Park H., Walton W.E., and Federici B.A., 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* Delays Evolution of Resistance to Cry11A in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *71*, 185–189.

White R.L.,Burgess D.S., Manduru M., 1996.Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, andEtest, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1914–1918.

-Y-

Yousef A.E., Courtney P.D., 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods, in: A.E. Yousef, V.K. Juneja (Eds.), *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, CRC Press, Washington DC, pp. 2–8.

Yudina T.G., Bryukhanov A.L et Netrusov A. I., 2004. Susceptibility of Archaea to the Antibiotic Effect of the parasporal Inclusion Proteins from Different Bacillus thuringiensis subspecies. *Microbiology*, Vol. 73, No. 1, pp. 25-30.

Yudina T.G., Bryukhanov A.L., Zalunin I.A., Revina L.P., Shestakov A.I., Voyushina N.E., Chestukhina G.G., Netrusov A.I., 2007. Antimicrobial activity of different proteins and their fragments from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals against clostridia and archaea, *Anaerobe* 13 6-13.

-Z-

Zacharof, M.P, and R.W Lovitt., 2012. "Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria." *Review Article APCBEE Procedia* 2 : 50-56.

Zihaliwra K ., 2017. Potentiel de *Bacillus amyloliquefaciens* pour lutter contre les maladies fongiques épidémiques du maïs au sud Kivu: efficacité et mode d'action. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique.

الملخص :

في السنوات الأخيرة ، ازداد الاهتمام بالبحث والتطوير لعوامل جديدة مضادة للميكروبات من مصادر بيولوجية مختلفة. لذلك ، تم إيلاء اهتمام متضافر لهذا الموضوع. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) هي بكتيريا ممرضة للحشرات تستخدم في مكافحة البيولوجية. كان الهدف الأولي لعملنا هو دراسة النشاط المضاد للميكروبات لسلاسل *Bt*، ولكن بسبب جائحة كوفيد 19 ، تم إعاقة إكمال هذا العمل. يتكون هذا الموجز من حالة من فن الجزئيات المضادة للميكروبات التي ينتجها النوع *B. thuringiensis*. أظهرت مراجعة الأدبيات التي أجريناها أن *Bt* لديها أيضاً القدرة على إنتاج مجموعة متنوعة من الجزئيات ذات النشاط المضاد للميكروبات مثل المضادات الحيوية، والبكتريوسينات، والكيبتينازات، والعوامل الخافضة للتوتر، وما إلى ذلك التي يتم تصنيعها أثناء النمو، بالإضافة إلى بعض البروتينات الكريستالية التي يتم تصنيعها أثناء التكوّن.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus thuringiensis* ، جزئيات مضادات الميكروبات ، البكتريوسينات ، المضادات الحيوية ، مضادات الفطريات ، الكيبتينازات ، العوامل الحيوية.

Résumé :

Ces dernières années, l'intérêt pour la recherche et la mise au point de nouveaux agents antimicrobiens provenant de diverses sources biologiques a augmenté. Par conséquent, une attention concertée a été accordée à ce sujet. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est une bactérie entomopathogène utilisée en lutte biologique. L'objectif initial de notre travail était d'étudier l'activité antimicrobienne de souches locales de *Bt*, cependant à cause de la pandémie covid 19, la réalisation de ce travail a été entravée. Le présent mémoire consiste en un état de l'art sur les molécules antimicrobiennes produites par l'espèce *B. thuringiensis*. Notre revue bibliographique a montrée que *Bt* a également la capacité de produire une grande diversité de molécules ayant une activité antimicrobienne tels que les antibiotiques, les bactériocines, les chitinases, les biosurfactants, etc. synthétisées au cours de la croissance, ainsi que certaines protéines cristalline synthétisées au cours de la sporulation.

Mots clés : *Bacillus thuringiensis*, molécules antimicrobiennes, bactériocines, antibiotiques, antifongiques, chitinases, biosurfactants.

Abstract:

In recent years, interest in the research and development of new antimicrobial agents from various biological sources has increased. Therefore, concerted attention has been paid to this topic. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is an entomopathogenic bacterium used in biological control. The initial objective of our work was to study the antimicrobial activity of *Bt* strains, however due to the covid 19 pandemic, completion of this work was hampered. This brief consists of a state of the art of antimicrobial molecules produced by the species *B. thuringiensis*. Our literature review has shown that *Bt* also has the ability to produce a wide variety of molecules with antimicrobial activity such as antibiotics, bacteriocins, chitinases, biosurfactants, etc. synthesized during growth, as well as certain crystalline proteins synthesized during sporulation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, antimicrobial molecules, bacteriocins, antibiotics, antifungals, chitinases, biosurfactants.