THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme JIHANE RAHBANI

le mercredi 25 février 2015

Titre :

OPTIMISATION, ETUDE DE LA CINETIQUE ET DIMENSIONNEMENT DE LA PRODUCTION DES BIOPESTICIDES A BASE DE SOUCHES DE BACILLUS THURINGIENSIS ISOLEES DU SOL LIBANAIS

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

M. CEDRIC BRANDAM

M. ROGER LTEIF

Rapporteurs :

M. PHILIPPE JACQUES, POLYTECH LILLE

M. RACHAD SALIBA, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH

Membre(s) du jury :

M. RACHAD SALIBA, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH, Président

M. CEDRIC BRANDAM, INP TOULOUSE, Membre

M. DOMINIQUE SALAMEH, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH LIBAN, Membre

M. PIERRE ISSA, ARCENCIEL, Membre

M. ROGER LTEIF, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH LIBAN, Membre

Résumé

Parmi les méthodes alternatives respectueuses de l'environnement pour la lutte contre les ravageurs et la protection des cultures agricoles, les bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sont les plus largement utilisés. L'activité insecticide de *B.thuringiensis* réside dans la production d'inclusions cristallines protéiques appelées δ-endotoxines qui sont formées au cours de la sporulation. En préalable à ces travaux, de nouvelles souches de *B.thuringiensis* ont été isolées du sol libanais et ont montré un potentiel insecticide élevé, supérieur à des souches classiquement utilisées. Dans le cadre du développement d'une production industrielle, au Liban, de biopesticides à base de ces souches de *B.thuringiensis*, ce travail a visé à optimiser la production des δ-endotoxines afin d'augmenter les rendements et de réduire les coûts de production. A l'échelle industrielle, le milieu de culture des bactéries représente une part importante du coût de production. Ainsi, l'effet, sur la concentration des δ-endotoxines, de substitution des sources synthétiques coûteuses d'azote, de carbone et de minéraux, par un sous-produit de la minoterie de blé (le son de blé) a été étudié. L'efficacité de ce sous-produit agro-industriel comme source complète de nutriments, disponible localement à faible prix, a été prouvée pour des fermentations submergées de deux souches différentes toxiques contre des diptères ou des lépidoptères. La comparaison du milieu son de blé à d'autres milieux (synthétiques ou non), classiquement utilisés en bibliographie, a montré que ce milieu présente de nombreux avantages en termes de productivité, de rendement relatif des δ-endotoxines et de coût. Parallèlement à ce travail, une méthode simple et rapide de purification des cristaux a été développée de façon à obtenir des cristaux protéiques purs à 99 % nécessaires comme standards pour le dosage des cristaux dans le milieu de fermentation. Un autre objectif du travail a été d'analyser l'effet de l'aération sur la cinétique de croissance et de sporulation d'une nouvelle souche de *B.thuringiensis* var *kurstaki*. Les différentes conditions d'aération testées en fermenteurs de 2 L, caractérisées par le coefficient volumétrique de transfert de dioxygène (K_La), ont permis de montrer l'importance de ce paramètre et de l'optimiser pour obtenir la meilleure productivité en biopesticides. Le meilleur rendement en protéines de toxines a été obtenu dans un milieu son de blé 6 % (masse/volume) dans des conditions d'aération correspondant à un K_La de 65,5 h^{-1} alors que la meilleure productivité des protéines de toxines a été atteinte dans le milieu 9 % pour un K_La de 102 h^{-1}. Sur la base de cette étude, le dimensionnement de la production de *B.thuringiensis* à l'échelle 1000 L a été réalisé. L'unité de production a été construite et les premiers essais réalisés ont permis de produire de façon satisfaisante des lots de biopesticides. L'ajustement des protocoles industriels reste à faire.

Mots clés : *Bacillus thuringiensis*, biopesticides, δ-endotoxines, purification, son de blé, cinétique, productivité, aération, scale-up

Abstract

Among the safe and environment friendly methods for the fight against pests and agricultural crops protection, *Bacillus thuringiensis* based biopesticides are the most widely used. The insecticidal activity of *B. thuringiensis* resides in the production of protein crystal inclusions called δ-endotoxins, which are formed during sporulation. Preliminary to this work, new *B. thuringiensis* strains were isolated from Lebanese soil and showed higher insecticidal potential than the conventionally used strains. As part of the development of an industrial production, in Lebanon, of biopesticides based on these strains of *B.thuringiensis*, this work aimed to optimize the production of δ-endotoxins to increase yields and reduce the cost of mass production. At industrial scale, the bacteria culture medium represents a significant part of the production cost. Thus, the effect on the concentration of the δ-endotoxins, of substituting expensive synthetic sources of nitrogen, carbon, and minerals, with a byproduct of wheat mill (wheat bran) was studied. The effectiveness of this agro-industrial by-product available locally at low prices, as complete source of nutrients, in submerged fermentations of two different strains of *B.thuringiensis* toxic against Lepidoptera and Diptera, has been proven. The comparison of the wheat bran medium to other mediums (synthetic or not), conventionally used in the bibliography, has shown that this medium this medium has many advantages in terms of productivity, relative yield of δ-endotoxins and cost. In parallel to this work, a simple and quick method of crystal purification was developed to obtain pure protein crystals to 99 % required as standards for the determination of crystals concentration in the fermentation medium. Another objective of the study was to analyze the effect of aeration on growth and sporulation kinetics of a new strain of *B.thuringiensis* var *kurstaki*. The different aeration conditions tested in fermenters of 2 L, characterized by the volumetric oxygen transfer coefficient (K_La), permitted to show the importance of this parameter and to optimize it to get the best biopesticides productivity. The best yield of toxin proteins relative to the wheat bran ratio in the culture medium was obtained in the 6 % (weight/volume) medium in aeration conditions corresponding to a K_La of 65.5 h^{-1}, while the highest productivity of toxin proteins has been reached in the 9 % medium for K_La of 102 h^{-1}. On this study basis, the scale up of *B. thuringiensis* production was performed in a bioreactor of 1000 L. The production unit was built and the first tests carried out have produced satisfactory batches of biopesticides. Industrial protocols are still to be adjusted.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, δ-endotoxins, wheat bran, kinetics, K_La, productivity, aeration, scale up, purification

"The more I study science, the more I believe in God."

–Albert Einstein

Je voudrais commencer ce manuscrit en remerciant Dieu et Saint Charbel.

Sans vous, je n'en serai pas là aujourd'hui.

Que votre grâce me conduise chaque jour dans le droit chemin ; Amen

Dédicaces

Je dédie ce travail à vous

Professeur Pierre Strehaiano,

J'ai eu l'honneur de vous rencontrer lors d'un cours de Master II. J'ai été impressionné par vos connaissances et votre modestie. Vous avez cru en ma passion pour la recherche et vous m'avez encouragé dès le départ. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon estime, ma considération et ma reconnaissance envers vous.

Mes parents,

Votre amour, votre écoute et votre soutien ont toujours été sans faille, merci infiniment à vous.

Mes enfants,

On a vécu cette aventure ensemble. On est devenu plus patient et on a appris que tout est possible quand on a la bonne volonté. Il y avait des dures épreuves mais vous êtes certainement devenus plus indépendants et plus responsables. Je suis fière de vous Emilio (mon cœur), Gaëlle (ma force), et Martin (ma joie).

Mon mari,

Ton amour a toujours été ma principale source d'énergie. Tu m'as soutenu jusqu'au bout. Je suis fière, chéri, d'être la femme d'un homme comme toi.

Remerciements

"La pierre n'a point d'espoir d'être autre chose qu'une pierre
Mais de collaborer, elle s'assemble et devient temple."
Antoine. de Saint-Exupéry

Je tiens à remercier tous ceux qui ont collaboré à la réussite de ce travail.

En premier lieu je remercie M.Toufic RIZK, doyen de la faculté des Sciences, pour m'avoir accordé l'opportunité de réaliser mon rêve de poursuivre mes études supérieures et d'exécuter ce projet.
Je remercie également Mme Claire ALBASI, directrice du laboratoire de génie chimique, de m'avoir accueillie au sein du LGC.

J'adresse mes vifs remerciements à professeur Roger LTEIF, M.Cedric BRANDAM, et M.Dominique SALAMEH qui ont dirigé cette thèse, pour m'avoir guidé pour mener à terme ce doctorat, pour la confiance qu'ils m'ont accordée, pour leur encadrement présent sans être trop directif, pour la pertinence de leurs conseils précieux qui m'ont été tout le temps fructueux et pour leur soutien motivant et encourageant.
Je vous remercie sincèrement chers docteurs, je vous exprime ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Les souches de *Bacillus thuringiensis* qu'on a utilisées dans ce projet ont été isolées par l'équipe de Mme Mireille KALLASSY AWAD. J'ai appris à faire des gels de polyacrylamide dans son laboratoire. Mme Mireille était toujours à l'écoute et j'aime lui adresser un remerciement très particulier.

Un grand Merci aux Professeurs Philippe Jacques et Rachad Saliba pour l'honneur qu'ils m'ont accordée en acceptant d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je souhaiterai remercier tout le personnel de la Faculté des Sciences. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à M. Charbel AFIF pour ses conseils pratiques chaque fois que j'ai eu un problème technique avec l'équipement de l'HPLC.

Je remercie également Mme Laure EL CHAMY, Dr. Eric Marois et Julien Soichot du groupe Anophèles INSERM U963/ CNRS UPR9022 de Strasbourg pour l'aide qu'ils nous ont apportée concernant les tests de toxicité de la souche H_3 de *Bacillus thuringiensis*.
J'adresse aussi des grands remerciements à l'équipe du département de physique (Mme Marie ABBOUD , Rana et Christelle) avec qui on a collaboré dans les essais de quantification des cristaux de *Bacillus thuringiensis* par une méthode optique.
Merci à Hilda HNEIN et Helga FRANCIS, responsables des laboratoires de chimie, pour n'avoir épargné aucun effort pour m'aider, pour votre amitié, pour nos souvenirs. Merci également à Myriam MAATOUK qui était une assistante au laboratoire de chimie et qui a toujours ajouté un sourire à nos journées.
Un grand merci à M.Joseph YAGHI, responsable du laboratoire de biologie, pour tous les coups de mains (pour porter le bioréacteur de 5 L à l'autoclave).
Je remercie aussi et je souhaite une bonne continuation à tous les doctorants (anciens et actuels) dont je nomme Hilda, Helga, Rana, Micheline, Rachelle, Joelle, Joanna, Thérèse, Hiba, Christelle, Georges et Mandy.

J'adresse une pensée particulière à tous les membres de l'équipe BioSym pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer durant mes séjours au laboratoire de génie chimique de Toulouse.
Des grands remerciements à Mme Patricia THAILANDER, et Mme Sandra BEAUFORT pour leur gentillesse, leurs encouragements et leur sympathie.
Merci aussi à tous les doctorants et chercheurs que j'ai eu le plaisir de rencontrer au LGC, surtout Marie Beatrice, Sitha, Coline, Mano, Pedro, Mickael, Elise, Carmen, Lorena, et Nathacha.
Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

De plus, j'exprime ma profonde gratitude envers le conseil de recherche de l'Université Saint Joseph, ***arcenciel***, et Campus France pour leurs aides financières.

Mes remerciements vont également à tout le personnel de « ***arcenciel*** », particulièrement à Joseph ABDO, l'ingénieur responsable de la production industrielle des biopesticcides et Abdo TANNOURI, l'ingénieur agronome qui a fait les tests sur le terrain.
Il est agréable de travailler avec des gens de bonne humeur comme vous.

Je termine en adressant des remerciements très chaleureux à mes beaux-parents, mes sœurs et mes belles sœurs, mes frères et mon beau-frère et à mon amie Sana pour tout le support qu'ils m'ont apporté, pour leur aide morale et leurs encouragements.

Sommaire

Liste des Abréviations..... ii

Liste des Figures..... iv

Liste des Tableaux..... viii

Liste des publications et communications x

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....1

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE..... 7

I.1. *Bacillus thuringiensis*.....8

I.1.1. Histoire de *B.thuringiensis* 8

I.1.2. Ecologie et prévalence 9

I.1.3. Caractéristiques générales de *B.thuringiensis*..... 10

1.1.4. Classification de *B.thuringiensis* 11

I.1.5. Propriétés morphologiques de *B.thuringiensis* 11

I.1.6. Cycle de vie de *B.thuringiensis* 13

I.2. Toxines de *B.thuringiensis* 15

I.2.1. Toxines Cry et Cyt..... 15

I.2.2. Autres toxines de *B.thuringiensis* 17

I.3. Mode d'action de *B.thuringiensis*.....17

I.3.1. Activité insecticide de *B.thuringiensis*..... 17

I.3.2. Mode d'action spécifique des protéines Cry 18

I.4. Evaluation du produit *B.thuringiensis* 20

I.5. Méthodes de séparation spores-cristaux 23

I.6. Milieux de culture de *B.thuringiensis* 25

I.6.1. Sources de nutriments **26**
I.6.1.1. Carbohydrates 26
I.6.1.2. Azote 28
I.6.1.3. Potassium et phosphate 29
I.6.1.4. Minéraux 29
I.6.2. Rapport C:N **30**
I.6.3. Milieux Synthétiques **31**
I.6.4. Milieux alternatifs **32**
I.7. Conditions de fermentations **34**
I.7.1. Conditions d'aération **35**
I.7.2. Température et pH **37**
I.8. Etude cinétique de la fermentation de *B.thuringiensis* **38**
I.8.1. Phases de croissance **38**
I.8.2. Taux de croissance **41**
I.8.3. Variation de pH **42**
I.8.4. Vitesse d'absorption d'oxygène **43**
I.8.5. Consommation de substrat **45**
I.9. Conclusions **46**

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES **48**
II.1. Cultures de *B.thuringiensis* **49**
II.1.1. Les souches de *B.thuringiensis* **49**
II.1.2. Conservation des souches **49**
II.1.3. Milieux de culture **50**
II.1.4. Milieu « son de blé **51**
II.2. Déroulement des fermentations à l'échelle du laboratoire **51**
II.2.1. Préparation de la pré-culture **51**
II.2.2. Conditions de la culture principale **52**
II.2.2.1. Recherche d'un nouveau milieu de culture et comparaison du milieu conçu au milieu Anderson et au milieu semi-synthétique standard 52

II.2.2.2. Etude de l'effet de l'aération sur la cinétique de la fermentation de *B.thuringiensis* 52
a) Détermination du K_La 52
b) Conditions des fermentations 53
II.3. Essais de production dans le bioréacteur de 1000 L 56
II.3.1. Stérilisation 56
II.3.2. Préparation de la pré-culture 56
II.3.3. Conditions de la culture principale 57
II.4. Techniques et méthodes analytiques 58
II.4.1. Numération des cellules, spores et cristaux 58
II.4.2. Détermination du nombre de spores par la méthode indirecte (numération en milieu solide) 59
II.4.3. Estimation de la concentration des toxines 60
II.4.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 61
a)Principe 61
b)Protocole 62
II.4.5. Détermination de la concentration des sucres 63
II.4.5.1. Extraction et hydrolyse des carbohydrates du son de blé 63
II.4.5.2. Dosage des sucres 63
II.4.5.2.1. Chromatographie : système et appareillage 63
II.4.5.2.2. Conditions opératoires 63
II.4.5.2.3. Détection et quantification 64
II.4.5.2.4. Exemple de chromatogramme 64
II.5. Le test de « Congo red » pour l'identification de l'activité cellulosique des souches de *B.thuringiensis* 65
II.6. Purification des cristaux par la méthode de flottation de Sharpe *et al.* (1978) 66
II.7. Bio essai 66
II.8. Méthode « Speckle » 67
II.8.1. Préparation des échantillons 67
II.8.2. Configuration expérimentale 67
II.8.3. Principe 67

II.9. Etude de l'effet des rayons UV 68

II.10. Détermination des paramètres cinétiques 69

II.10.1. Vitesse spécifique de croissance 69

II.10.2. Vitesse de transfert du dioxygène 69

II.10.3. Vitesse de consommation du dioxygène 70

II.10.4. Productivité..... 70

II.10.5. Rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé 70

II.11. Analyse statistique 71

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....72

CHAPITRE III.MÉTHODES DE PURIFICATION ET DE QUANTIFICATION DES CRISTAUX.....73

III.1. Introduction 74

III.2. La nouvelle méthode de séparation des spores et des cristaux 75

III.2.1. Séparation des spores et cristaux de la souche H_3 de *B.thuringiensis*..... 75

III.2.1.1. Protocole de la méthode de séparation 75

III.2.1.2. Efficacité du protocole de séparation..... 76

III.2.1.3. Pourcentage de récupération des cristaux..... 78

III.2.1.4. Effet de la méthode de purification sur la composition en protéines des cristaux..... 78

III.2.1.5. Test de toxicité des cristaux purifiés par la nouvelle méthode 79

III.2.2. Séparation des spores et cristaux de la souche Lip de *B.thuringiensis* 80

III.3. Essais de quantification et caractérisation des cristaux de « Lip » par une méthode optique « laser speckle » 81

III.4. Conclusions 84

CHAPITRE IV.MISE AU POINT D'UN NOUVEAU MILIEU DE CULTURE 85

IV.1. Introduction 86

IV.2. Mise au point d'un nouveau milieu de culture 87

IV.2.1. Choix des milieux de référence 87
IV.2.2. Formulation du nouveau milieu alternatif 88
IV.2.3. Optimisation de la quantité du son de blé dans le milieu de culture 89
IV.2.4 Essais d'enrichissement du milieu son de blé par une autre source de protéines ou de carbohydrates 90
IV.2.5. Test de l'efficacité de l'extrait liquide du son de blé pour la production de « Lip » 91
IV.2.6. Discussions des résultats 91
IV.3. Analyse de la consommation des sucres du son de blé dans des cultures de *B.thuringiensis* 92
IV.3.1. Cultures de « Lip » 92
IV.3.2. Cultures de « H_3 » 94
IV.3.3. Test de la capacité des souches « Lip » et « H_3 » à utiliser la cellulose 94
IV.3.4. Discussions des résultats 95
IV.4. Comparaison du milieu 6 % son de blé au milieu Anderson et au milieu standard semi synthétique 96
IV.4.1. Production de « Lip » 96
IV.4.1.1. Discussions des résultats 99
IV.4.2. Production de H_3 101
IV.4.2.1. Discussions des résultats 103
IV.5. Conclusions 103

CHAPITRE V. ETUDE CINÉTIQUE 105
V.1. Introduction 106
V.2. Croissance, sporulation et production de δ-endotoxines dans le milieu 6 % (m/v) son de blé pour différentes valeurs de K_La 106
V.2.1. Conditions d'aération 106
V.2.2. Concentration du dioxygène dissous 107
V.2.3. Courbes de croissance 108
V.2.4. Sporulation 109
V.2.5. Production de δ-endotoxines 110

V.2.6. Phases de croissance 111
V.2.7. Taux de consommation du dioxygène 114
V.2.8. Relation entre phase de croissance et pourcentage de CO_2 dans l'air effluent à différents K_La 115
V.2.9. Variations du pH 117
V.2.10. Variations de la vitesse spécifique maximale de croissance et du taux spécifique maximal de consommation du dioxygène en fonction de K_La 118
V.2.11. Productivité 119
V.2.12. Rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé 120
V.2.13. Effet de la diminution du flux d'air à la fin de la croissance végétative 121
V.3. Croissance, sporulation et production de δ-endotoxines pour différents rapports (m/v) du son de blé dans le milieu de culture dans les mêmes conditions d'aération 122
V.3.1. Concentration du dioxygène dissous 123
V.3.2. Courbes de croissance 123
V.3.3. Sporulation et production de cristaux de δ-endotoxines 124
V.3.4. Variation du pourcentage de CO_2 dans l'air effluent pour différents rapports de son de blé 128
V.3.5. Corrélation entre la concentration de dioxygène consommé et la concentration des cellules obtenue 128
V.3.6. Essai d'amélioration du rendement en protéines de toxines dans le milieu 9 % (m/v) son de blé 129
V.4. Conclusions 130

CHAPITRE VI. ESSAIS INDUSTRIELS 133
VI.1. Introduction 134
VI.2. Essais de production au niveau du fermenteur de 1000 L 137
VI.3. Processus de production de « Lip » dans le bioréacteur de 1000 L 141
VI.4. Etude de la stabilité du produit et condition d'utilisation 144
VI.4.1. Effet de la température 144
VI.4.2. Effet des rayons UV 145

VI.5. Tests de l'efficacité du produit sur le champ 146
VI.6. Conclusions.....147

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....149

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....154

ANNEXES (PUBLICATIONS) 178

Liste des Abréviations

ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
ASB	Albumine sérum bovin
ATP	Adenosine triphosphate
BMM	Bombyx mori pupae + molasses medium
B.thuringiensis	*Bacillus thuringiensis*
CL 50	Concentration léthale médiane
CMC	Carboxymethylcellulose
Cry	Crystal
CTS	Concentration totale en solides
Cyt	Cytolytic
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Environmental Protection Agency
HPLC	high performance liquid chromatographie
ICP	Inclusions cristallines de protéines
LB	Luria Bertani
m/v	Masse/volume
NBY	Nutrient broth yeast extract medium
NDOPL	Valeurs normalisées du degré de polarisation linéaire
NYSM	Nutrient yeast extract salts medium
Orf	Open reading frame
OTR	Oxygen transfer rate

OUR	Oxygen uptake rate
PHB	Acide polyhydroxy butyrique
PIV	Proteines végétatives insecticidesVegetative insecticide proteins
rpm	Rotation par minute
SDS/PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sig	Sigma
SPM	Soya bean protein medium
TB	Terrific broth
TSY	Tryptic soy yeast extract medium
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
v/v	Volume/volume
WSM	Cheese whey, soya bean milk and molasses medium

Liste des Figures

Chapitre I

Figure I.1 : Colonies de *B.thuringiensis* formées sur un milieu T_3 gélosé 12

Figure I.2 : Photographie prise au microscope d'une culture de *B.thuringiensis kurstaki* au cours de la phase de sporulation (Lacoursière J.O. et Boisvert J. Université de Québec à Trois Rivières). 12

Figure I.3 : Schématisation du cycle vital de *B.thuringiensis* 1) germination : réhydratation de la spore, 2) germination : production de la cellule végétative, 3) croissance et multiplication des cellules végétatives, 4) sporulation : formation de la spore (s) et de l'inclusion cristalline (c), 5) lyse : éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et du cristal, 6) période de dormance : la spore résiste aux conditions défavorables (Lacoursière J.O. et Boisvert J. Université de Québec à Trois Rivières). ... 14

Figure I.4: Mode d'action de *B.thuringiensis* : ingestion du complexe spore/cristal (1); solubilisation des cristaux (2); activation des protéines (3); liaison des protéines aux récepteurs spécifiques (4); formation des pores de la membrane et lyse des cellules (5) (Schünemann, 2014). 20

Figure I.5. Diagramme de sporulation de *B.thuringiensis kurstaki* (Bulla *et al*., 1980) 39

Figure I.6. Variation du pH au cours de la fermentation de *B.thuringiensis kurstaki* dans différents milieux de culture..... 43

Figure I.7. Variation de la biomasse, du taux d'absorption de l'oxygène et du taux spécifique de consommation de l'oxygène dans une culture batch de *B.thuringiensis* kurstaki dans un milieu Anderson (Rivera, 1998). 44

Chapitre II

Figure II.1 Schématisation des déroulements des fermentations à l'échelle du laboratoire 55

Figure II.2. Bioréacteur de 1000 L..... 56

Figure II.3. Schéma du quadrillage d'une cellule Petroff Hausser 58

Figure II.4. Schématisation de la méthode indirecte de détermination du nombre de spores..... 60

Figure II.5. Chromatogramme de l'hydrolysat du son de blé obtenu par HPLC couplée à la réfractométrie..... 64

Figure II.6. Vue de dessus de l'installation expérimentale de « Speckle ». λ/2 et λ/4 sont des plaques d'onde de demi et de quart. 67

Chapitre III

Figure III.1. Séparation des spores, cristaux et débris cellulaires lors de la centrifugation 76

Figure III.2. Micrographie, prise au moyen d'un microscope optique, des cristaux sphériques de H_3 colorés avec une solution de bleu de coomassie 77

Figure III.3. Gel de polyacrylamide des cristaux de H_3 avant (A, B) et après purification (C, D), M : marqueur de la taille des protéines 79

Figure III.4. Survie des larves *Anopheles gambia*, au quatrième stade larvaire, infectées avec des toxines purifiées de H_3. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes. Les mêmes résultats ont été obtenus sur des larves au troisième stade larvaire 80

Figure III.5. Micrographie, prise au moyen d'un microscope optique, des cristaux de Lip colorés avec une solution de bleu de coomassie 81

Figure III.6. Variation du degré de polarisation linéaire en fonction de la concentration des diffuseurs 82

Chapitre IV

Figure IV.1. Variation de la concentration des cristaux et de la concentration des protéines avec le pourcentage de son dans le milieu de culture 89

Figure IV.2. Rendement en protéines de toxines par rapport au pourcentage de son de blé dans le milieu de culture 90

Figure IV.3. Test de « congo red » pour vérifier la capacité des souches de *B.thuringiensis* à dégrader la cellulose, (a) H_3 ; (b) Lip 95

Figure IV.4: Analyse Comparative par SDS/PAGE des profils de protéines du complexe spore/cristal de "Lip" obtenus dans différents milieux de culture: 1: marqueur de taille des protéines; 2: milieu semi synthétique standard; 3: milieu Anderson 10 $g.L^{-1}$ de glucose, 1990; 4: milieu son de blé 6 % 99

Chapitre V

Figure V.1. Variations de la concentration du dioxygène dissous pour différentes valeurs de K_La 108

Figure V.2. Courbes de croissance de « Lip » à différentes valeurs de K_La 109

Figure V.3. Variation de la concentration des spores libres pour différents K_La 110

Figure V.4. Variations de concentration des cellules, concentration des spores, et concentration du dioxygène dissous pour K_La de 13,3 h^{-1} 112

Figure V.5. Variations de la vitesse de consommation du dioxygène pour les différentes valeurs de K_La 114

Figure V.6. Variation du pourcentage de CO_2 pour K_La 7,2 h^{-1} 115

Figure V.7. Variation du pourcentage de CO_2 pour K_La 13,3 h^{-1} 116

Figure V.8. Variation du pourcentage de CO_2 pour K_La 65,5 h^{-1} 116

Figure V.9. Variation du pH au cours de la fermentation de « Lip » dans le milieu 6 % son de blé pour (a) K_La de 7,2 h^{-1} ; (b) K_La de 65,5 h^{-1} 118

Figure V.10. Variation de μ_{max} et QO_{2max} pour différentes valeurs de K_La 119

Figure V.11. Productivités des spores et des toxines à différentes valeurs de K_La 120

Figure V.12. Rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé 121

Figure V.13. Comparaison entre les courbes de croissance de « Lip » dans des conditions constantes d'aération correspondant à K_La de 13,3 h^{-1} ; des conditions constantes correspondant à K_La de 65,5 h^{-1} et des conditions variables correspondant à K_La de 65,5 h^{-1} durant la phase de croissance et K_La de 13,3 h^{-1} au cours de la sporulation 122

Figure V.14. Variation de la concentration du dioxygène dissous à différents rapports de son de blé 123

Figure V.15. Courbes de croissance de « Lip » à différents rapports (m/v) du son dans le milieu de culture 123

Figure V.16. Variations de la concentration des spores libres pour différents rapports de son 124

Figure V.17. Corrélations entre les concentrations des cellules, des spores et des cristaux et le rapport du son de blé dans le milieu de culture 126

Figure V.18. Rendement en protéines des toxines (g de protéines/g de son) 127

Figure V.19. Productivité des spores et des protéines des toxines à différents rapports de son de blé dans le milieu de culture 127

Figure V.20. Pourcentage de CO_2 dans l'air effluent pour différents rapports de son de blé 128

Figure V.21. Corrélation entre la concentration des cellules obtenue à différents rapports de son et la quantité de dioxygène consommé 129

Chapitre VI

Figure VI.1. Unité de production des biopesticides à Taanail 136

Figure VI.2. Variation de la productivité des protéines en fonction du flux d'air dans les fermenteurs de 2 et 1000 L 138

Figure VI.3. Comparaison des courbes de croissance de « Lip » dans le fermenteur 2 L pour K_La de 65,5 h^{-1} et dans le bioréacteur de 1000 L pour un flux d'air de 0,58 $L.L^{-1}min^{-1}$ 139

Figure VI.4. Processus de production de « Lip » à l'échelle industrielle 143

Figure VI.5. Variation de la concentration des cristaux en fonction du temps d'exposition à la lumière UV (λ=365 nm) 145

Liste des Tableaux

Chapitre I

Tableau I.1. Exemples de milieux synthétiques de culture de *B.thuringiensis* 31

Tableau I.2 : Exemples de milieux de culture alternatifs de *B.thuringiensis*..... 32

Tableau I.3. Effets de certains paramètres sur le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène K_La..... 35

Chapitre II

Tableau II.1. Composition du milieu T_3 solide 49

Tableau II.2. Composition des milieux de culture utilisés pour les essais de production des différentes souches de *B.thuringiensis*..... 50

Tableau II.3. Conditions d'aération 54

Tableau II.4. Compositions de : tampon de charge, gel de concentration et gel de séparation..... 62

Tableau II.5. Composition du milieu CMC solide..... 65

Chapitre III

Tableau III.1: Variation du degré de polarisation en fonction de la taille des cristaux pour deux concentrations différentes 83

Chapitre IV

Tableau IV.1. Effet de substitution de chacune des sources de nutriments du milieu Anderson par du son de blé 3 % (m/v) sur la concentration des toxines et des cristaux . 88

Tableau IV.2. Effet de la supplémentation du milieu son de blé 6 % par une autre source de carbohydrates ou de protéines sur la concentration des δ-endotoxines..... 91

Tableau IV.3. Consommation des sucres durant la fermentation de « Lip » dans 50 mL du milieu son de blé 6 % dans des expériences au niveau des erlenmeyers de 1 L..... 93

Tableau IV.4. Consommation des sucres durant la fermentation de « H_3 » dans 50 mL du milieu son de blé 6 % dans des expériences au niveau des erlenmeyers de 1 L 94

Tableau IV.5. Comparaison du milieu son de blé 6 % au milieu Anderson et au milieu standard semi synthétique pour la production de « Lip »..... 97

Tableau IV.6. Comparaison du milieu son 6 % son de blé au milieu Anderson et au milieu standard semi synthétique pour la production de « H_3 »..... 102

Chapitre V

Tableau V.1. Concentrations maximales des cellules, spores, cristaux et protéines des toxines à différentes valeurs de K_La 111

Tableau V.2. Temps de fin de chacune des étapes de croissance de « Lip » pour les différentes valeurs de K_La 113

Tableau V.3. Concentrations des spores, des cristaux et des toxines pour différents rapports (m/v) de son de blé 125

Chapitre VI

Tableau VI.1. Concentration des spores et des cristaux et concentration et productivité des protéines obtenues pour différentes conditions d'aération dans le fermenteur de 1000 L 137

Tableau VI.2. Intervalle de temps de chacune des étapes de croissance de « Lip » dans le fermenteur de 1000 L en comparaison avec le fermenteur de 2 L 140

Tableau VI.3. Effet du stockage du produit à différentes températures sur la concentration des cristaux bipyramidaux de « Lip » et sur celle des protéines totales .. 144

Tableau VI.4. Niveau de l'infection par *Cydia pomonella* sur les fruits récoltés 147

Liste des publications et communications

Ces travaux de thèse ont donné lieu aux publications et communications dénommées ci-dessous.

I- Publications:

1- RAHBANI MONSEF J., SALAMEH D., KALLASSY AWAD M., BRANDAM C. and LTEIF R. (2014)
Evaluation of a cereal milling by-product for the low cost production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* in submerged fermentation
European Journal of Biotechnology and Bioscience, 1, Nº 6, 10-16

2- RAHBANI MONSEF J., SALAMEH D., KALLASSY AWAD M., CHAMY L., BRANDAM C. and LTEIF R. (2014)
A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals
The Journal of Microbiological Methods 107, 147-149

3- NASSIF R., ABOU NADER C., RAHBANI J., PELLEN F., SALAMEH D., LTEIF R., LE BRUN G., LE JEUNE B., KALLASSY AWAD M., ABBOUD M.
Characterization of *Bacillus thuringienis* parasporal crystals using laser speckle technique: effect of crystals concentration and dimension (soumis au journal Applied Optics, référence 233815)

4- RAHBANI MONSEF J., SALAMEH D., BRANDAM C. and LTEIF R.
The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient K_La, on the fermentation kinetic of *Bacillus thuringiensis kurstaki* (en cours de préparation)

II- Communications orales

1- RAHBANI MOUNSEF J., SALAMEH D., BRANDAM C. and LTEIF R. (2014)
Evaluation of a cereal milling by-product for the low cost production of *Bacillus thuringiensis* in submerged fermentation
20ème Conférence internationale scientifique organisée par l'Association Libanaise pour l'Avancement de la Science (LAAS) et l'Ecole Doctorale « Sciences et Technologies » de l'Université Libanaise, en collaboration avec le Conseil National de la Recherche Scientifique (CNRS), Cité universitaire du Président Rafic Hariri (Hadath), Beyrouth, du 27 au 29 mars 2014.

2-RAHBANI MOUNSEF J., SALAMEH D., BRANDAM C. and LTEIF R. (2014)
Influence of aeration on process performance of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides production
10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences (10th ESBES) and the 6th International Forum on Industrial Bioprocesses (6th IFIBiop), Lille, France, du 7 au 10 septembre 2014

3-RAHBANI-MOUNSEF J., SALAMEH D., BRANDAM C., LTEIF R., Analysis of the effectiveness of a cereal milling byproduct for the low cost production of *Bacillus thuringiensis*. 16th European Congress on Biotechnology EICC, Edinburgh, Scotland du 13 au 16 juillet 2014, New Biotechnology 07/2014; 31:S142. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.05.1967

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans toutes les cultures agricoles modernes, l'amélioration des productions végétales d'intérêt économique passe par la lutte contre les ravageurs (ex : les limaces, les insectes…), contre les agents de maladies (Ex : virus, bactéries, champignons), et contre les mauvaises herbes. Pour cela, les producteurs ont jusqu'alors eu souvent recours à des produits chimiques de synthèse possédant des propriétés insecticides, fongicides, bactéricides et herbicides.

Une autre catégorie de produits de lutte regroupés sous le nom de biopesticides existe. Ce sont des préparations à base de bactéries, de virus, de protozoaires ou de champignons, qui sont biodégradables, à activité contre des insectes spécifiques, et sans effets secondaires sur l'environnement. En 2000, le marché global des biopesticides ne représentait que 1,5 % du total des pesticides. Actuellement ce marché a atteint 3,46 %. La popularité croissante des agents de lutte biologique réside dans leur effet létal beaucoup plus sélectif comparé aux produits chimiques synthétiques (Moser et Obrycki, 2009; Kristoff *et al*., 2010; Shah et Iqbal 2010; Eriksson et Wiktelius, 2011; Stevens *et al*., 2011) et également en raison du développement rapide de la résistance des insectes ravageurs aux insecticides synthétiques (Ahmad *et al*., 2008).

Bacillus thuringiensis est un bacille sporulé qui se caractérise par sa capacité à produire, au cours de la sporulation, des inclusions protéiques à structure cristalline appelées δ-endotoxines qui sont mortellement toxiques pour certains insectes. Avec leur effet spécifique sur différents insectes nuisibles appartenant aux ordres des coléoptères, diptères, hyménoptères et lépidoptères et pour certaines espèces non-insectes tels que les nématodes et les pucerons, les biopesticides à base de *B.thuringiensis* occupent une place centrale dans la lutte biologique. Ils représentent actuellement une alternative ou un complément aux pesticides chimiques pour des applications dans l'agriculture commerciale, la gestion des forêts et la lutte contre les moustiques. Ils sont aussi une importante source de gènes pour l'expression transgénique afin de transférer aux plantes la résistance aux ravageurs (Lord, 2005; Brar *et al*, 2006; Bravo *et al*., 2011 ; Jisha *et al*., 2013). Plus de 200 biopesticides à base de *B.thuringiensis* représentent 53 % du marché mondial des biopesticides commercialisés, générant des revenus annuels de 120 à 140 millions de dollars (CAB, 2010). La plupart des produits commerciaux de *B.thuringiensis* sont basés sur des préparations de spores-cristaux obtenus à partir d'un petit nombre de souches de type sauvage tels que :

- *B.thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) HD1 qui exprime les protéines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa et Cry2Ab ou HD73 qui produit Cry1Ac et qui sont efficaces pour contrôler de nombreux lépidoptères phyllophages, ennemis des cultures ou défoliants ravageurs forestiers;
- *B.thuringiensis* var. *aizawai* HD137 qui produit des toxines Cry légèrement différentes tels que Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca et Cry1Da et qui sont particulièrement actives contre les larves de lépidoptères qui se nourrissent de grains stockés;
- *B.thuringiensis* var. *san diego* et *B.thuringiensis* var. *tenebrionis*, qui produisent la toxine Cry3Aa et qui sont utilisés pour lutter contre les coléoptères nuisibles à l'agriculture;
- *B.thuringiensis israelensis* contenant Cry4A, Cry4B, Cry11A et Cyt1Aa, qui est utilisé pour le contrôle des moustiques pouvant être vecteurs de maladies humaines comme la dengue et le paludisme (Soberon *et al*., 2009).

Il existe pourtant de nombreuses autres souches de *B.thuringiensis* présentant une activité insecticide contre différents ordres d'insectes. Des études antérieures à notre projet ont permis d'isoler différentes souches de *B.thuringiensis* à partir du sol libanais. Les souches les plus toxiques ont été sélectionnées. Parmi celles-ci, une souche de *B.thuringiensis kurstaki* qui exprime les protéines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad et Cry2A, a montré une toxicité élevée contre les larves d'un lépidoptère *Ephestia kuehniella* comparée à la souche standard HD1. En effet, la CL 50 (concentration nécessaire pour atteindre 50 % de mortalité) de la souche locale a été 4 fois plus faible que celle de la souche HD1 (El Khoury *et al*., 2014). Cette souche de *B.thuringiensis kurstaki* semble ainsi être intéressante pour la production de biopesticides efficaces contre des lépidoptères.

L'objectif principal de ce travail consiste à réaliser les étapes devant mener à la production industrielle de la souche locale de *B.thuringiensis kurstaki*, pour en faire un biopesticide commercialisable au Liban. En effet, il existe un certain nombre d'avantages à faire une production locale de ces produits. Cela permet d'abord d'éliminer les coûts liés à l'importation. D'autre part, les problèmes d'instabilité des agents microbiens, qui sont le résultat de périodes

longues d'expédition et de températures de stockage variables, sont limités. Un autre avantage de la production locale est la formulation appropriée du produit à l'environnement local. En effet, il n'y a pas de formulation unique qui soit efficace pour toutes les conditions dans tous les pays. La proximité de l'appareil de production avec les lieux d'applications permet d'ajuster le produit suivant les résultats observés sur le terrain. La production locale de biopesticides, à base de *B.thuringiensis,* au Liban permettrait de fournir des formulations adaptées, avec des périodes de stockage plus courtes, nécessitant une plus faible exigence pour la durée de vie du produit.

Toutefois, assurer une capacité de production nationale, ne suffit pas. Il faut en même temps que le prix final du produit soit compétitif avec les insecticides chimiques disponibles dans le commerce. La contrainte pour la pénétration de ces produits sur le marché de l'agriculture libanaise, outre son efficacité évidemment, est d'arriver à le proposer à des coûts raisonnables aux utilisateurs. De façon générale, le coût de production des pesticides biologiques est élevé à cause du prix des substrats de fermentation qui représente 35 à 59 % du coût total dans un procédé conventionnel de production (Lisansky *et al.,* 1993; Stanbury *et al.,* 1995). L'une des problématiques de notre étude est donc la recherche d'un milieu de culture alternatif à moindre coût. Au coût du milieu de culture, s'ajoutent les frais liés à l'énergie utilisée au cours de la fermentation pour contrôler la température et fournir l'aération nécessaire aux micro-organismes. On visera à réduire ces frais en déterminant les conditions optimales pour la production du biopesticide en quantité maximale en un temps minimum. Un autre objectif de notre recherche sera le dimensionnement du passage de l'échelle de laboratoire à la production industrielle dans un fermenteur de 1000 L.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche entre l'Université Saint Joseph de Beyrouth et le département BioSym du laboratoire de génie chimique de Toulouse (France). Elle fait aussi partie d'un projet intitulé « Des biopesticides pour une alimentation plus saine au Liban » qui réunit 3 partenaires : ***arcenciel*** (association libanaise à but non lucratif, apolitique et non confessionnelle qui développe des programmes autour du développement durable de l'environnement), la Faculté des sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth, et le domaine de Tanail (un domaine agricole de la vallée de la Békaa au Liban).

L'ensemble des travaux réalisés pour atteindre les grands objectifs précédemment décrits est présenté dans ce document organisé en six chapitres.

Le premier, « Revue Bibliographique », montrera l'état de la connaissance sur les exigences nutritionnelles de *B.thuringiensis,* les effets des sources de nutriments et des paramètres de la fermentation sur les aspects cinétiques de la croissance et sur le rendement de la production, et la dépendance de ces effets par rapport à la souche utilisée. Des exemples de milieux synthétiques et de milieux alternatifs qui ont été testés par différents chercheurs pour la production de *B.thuringiensis* seront exposés. Une description des méthodes analytiques utilisées dans la bibliographie pour l'évaluation du produit *B.thuringiensis* et des méthodes de séparation des spores et cristaux sera aussi présentée.

Le second chapitre « Matériels et Méthodes » regroupera les techniques expérimentales, les méthodes analytiques et les produits chimiques et biologiques utilisés.

La partie « Résultats et Discussions » comportera les chapitres 3, 4, 5 et 6. Le chapitre 3 présentera la stratégie analytique adoptée pour évaluer le produit *B.thuringiensis* ainsi qu'une méthode de purification mise au point durant ces travaux pour une séparation rapide et efficace des spores et des cristaux de *B.thuringiensis*.

Le chapitre 4 présentera la mise au point d'un nouveau milieu de culture à base de son de blé qui est un sous-produit de l'agro-industrie disponible localement à faible coût. Le nouveau milieu sera comparé à des milieux semi-synthétiques de la bibliographie en termes de rendement relatif, productivité et coût dans des tests de production de différentes souches de *B.thuringiensis*.

Dans le chapitre 5, l'amélioration des conditions de fermentations sera présentée notamment en ce qui concerne les conditions d'aération. L'effet de ce paramètre sur la cinétique de croissance et de sporulation de la souche locale de *B.thuringiensis kurstaki* en relation avec la synthèse des δ-endotoxines sera étudié pour différentes concentrations de milieu.

Le chapitre 6 montrera les résultats des premiers essais de production dans le fermenteur de 1000 L et apportera des réponses sur la stabilité des inclusions cristallines obtenues lors de la conservation à différentes températures et sous l'effet des rayons UV. Un protocole de production à grande échelle sera aussi proposé dans ce chapitre.

Dans la dernière partie de ce manuscrit, intitulée « Conclusions et Perspectives », les principales observations et conclusions du travail seront exposées et enfin des nouvelles pistes d'études seront proposées.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. *Bacillus thuringiensis*

I.1.1. Histoire de *B.thuringiensis*

La bactérie entomopathogène *B.thuringiensis* a été le premier microorganisme homologué dans le monde comme biopesticide : les premières homologations datent des années 1960 aux Etats-Unis et des années 1970 en France. 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, 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 son activité était due à une toxine présente dans les cultures sporulées, mais pas dans les cultures de cellules végétatives (Beegle et Yamamoto, 1992). Le premier enregistrement de l'application de *B.thuringiensis* dans la lutte contre les insectes a été rapporté en Hongrie à la fin de 1920 et en Yougoslavie au début des années 1930. 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 (Neppl, 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. En 1950, la commercialisation de *B.thuringiensis* a commencé aux Etats-Unis. 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).

I.1.2. 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. Itoqou-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.

I.1.3. Caractéristiques générales de *B.thuringiensis*

B.thuringiensis, un membre du genre *Bacillus*, est une bactérie sporulante, flagellée, mobile, Gram positif et anaérobie facultative. A l'état végétatif *B.thuringiensis* a 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. *B.thuringiensis* est un membre du groupe *B.cereus* (*Bc)* qui comprend *B.cereus*, *B.anthracis* et *B.mycoides* (Helgason *et al*., 2000). 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). Cette inclusion cristalline peut représenter environ 25 % du poids sec de la bactérie. Elle est généralement composée de 95 % de protéines et 5 % de carbohydrates (Ellar, 1997). 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 ; Gonsalez *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).

1.1.4. 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. Ainsi, par exemple, parmi celles qui sont utilisées couramment dans les insecticides bactériens, il existe quatre sous-espèces principales : *B.thuringiensis* subsp *kurstaki* (H 3a3b3c) et *B.thuringiensis* subsp. *aizawai* (H 7) utilisés contre les lépidoptères nuisibles; *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* (H 14) utilisé contre les moustiques et les larves de simulies; et *B.thuringiensis* subsp. *morrisoni tenebrionis* (H 8a8b) utilisé contre certains parasites coléoptères tels que le doryphore. 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. Par exemple, au sein de la sous-espèce *B.thuringiensis* subsp. *morrisoni* (H 8a8b), il existe des isolats qui sont toxiques contre les lépidoptères, et/ou diptères, et/ou coléoptères. Indépendamment de la sous-espèce/serovariété, la seule façon d'être certain du spectre cible d'un nouvel isolat est de mener des bio essais contre toute une variété d'espèces d'insectes, et de les combiner avec les informations de séquençage, de clonage et de l'analyse des gènes codant pour les protéines insecticides (Federici *et al*., 2010).

I.1.5. Propriétés morphologiques de *B.thuringiensis*

B.thuringiensis forme des colonies blanches, mâtes et à bord dentelée, qui se multiplient rapidement sur un milieu gélosé (Figure I.1). Les spores de *B.thuringiensis* sont ovalaires, réfringentes ou brillantes (Figure I.2).



Figure I.1 : Colonies de *B.thuringiensis* formées sur un milieu T_3 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 I.2), 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).

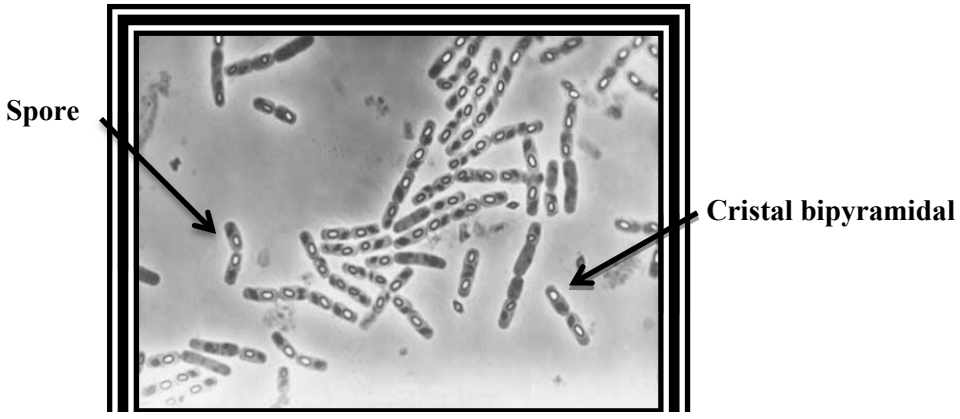


Figure I.2 : Photographie prise au microscope d'une culture de *B.thuringiensis kurstaki* au cours de la phase de sporulation (Lacoursière J.O. et Boisvert J. Université de Québec à Trois Rivières, 2004).

Parmi differentes 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.

I.1.6. Cycle de vie de *B.thuringiensis*

Le cycle de vie de *B.thuringiensis* (Figure I.3) 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). Pour les espèces de *Bacillus*, l'activité du cycle de l'acide citrique est critique pour réussir la sporulation. L'intérêt de ce cycle est de pouvoir maintenir les niveaux nécessaires d'adénosine 5'-triphosphate et d'éliminer certaines substances inhibitrices accumulées (Rutberg et Hoch, 1970). Les modèles radiorespirométriques ont montré que les systèmes oxydants de l'acétate sont présents dans *B. thuringiensis* et que les cellules de *B.thuringiensis* en phase de transition à la sporulation oxydent le pyruvate, l'acétate, le succinate, et le glutamate par des réactions du cycle de Krebs. La vitesse à laquelle l'acétate et le pyruvate sont oxydés par *B.thuringiensis* est nettement affectée par les conditions nutritionnelles (Bulla *et al*., 1971).

L'énergie nécessaire à la synthèse des inclusions cristallines est principalement assurée par l'hydrolyse de l'acide poly-6-hydroxybutyrique PHB qui s'accumule dans la cellule au début de la phase stationnaire. En effet, le métabolisme du PHB joue un rôle essentiel dans les processus de sporulation et le haut niveau d'expression des inclusions cristallines de protéines (ICP) dans *B. thuringiensis*. D'après Lui et Tzeng (2000), une concentration élevée de PHB peut améliorer le rendement des ICP. De même, Navarro *et al*. (2006) ont observé une relation linéaire entre la concentration finale des inclusions cristallines et la concentration maximale de PHB.

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.

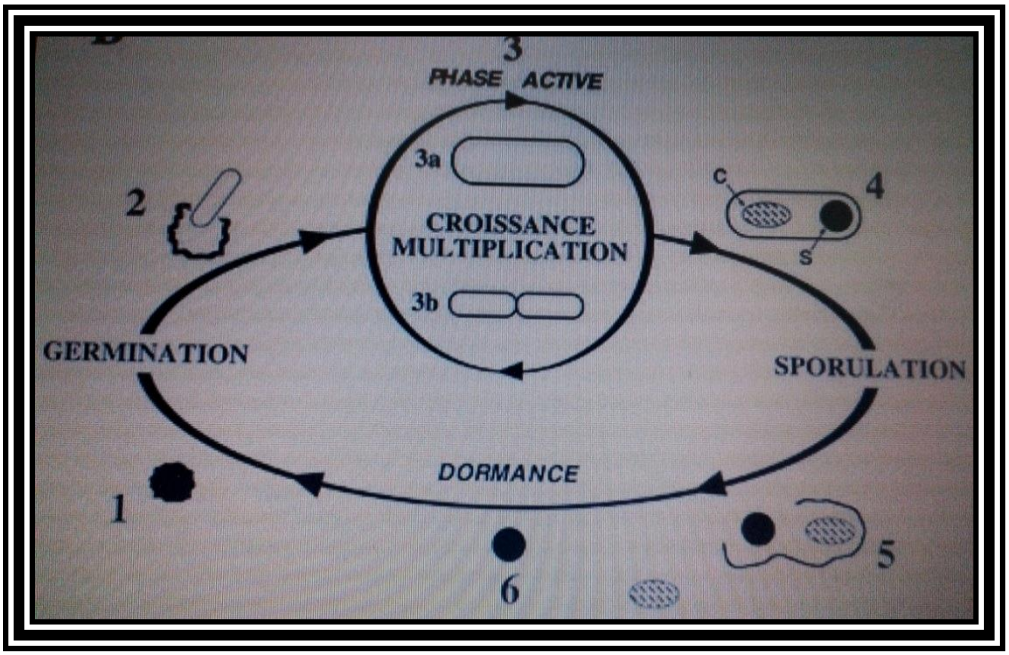


Figure I.3 : Schématisation du cycle vital de *B.thuringiensis* 1) germination : réhydratation de la spore, 2) germination : production de la cellule végétative, 3) croissance et multiplication des cellules végétatives, 4) sporulation : formation de la spore (s) et de l'inclusion cristalline (c), 5) lyse : éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et du cristal, 6) période de dormance : la spore résiste aux conditions défavorables (Lacoursière J.O. et Boisvert J. Université de Québec à Trois Rivières, 2004).

I.2. Toxines de *B. thuringiensis*

I.2.1. Toxines Cry et Cyt

Il existe deux types de protéines cristallines insecticides, Cry (pour le cristal) et Cyt (pour cytolytique). Le premier gène codant pour une δ-endotoxine a été entièrement séquencé en 1985 (Schnepf *et al*., 1985). Les gènes codant pour plus de 150 protéines Cry et 12 protéines Cyt ont été clonés et séquencés (Federici *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 (Agaisse et Lereclus, 1995). 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 (Schnepf *et al.*, 1998). La plupart des gènes *cry* sont localisés sur de grands plasmides de conjugaison. La comparaison des paires Cry+ et Cry$^-$ de différentes souches de *B.thuringiensis* a montré que chaque Cry$^-$ est dépourvu de l'un des plasmides de son homologue Cry+ (Gonzalez *et al*., 1981). Les différentes δ-endotoxines Cry ont été classées, sur la base de similitudes de séquences d'aminoacides comme suit : Cry 1, 2, 3, 4, etc. Ces classes sont composées de plusieurs sous-classes (Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc), qui sont elles-mêmes subdivisées en sous-familles (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc). La production de 760 types de protéines cristallines par *B.thuringiensis* a été rapportée. Ces protéines sont groupées en 72 classes Cry (723 sous-familles) et 3 classes Cyt (37 sous-familles) (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/; November, 2012). 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. Cependant, il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre le degré d'identité des protéines Cry et leur spectre d'activité. Les protéines Cry1Aa et Cry1Ac sont identiques à 84 %, mais seulement Cry1Aa est toxique contre les Bombyx mori. A l'inverse, Cry3Aa et Cry7Aa, qui sont identiques à seulement 33 %, sont actives toutes les deux contre le Colorado doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* (Sanchis etBourguet, 2008). La plupart des protéines Cry sont du type Cry1, une classe de molécules dans laquelle la grande majorité est toxique contre des insectes lépidoptères (Crickmore *et al*., 1998 ; Schnepf *et al*., 1998). Ces molécules sont typiquement dans une gamme de masse de 133 à 150 kDa. L'auto-assemblage de ces larges protéines est spontané à médiation principalement par l'extrémité C-terminale de la protéine. Leur extrémité

carboxyle riche en cystéine est hautement conservée, ce qui génère un certain nombre de ponts disulfures qui permettent la bonne conservation du cristal et la protection des toxines de l'attaque des protéases.

Les molécules Cry2, en fonction de la protéine spécifique, sont également toxiques contre des lépidoptères, mais certains, comme Cry2Aa, sont toxiques contre des lépidoptères et des diptères (larves de moustiques). Les masses des molécules Cry 2 sont environ deux fois plus faibles que celles des protéines Cry 1, de l'ordre de 65 kDa, et elles correspondent à la moitié N-terminale de Cry 1 (la partie de la molécule qui contient la protéine active). La cristallisation de ces protéines qui ne possèdent pas la moitié C-terminale nécessite la présence de protéines supplémentaires décrites comme protéines auxiliaires telles que l'Orf1 de 20 kDa et l'Orf2 de 29 kDa codées par les gènes orf1 et orf2 dans l'opéron Cry2A (Agaisse et Lereclus, 1995 ; Widner et Witheley, 1989 ; Barboza-Corona *et al*., 2012). Les protéines Cry3 sont similaires en masse aux protéines Cry2, mais elles sont seulement insecticides contre les coléoptères. L'autre grand type de protéines Cry utilisé dans les insecticides bactériens, les protéines Cry4, sont, comme les molécules Cry1, dans la gamme 135 kDa, mais sont toxiques contre les diptères nématocères (les moustiques et les mouches noires). Les études phylogénétiques ont montré que toutes les protéines Cry citées ci-dessus ont évolué au cours de millions d'années à partir de la même molécule ancestrale. Le spectre d'une sous famille de protéine, par exemple Cry1Ac, est toujours beaucoup plus étroit que celui de la classe, par exemple Cry 1, dans son ensemble. De plus, la toxicité de chaque sous famille de protéine Cry peut varier considérablement d'une espèce d'insectes à l'autre, même dans les cas où les espèces d'insectes sont étroitement liées. Par exemple, deux espèces de lépidoptères différentes de la famille des *Noctuidae* peuvent différer considérablement dans leur sensibilité à la protéine Cry1Ac, très sensible pour *Heliothis virescens*, à quasi insensible contre *Spodoptera exigua*.

Les protéines Cyt ont une masse de l'ordre de 26-28 kDa et n'ont phylogénétiquement rien à voir avec les protéines Cry (Crickmore *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998). Les acides aminés de ces 2 types de protéines ne sont pas significativement similaires. Les protéines Cyt ne sont que modérément toxiques contre les larves de moustiques et de mouches noires, et quelques espèces de coléoptères. Elles sont produites généralement par ce qu'on appelle sous-espèce mosquitocidale, comme *B.thuringiensis* subsp. *israelensis*.

I.2.2. Autres toxines de *B.thuringiensis*

En plus de la production de toxines insecticides durant la sporulation, certaines souches de *B.thuringiensis* produisent des protéines insecticides durant la phase végétative de croissance. Elles sont désignées comme des PIV, protéines insecticides végétatives, (Estruch *et al*., 1996). Ces PIV ne forment pas de protéines cristallines parasporales et 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, ß-exotoxines, hémolysines, entérotoxines, chitinases et phospholipases (Hansen et Salamitou, 2000). Les observations indiquent que les ß-exotoxines interfèrent avec les cellules en mitose. Il y a une réglementation stricte dans de nombreux pays pour limiter les ß-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 ß-exotoxines dans la lutte contre les coléoptères ravageurs, comme le dendroctone de cigarette et le doryphore, *Leptinotarsa decemlineata*.

I.3. Mode d'action de *B.thuringiensis*

I.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. Cependant, en raison du rôle majeur des protéines Cry, la plupart de ces autres facteurs ont été peu étudiés. Citons toutefois, parmi les plus importants, la spore elle-même, les exotoxines, les antibiotiques tels que la zwittermicine, les protéines insecticides végétatives, les phospholipases, les chitinases, et diverses protéases (Lui *et al*., 1998 ; Donavan *et al*., 2001 ; Lui *et al*., 2002 ; Yezza *et al*., 2006b). 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'hémolymphe 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. Chez la

plupart des espèces de lépidoptères, c'est la combinaison de l'effet de la protéine et de la colonisation et infection de la larve par *B.thuringiensis* qui est la cause de la mort. Ainsi, chez des espèces très sensibles, tels que les larves de lépidoptères de la famille *Pyralidae*, après paralysie due à l'intoxication par les protéines Cry, les spores germent dans l'intestin et les cellules végétatives envahissent la larve, colonisent l'hémolymphe et autres tissus, et se reproduisent dans une mesure telle que le cadavre devient pratiquement une culture pure de *B.thuringiensis*. Chez d'autres espèces, comme la plupart des espèces *Spodoptera*, la mort semble dépendre d'une combinaison de facteurs, comprenant des protéines Cry, Vip, ß-exotoxines, diverses enzymes qui aident à briser les barrières de l'intestin et l'infection par *B.thuringiensis* et d'autres bactéries présentes dans le lumen de l'intestin. Par exemple, la pathogénicité de *B.thuringiensis* contre les larves de *Agrotis ipsilon* et *Spodoptera frugiperda* a été sensiblement réduite quand le gène Vip 3 (codant une toxine protéique Vip 3 qui vise également les cellules épithéliales de l'intestin) a été supprimé (Donovan *et al*., 2001). Bien que ces facteurs soient importants pour l'activité insecticide de *B.thuringiensis*, quelque soit l'insecte cible, les protéines Cry sont les plus importantes des composantes présentes dans les formulations insecticides *B.thuringiensis* commerciales. En considérant la complexité des facteurs de toxicité de nombreux isolats *B.thuringiensis*, il semble que les différentes composantes autres que les protéines Cry permettent d'optimiser les chances de la bactérie à vaincre les défenses de l'hôte, tuer l'insecte, puis utiliser les insectes morts pour la reproduction (Federici *et al*., 2010).

I.3.2. Mode d'action spécifique des protéines Cry

Les cristaux d'endotoxines doivent être ingérés pour avoir un effet. C'est la raison pour laquelle les « insectes suceurs » et autres invertébrés comme les araignées et les acariens ne sont pas sensibles aux protéines Cry utilisées dans les insecticides *B.thuringiensis*. Après ingestion, les cristaux d'endotoxines doivent être activés. L'activation nécessite que les cristaux se dissolvent. Cela se produit dans des conditions alcalines, généralement dans les sucs digestifs du lumen de l'intestin, où le pH est de 8 ou supérieur. La plupart des invertébrés ont des intestins neutres ou légèrement acides. Dans les conditions très acides de l'estomac de nombreux vertébrés, y compris les humains, les cristaux de protéines Cry et Cyt peuvent se dissoudre, mais une fois en solution, ils sont rapidement dégradés en peptides non toxiques par les sucs gastriques,

généralement en moins de 2 minutes. Ceci explique la non toxicité de ces composés vis-à-vis de nombreuses espèces et notamment l'humain (Federici *et al*. 2010).

Pour les espèces sensibles, après dissolution dans le jus intestinal, les protéines Cry doivent être clivées aux deux extrémités C-terminale et N-terminale pour devenir actives. Une fois activée, la toxine doit se lier aux glycoprotéines ou "récepteurs" glycolipides sur les microvillosités de la membrane de l'intestin (Figure I.4). La plupart des « insectes broyeurs » qui ingèrent des cristaux de toxines, même ceux avec des intestins alcalins, dont de nombreux lépidoptères, n'ont pas les récepteurs appropriés, et donc ils ne sont pas sensibles aux protéines Cry activées. En effet, la molécule Cry activée nécessite généralement un arrangement spécifique de résidus de sucre sur le récepteur pour se lier de manière efficace. Par conséquent, même les insectes sensibles à une classe de protéines *B.thuringiensis*, tels que les larves de lépidoptères sensibles aux protéines Cry1, ne sont pas sensibles à des protéines Cry3 actives contre les coléoptères, ils manquent des récepteurs pour ceux-ci. Un haut degré de spécificité se retrouve également au sein de chaque ordre d'insectes sensibles. Par exemple, des larves de *Heliothis virescens* sont très sensibles à Cry1Ac (d'où son utilisation dans des plantes transgéniques telles que le coton *B.thuringiensis*), mais les larves de l'espèce *Spodoptera*, tels que le légionnaire de la betterave, *S.exigua* et *S. frugiperda,* le légionnaire d'automne, sont généralement insensibles à cette protéine. Cry1Ac est activée dans ces espèces, mais la liaison aux récepteurs est inefficace. Aucune liaison significative des protéines Cry n'a été détectée dans les cellules épithéliales de l'estomac des mammifères, ce qui protège les vertébrés d'un quelconque risque. Après liaison à des récepteurs de l'épithélium intestinal, la toxine doit pénétrer la membrane cellulaire et former des pores lytiques dans les microvillosités des membranes apicales (Bravo *et al*., 2007). Ceci nécessite un changement de la conformation et oligomérisation de la molécule Cry active. Les changements conformationnels spécifiques et les détails du processus d'oligomérisation qui doivent avoir lieu pour exercer la toxicité ne sont pas connus. On sait, cependant, que des liaisons irréversibles peuvent se produire dans certains insectes, mais ne conduisent pas à une toxicité. Cela suggère que d'autres phénomènes déclenchant la toxicité peuvent exister (Federici *et al*., 2010).

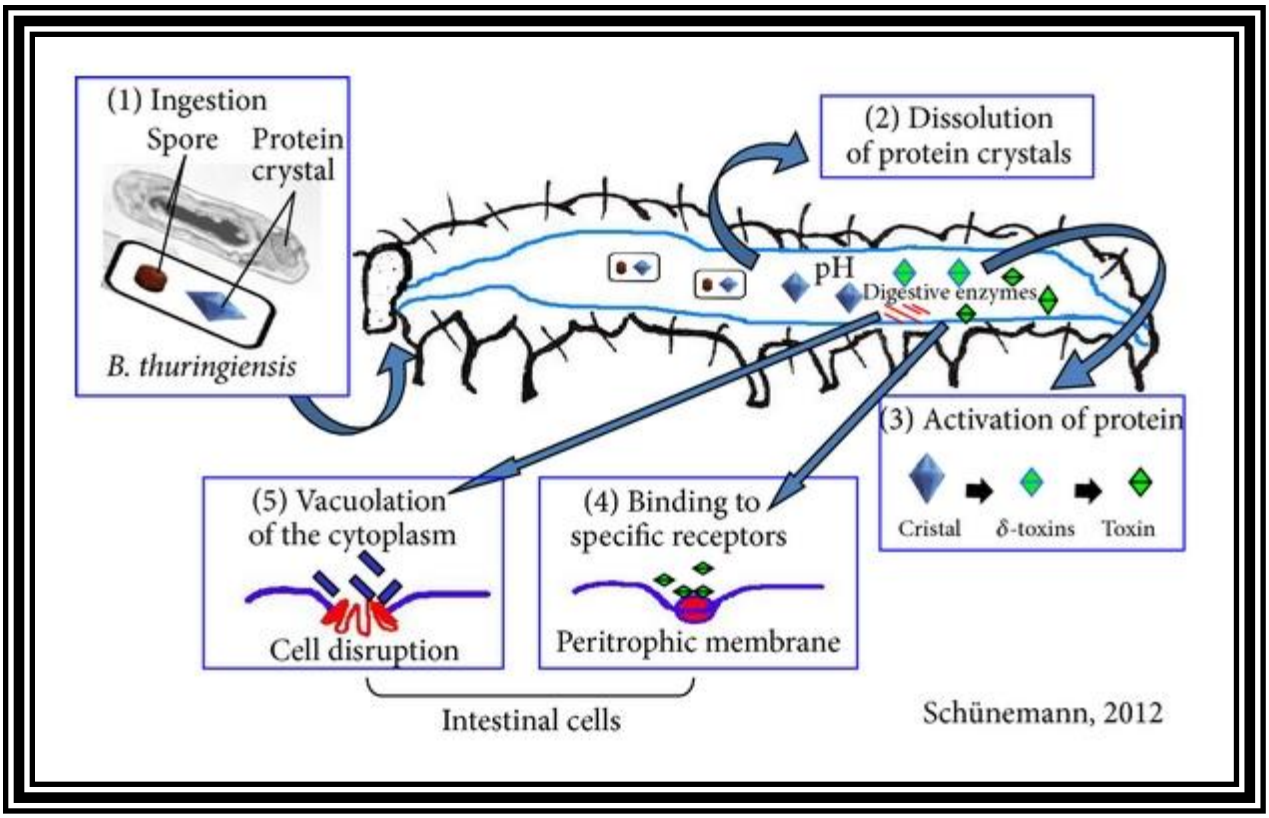


Figure I.4: Mode d'action de *B.thuringiensis* : ingestion du complexe spore/cristal (1); solubilisation des cristaux (2); activation des protéines (3); liaison des protéines aux récepteurs spécifiques (4); formation des pores de la membrane et lyse des cellules (5) (Schünemann, 2014).

I.4. Evaluation du produit *B.thuringiensis*

Depuis de nombreuses années, les chercheurs sur *B.thuringiensis* et ses applications biopesticides ont utilisé la concentration en spores pour évaluer la toxicité d'un produit. Les formulations commerciales de *B.thuringiensis* sont d'ailleurs normalisées vis à vis de ce critère. Cependant, la spore est, au mieux, un facteur secondaire dans la destruction des insectes. Le nombre de spores peut donner une bonne estimation de la croissance de *B.thuringiensis* dans une fermentation mais il ne permet pas de mesurer la toxicité d'une préparation (Enviromental Health Criteria, 1999; Paramatha, 2000). La méthode la plus correcte actuellement acceptée est le bio-essai qui permet d'estimer la toxicité de la souche de *B.thuringiensis* contre les larves d'une

espèce désignée d'insectes. Mais, le bio-essai nécessite des expérimentations difficiles nécessitant des insectes de différentes espèces. De plus l'obtention de résultats est longue. Ainsi une méthode analytique qui permet la mesure précise et rapide de la concentration des cristaux δ-endotoxines produits pendant la fermentation de *B.thuringiensis* est essentielle pour l'optimisation du processus de production. Elle permettrait d'avoir une information plus précise sur l'efficacité du produit que la determination de la concentration en spores mais sans toutefois avoir la même garantie qu'un bio-essai.

Parmi les méthodes analytiques utilisées dans la bibliographie pour l'estimation de la concentration des δ-endotoxines de *B.thuringiensis* on cite :

- Le dosage des protéines totales par une méthode spectrophotométrique telle que la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

  Cette méthode est précise mais elle détermine uniquement la concentration des protéines totales (fractions actives et inactives) et non pas la quantité réelle de protéines actives présentes dans le produit *B.thuringiensis* (Sundaram *et al*., 1995). De plus, les estimations portant sur un tel dosage peuvent être affectées par des impuretés protéiques et des composants non protéiques. Certains chercheurs ont calculé la teneur en toxines dans le bouillon de fermentation de *B.thuringiensis* comme le résultat de la soustraction des protéines totales obtenues par une souche acristallifère, utilisée en tant que contrôle négatif, des protéines totales obtenues par la souche productrice de toxines pour prendre en compte la contribution possible de protéines dissoutes de la paroi de spores, des débris cellulaires et des particules ou matières insolubles (Zouari *et al*., 2002;. Ghribi *et al*., 2004; Ben Kheder *et al.*, 2011).
- L'électrophorèse capillaire

  L'électrophorèse capillaire est une technique issue de l'électrophorèse sur gel. Elle est apparentée à la chromatographie liquide qui permet de séparer les composés selon leur charge. Elle sépare les composés au sein d'un capillaire de quelques dizaines de microns de diamètre rempli d'une solution électrolytique (tampon).

  Lui et Tzeng (2001) ont utilisé l'électrophorèse capillaire couplée à la détection UV pour déterminer la quantité de la protéine cristalline parasporale dans le bouillon de

fermentation de *B.thuringiensis*, après dissolution de la protéine par addition d'un agent dénaturant tel que le β-mercaptoethanol. Leur travail a montré que l'électrophorèse capillaire est un procédé rapide, efficace et plus commode que les méthodes conventionnelles.

- SDS PAGE/densitométrie

  La méthode consiste à séparer les protéines des δ-endotoxines des autres protéines du bouillon de fermentation par électrophorèse sur gel de dodécyle sulfate de sodium polyacrylamide. Les protéines des toxines sont ensuite quantifiées par balayage du gel et par densitométrie des bandes colorées obtenues (Brussock et Currier, 1990, English *et al*., 1994). La bovine sérum-albumine ou la protoxine homogène est utilisée comme standard (Baum *et al.*, 2004 ; Naimov *et al*., 2008).

- ELISA

  Il existe deux approches de développement de la méthode immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection et la quantification des protéines cristallines. La première consiste à produire des anticorps polyclonaux en utilisant des toxines purifiées comme antigènes pour immuniser des lapins (Kosir 1989). La seconde approche implique le développement d'une nouvelle lignée cellulaire d'hybridome produisant un anticorps monoclonal spécifique de la delta-endotoxine (Margaritis *et al*., 1993). Selon Andrews *et al.*(1980); Andrews *et al.*(1981), une très bonne corrélation existe entre la mesure des antigènes par les anticorps et la toxicité du produit *B.thuringiensis* contre les larves d'insectes.

- HPLC

  La chromatographie en phase liquide couplée à la détection UV a été utilisée pour identifier et doser les protéines cristallines de *B.thuringiensis* (Yamamoto, 1983 ; Rivera, 1998). Dans cette méthode, la préparation des échantillons à doser est critique. Elle doit être faite de façon à éviter la précipitation de la protéine à l'intérieur de la colonne chromatographique.

Il apparait que, parmi les méthodes analytiques déjà utilisées, aucune n'est parfaitement adaptée à la quantification des δ-endotoxines. Le dosage des protéines totales est précis, mais il permet la quantification des protéines totales et pas des endotoxines. SDS-PAGE/densitométrie implique la

détermination d'une fraction de toxine spécifique parmi les classes de δ-endotoxines et pas la concentration totale des δ-endotoxines. La commodité de l'électrophorèse capillaire pour l'analyse quantitative des δ-endotoxines a été prouvée, mais cette méthode n'a pas été souvent utilisée ce qui peut être attribué à la non-disponibilité de cet appareillage coûteux. Il y a un risque de précipitation des protéines dans la colonne chromatographique en utilisant l'HPLC pour la détermination de la concentration des δ-endotoxines. Enfin, le développement de la méthode immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection et la quantification des protéines cristallines des différentes souches de *B.thuringiensis* n'est pas simple.

I.5. Méthodes de séparation spores-cristaux

Les méthodes analytiques de dosage des cristaux de toxines dans le bouillon de fermentation, la caractérisation de la biochimie du cristal et les essais d'expression des gènes de *B.thuringiensis* par les plantes transgéniques exigent d'avoir des cristaux purs comme standards ou comme antigènes.

La purification de la protéine cristalline pour des fins analytiques constitue un défi en soit, car les propriétés physiques des spores, des débris cellulaires et des cristaux de protéines sont très semblables. La séparation des cristaux à partir des spores est très difficile de par la proximité de leurs densités 1,25 et 1,30 $g.cm^{-3}$. En outre, les spores hydrophobes ont tendance à s'agglutiner et à piéger les cristaux.

Plusieurs méthodes de purification des cristaux de toxines de *B.thuringiensis* ont été décrites. Généralement plus le degré de pureté requis est grand, plus le rendement des cristaux est faible. Les premières tentatives d'obtenir des cristaux purs comptaient sur la germination spontanée et l'autolyse des spores, suivie par des centrifugations différentielles répétées des cristaux (Cooksey *et al.*, 1971). D'autres techniques ont utilisé des systèmes diphasiques dans lesquels des émulsions de solvants organiques se forment, alors que les cristaux restent dans la phase aqueuse. Parmi les solvants employés, citons le trifluorotrichloroéthane (Angus, 1959), le tetrabromoéthane (Lecadet, 1970), le tétrachlorure de carbone (Pendleton et Morisson, 1966) et le chloroforme (Murray et Spenser, 1966). Le risque de modification du cristal par les solvants organiques est toujours présent. Ce risque a été éliminé par l'utilisation de systèmes diphasiques contenant du sulfate de dextran 500 et du polyéthylène glycol 6000, les spores entrant alors

préférentiellement dans les phases plus riches en polyéthylène glycol. Les rendements de cristaux purs obtenus par cette méthode peuvent varier avec la composition du mélange de départ. Typiquement, environ 250 mg de cristaux sont extraits à partir de 10 g de complexe spore-cristal. Les cristaux, purifiés et isolés de cette manière, conservent leur toxicité (Goodman *et al.*, 1967).

Plus tard, Fast (1972) a décrit une méthode de purification des cristaux employant la centrifugation sur un gradient de densité isopycnique en chlorure de césium CsCl, tandis que Sharpe *et al*. (1975) ont recommandé l'utilisation des gradients de Renografin. Ces deux méthodes peuvent donner des préparations de cristaux de grande pureté mais toutefois, des centrifugations multiples sont nécessaires pour atteindre une pureté acceptable, les rendements sont faibles, et le Renografin ainsi que le chlorure de césium sont coûteux.

Ang et Nickerson (1978) ont rapporté une méthode de centrifugation zonale isopycnique pour la purification à grande échelle des cristaux de protéines, employant des gradients de bromure de sodium NaBr dans une centrifugeuse Beekman J-21B équipée d'un rotor en titane JCF-Z 40-1900. Les rendements finaux de cristaux varient entre 15 et 20 %. Zhu *et al*. (1989) ont adopté la centrifugation à travers des gradients, par étapes, de Ludox. Une autre méthode utilisant la chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose a été décrite par Murty *et al*. (1994). Les spores et les débris cellulaires sont lavés avec des tampons d'acétate et de phosphate de sodium et les cristaux liés à la carboxyméthylcellulose sont élués avec du tampon Tris-EDTA. Profitant de l'hydrophobicité des spores, Pendleton et Morisson (1966) ont utilisé la capacité à faire de l'écume de leurs cultures pour éliminer environ 60 % de spores et récupérer jusqu'à 76 % des cristaux en 9 heures. Sharpe *et al*. (1978) ont trouvé que l'addition d'un agent moussant tel que la gélatine peut augmenter l'efficacité de ce processus. Ils sont arrivés à enlever avec la mousse plus de 90 % des spores d'une culture de *B.thuringiensis kurstaki* (HD1) avec cinq séparations consécutives en une heure. Un degré de pureté des cristaux de 85 % a été obtenu par un procédé de flottation et de décantation basé sur la faible différence de densité entre les spores et les cristaux (Rivera, 1998). Une technique simple a été décrite par Rao et Shethna (1980) pour la purification à grande échelle des cristaux de protéines de *B.thuringiensis* var *thuringiensis* (*B.t.t*). La méthode est basée sur la propriété d'agrégation préférentielle des cristaux et leur séparation ultérieure des spores dans une colonne contenant NaH_2PO_4 0,001 M, NaCl 0,4 M et

10 % de glycérol à pH 5,5. Dans cette technique la séparation des cristaux à partir des spores dépend du pH, de la présence de chlorure de sodium dans le milieu de culture ainsi que dans la solution tampon de la colonne et de la présence des débris cellulaires dans le mélange de cristaux et spores. Bien que cette méthode ait partiellement réussie avec quelques souches, d'autres souches n'ont pas montré le phénomène d'agrégation des cristaux dans les mêmes conditions. Différentes espèces de *B.thuringiensis* peuvent nécessiter des conditions différentes pour que le phénomène d'agrégation des cristaux ait lieu. La non-applicabilité de ces conditions pour toute espèce de *B.thuringiensis* peut-être due à des différences dans la structure, la conformation et les antigènes de surface des cristaux des différentes espèces. Finalement, la stratégie la plus couramment utilisée reste celle décrite par Thomas et Ellar (1983), dans laquelle les spores et les cristaux de *B.thuringiensis* sont séparés en utilisant l'ultracentrifugation sur un gradient discontinu de saccharose (67, 72, 79 % [poids/vol] de saccharose) (Ito *et al*., 2004 ; Kubota *et al*., 2006 ; Krishman *et al.*, 2010; Alotaibi, 2012; Rolle, 2013).

I.6. Milieux de culture de *B.thuringiensis*

Pour réduire le coût de production de *B.thuringiensis*, il est nécessaire d'augmenter le rendement ou l'efficacité de la production des toxines (Schnepf, 1995). Les études systématiques sur les exigences nutritionnelles de *B.thuringiensis*, en particulier celles qui sont nécessaires pour obtenir un rendement maximal de protéines cristallines insecticides, sont limitées. Les meilleures conditions de production des protéines Cry et des spores peuvent être différentes même si la sporulation et la formation de toxines ont lieu simultanément au cours de la fermentation (Yang and Wang, 2000). L'optimisation de la production de *B.thuringiensis* ne doit pas se baser sur la concentration des spores obtenue mais sur la quantité de Cry synthétisée. Des différences considérables dans les rendements en δ-endotoxines sont obtenues en fonction du milieu de culture ainsi que des conditions de la fermentation (Perani et Bishop, 2000 ; Alves *et al*., 1997). L'optimisation des paramètres de la fermentation pour chaque souche de *B.thuringiensis* mise en production commerciale est nécessaire car différentes souches peuvent avoir des réponses différentes aux conditions de culture et un milieu de culture qui favorise la croissance d'une souche peut être moins satisfaisant pour une autre (Dulmage, 1989; Kaur, 2000). Goldberg *et al*.

(1980) ont indiqué que les milieux soutenant une croissance élevée de cellules végétatives peuvent ne pas être adéquats pour la sporulation. Ils ont également observé que la croissance végétative vigoureuse n'a pas toujours été suivie d'une bonne sporulation. En outre, la synthèse des composés de la toxine peut être affectée quand aucune phase de croissance exponentielle n'est observée.

I.6.1. Sources de nutriments

I.6.1.1. Carbohydrates

B.thuringiensis est capable de fermenter une variété de carbohydrates comprenant le glucose, le fructose, l'amidon, le maltose, le tréhalose, et le ribose. Récemment, des souches de *Bacillus thuringiensis* montrant des activités cellulases et xylanase ont été isolées (Ginicy *et al.*, 2011; Agustini *et al.*, 2012). Le glucose stimule la croissance des cellules de *B.thuringiensis* et peut augmenter le rendement en cellules mais il peut aussi inhiber la formation des spores, d'où la nécessité de trouver un compromis entre ces deux propriétés du métabolisme des carbohydrates (Dulmage, 1989). Scherrer *et al*. (1973) ont montré que l'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu de culture basal a impliqué une augmentation de la taille et de la toxicité des cristaux de δ-endotoxines. Mais la concentration excessive de glucose peut prolonger la croissance végétative et aussi minimiser le rendement en toxine. La présence d'une source de carbone directement assimilable dans le milieu de croissance peut réprimer l'expression de certains gènes et opérons indirectement liés à la formation de la toxine (Brückner et Titgemeyer, 2002). Une répression catabolique, appelée effet de glucose, est provoquée par l'augmentation des concentrations de glucose. Des concentrations de substrat de 10 $g.L^{-1}$ ont été utilisées dans la plupart des études de fermentation, bien que des concentrations plus élevées aient été testées dans quelques cas. L'inhibition de la synthèse des proténes provoquée par l'exposition de cellules de *B.thuringiensis* à des concentrations élevées de glucose a été rapportée par de nombreux auteurs. La limite de la concentration de glucose qui peut être utilisée dans la production de *B.thuringiensis* dépend de la souche de *B.thuringiensis* et des conditions de la fermentation. Par exemple, Bhatnagar. (1998) a montré que la toxine Cry4A de *B.thuringiensis israelensis* n'a pas été synthétisée lorsque le milieu contenait plus de 0,4 % de glucose. Pour *B.thuringiensis galleriae*, il a été observé que les concentrations de glucose de l'ordre de 28 $g.L^{-1}$ conduisent à une production maximale de la biomasse, mais l'augmentation de la concentration du substrat

jusqu'à 35 $g.L^{-1}$ aboutit à une population hétérogène (des cellules végétatives, cellules sporulées et des spores libres) (Anderson and Jayaraman, 2003). Holmberg *et al*. (1980) ont rapporté que la haute concentration des éléments nutritifs a inhibé la croissance de *B.thuringiensis*, et a nuit à la sporulation et à la synthèse de la toxine. Selon les auteurs, la concentration du substrat ne doit pas dépasser 23 $g.L^{-1}$. Amin *et al*. (2008) ont trouvé que la culture de *B.thuringiensis kurstaki* a donné des concentrations de spores bactériennes et de protéines cristallines beaucoup plus faibles à 90 $g.L^{-1}$ qu'à 50 $g.L^{-1}$ de glucose. Arcas *et al*. (1987) ont rapporté que la limite de la concentration totale des solides (CTS) pour une fermentation optimale de *B.thuringiensis kurstaki* avec un pH non contrôlé a été de 112,5 $g.L^{-1}$ de CTS équivalent à 56 $g.L^{-1}$ de glucose. Chez Farerra *et al*. (1998), des niveaux de CTS jusqu'à 150 $g.L^{-1}$ ont pu être utilisés dans la production de *B.thuringiensis kurstaki* HD-73 avec une bonne productivité des protéines Cry si, au cours de la fermentation, le pH est maintenu à 7,4 ± 0,2 et la concentration de l'oxygène dissous au-dessus de 20 %.

Le glucose a été considéré par certains auteurs comme le carbohydrate le plus approprié pour la production du biolarvicide *B.thuringiensis* (Sachidanandham *et al*., 1997 ; Vora and Shethna, 1999), mais d'autres sources de carbone, comme le saccharose et le maltose, ont permis la croissance de certaines variétés de *B.thuringiensis* (Sachidanandham *et al*., 1997). Icgen *et al*. (2002 b) ont constaté que des sources de carbone telles que le saccharose, le lactose et l'inuline soutiennent la production des toxines Cry1 et Cry2 de *B.thuringiensis* 81. Le remplacement du glucose par du saccharose a augmenté considérablement les rendements des toxines Cry4Ba et Cry11A (Özkan *et al*., 2003).

L'effet des monosaccharides (glucose, fructose et galactose) et des disaccharides (saccharose, lactose et maltose) en tant que sources de carbone sur la croissance et le taux de sporulation de *B.thuringiensis* MPK13 ainsi que sur la production des δ-endotoxines a été étudié par Mazmira *et al*. (2012). Les taux de croissance et de sporulation les plus élevés ont été obtenus en utilisant le glucose et le saccharose. Le fructose, le galactose, le lactose et le maltose ont été également en mesure de soutenir la croissance, mais non pas un taux de sporulation élevé. La présence de l'endotoxine ayant un poids moléculaire de 130 kDa a été détectée uniquement après 48 h de culture avec 8 $g.L^{-1}$de glucose comme seule source de carbone. Bien qu'une bonne croissance et

une production élevée de spores aient été obtenues en culture avec un mélange de glucose (4 $g.L^{-1}$) et d'autres sucres, aucune endotoxine n'a été produite dans ces cas-là.

I.6.1.2. Azote

L'azote intervient dans la synthèse des protéines cellulaires, des enveloppes des spores et dans la synthèse des acides nucléiques (Icgen *et al*., 2002 b, Pearson et Ward, 1988). L'épuisement de la source d'azote est l'élément déclencheur de la sporulation de *B.thuringiensis* et de l'expression de la toxine (Yang and Wang, 2000). La nature des sources d'azote et d'acides aminés affecte de manière significative la production du bio-insecticide (Zouari *et al*., 1998). Des composés azotés inorganiques, comme le sulfate d'ammonium ne sont généralement pas suffisants pour soutenir la croissance de *B.thuringiensis* et des sources d'azote organiques telles que la peptone de viande, la farine de poisson et la farine de soja sont nécessaires pour une croissance rapide (Yang et Wang, 2000). *B.thuringiensis* exige certains acides aminés ou peptides qui sont essentiels pour sa croissance. Les acides aminés utilisés pour la synthèse de la protéine cristalline proviennent en grande partie des protéines végétales préexistantes dans le milieu. Une expérience de radio marquage a indiqué que 80 % des protéines du cristal sont synthétisés à partir des acides aminés libérés pendant le renouvellement des protéines qui se produit au cours de la sporulation (Monroe, 1961; Gong *et al*., 2012.). La croissance de *B.thuringiensis* dans un milieu minimal glucose-sels n'a été observée qu'après supplémentation du milieu par le citrate, l'aspartate ou le glutamate à une concentration minimale de 0,4 mM. L'addition du fumarate, succinate, ou oxaloacétate au milieu de culture n'a abouti à la croissance d'aucune souche de *B.thuringiensis* parmi 18 testées (Nickerson et Bulla, 1974). La cystéine et l'acide aspartique sont nécessaires pour la synthèse des δ-endotoxines (Arcas *et al*., 1984). Aronson (1976) a indiqué que le glutamate et l'alanine prédominent parmi les acides aminés libres à tous les stades de croissance de *B.thuringiensis*, ce qui prouve leur rôle important dans le métabolisme de l'azote. La croissance de *B.thuringiensis* a été faible quand la caséine a été utilisée en tant qu'une source d'acides aminés (Pearson et Ward 1988, Zouari *et al*., 1998). Parmi les différents composés de l'azote organique et inorganique testés par Içgen *et al*. (2002b), la peptone s'est révélée la meilleure source assurant une production optimale des endotoxines Cry1 et Cry 2.

I.6.1.3. Potassium et phosphate

Le potassium est nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes, y compris celles qui interviennent dans la synthèse protéique. Wakisaka *et al*. (1982) ont détecté une augmentation de la production de la protéine cristalline en présence de sels de potassium. Cependant, lorsque les sels de potassium étaient remplacés par les mêmes sels de sodium, le même effet n'a pas été observé.Aussi Foda *et al*. (1985) ont montré une relation entre la production et l'utilisation de l'acide poly hydroxy butyrique (PHB), qui joue un rôle essentiel dans les processus de sporulation et le haut niveau d'expression des inclusions cristallines de protéines, et le métabolisme de K^+.

Le phosphate agit comme régulateur dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires et il stimule la production des δ-endotoxines (Gupta *et al*., 2002). Bhatnagar (1999) a rapporté une augmentation de l'ARNm spécifique Cry4A en présence de phosphate inorganique, ce qui a stimulé la synthèse de la protoxine 135 kDa par les cellules de *B.thuringiensis israelensis*. Le phosphate est considéré comme essentiel, non seulement pour l'expression de protéines, mais pour la croissance cellulaire et sa concentration varie au cours de la phase de formation de la toxine (Yang et Wang, 2000). Des rendements élevés de δ-endotoxines anti lépidoptères et anti diptères ont été obtenus avec des concentrations de phosphate inorganique de 50 à 100 mM (Icgen *et al*., 2002a ; Özkan *et al*., 2003). L'addition d'une concentration élevée de phosphate de 200 $mmol.L^{-1}$ a augmenté la production de Cry 3Aa toxique contre les coléoptères de 3 à 15,6 $\mu g.L^{-1}$ (Kurt *et al*., 2005).

I.6.1.4. Minéraux

Cinq ions métalliques (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}) sont considérés comme particulièrement importants pour la croissance et la sporulation de *Bacillus* (Dulmage, 1989). Le manganèse est nécessaire pour une sporulation efficace. Vu que les promoteurs des gènes Cry sont généralement liés à la sporulation (Aronson, 1993), la production du cristal augmente quand le manganèse est ajouté au milieu. Sikdar *et al*. (1991) ont montré que le fer, le manganèse et le cuivre sont nécessaires à de faibles niveaux pour la production des endotoxines de *B.thuringiensis israelensis* alors que le molybdenum a un effet inhibiteur. Dans l'étude de Icgen *et al*., 2002a, le rendement de la toxine a été presque nul lorsque Mg a été omis du milieu indiquant que Mg était l'oligo-élément le plus critique pour la synthèse des protéines Cry anti

lépidoptères par *B.thuringiensis* 81. L'effet stimulateur de Cu a été observé dans la gamme 10^{-6}-10^{-7} M. Ca et Zn n'avaient aucun effet sur la production des toxines. Cependant, Ca a favorisé et Zn, Fe et Cu ont influencé négativement la synthèse des toxines anti diptères par *B.thuringiensis israelensis* HD500 (Özkan *et al*., 2003).

I.6.2. Rapport C:N

L'équilibre entre les sources de carbone et d'azote est nécessaire pour éviter des valeurs de pH inférieures à 5,6 ce qui peut affecter la croissance des cellules et le nombre final de spores obtenu (Dulmage *et al*., 1990). Un milieu avec un rapport C:N de 7,5 a donné lieu à un plus grand rendement de croissance ($Y_{X/S}$, g biomasse/g substrat) et une plus grande consommation de glucose, par rapport à des proportions C:N égales à 5 ou 11. Cependant, l'influence de C:N sur le rendement en biomasse a diminué pour un transfert d'oxygène élevé (K_La plus de 120 h^{-1}) (Anderson, 1990).

Farrera *et al*. (1998) ont utilisé de la farine de soja et du glucose pour réaliser un plan d'expériences composite centré pour tester des rapports C:N allant de 3 à 11 et des niveaux de CTS (concentration totale des solides) de 60 $g.L^{-1}$ à 150 $g.L^{-1}$ pour la production de *B.thuringiensis kurstaki* (HD-73). Les milieux avec un C:N de 7 ont donné le rendement relatif le plus élevé par rapport à la production de Cry pour toute valeur de CTS. Le nombre de spores a été plus élevé à faible rapport (C:N = 4) et CTS élevée (près de 150 $g.L^{-1}$). Une augmentation de 2,5 fois de la CTS a entraîné une production six fois plus importante de protoxine à un rapport C:N=7.

Vidyarthi *et al*. (2002) ont réalisé diverses combinaisons de boues primaires (riches en carbone) et des boues secondaires (riches en azote) dans le but de contrôler le rapport C:N. Les résultats qu'ils ont obtenus ont confirmé l'hypothèse de Sachdeva *et al*. (2000) qui postule que le ratio C:N joue un rôle important dans la croissance, la sporulation et le pouvoir entomotoxique de *B.thuringiensis*.

I.6.3. Milieux Synthétiques

A l'échelle du laboratoire, des milieux synthétiques contenant les sources de nutriments précédemment citées sont généralement utilisés pour les cultures de *B.thuringiensis*. Des exemples de milieux synthétiques et semi synthétiques, utilisés pour la culture de différentes souches de *B.thuringiensis,* sont groupés dans le tableau I.1.

Tableau I.1. Exemples de milieux synthétiques de culture de *B.thuringiensis*

Composition du milieu de culture	**Souche de *B.thuringiensis***	**Références**
Milieu basal : $MgSO_4.7H_2O$ 0.3g.L^{-1}; $MnSO_4.H_20$ 0.05 g.L^{-1}; $CaCl_2$ 0.08 g.L^{-1}; $ZnSO_4.7H_20$ 0.005 g.L^{-1}; $CuSO_4.5H_20$ 0.005 g.L^{-1}; $FeSO_4.7H_20$, 0.0005 g.L^{-1}; K_2HPO_4 0.5 g.L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g.L^{-1}; glucose 1.0 g.L^{-1} supplémenté de citrate, glutamate ou aspartate	18 souches différentes de *B.thuringiensis*	Nickerson et Bulla, 1974
Milieu Arcas : glucose 10 g.L^{-1}, extrait de levures 4 g.L^{-1}, KH_2PO_4 3 g.L^{-1}, K_2HPO_4 3 g.L^{-1}, $MgSO_4.7H_2O$ 4 g.L^{-1}, $MnSO_4.H2_O$ 0,03 g.L^{-1} ; $CaCl_2.2H_2O$ 0,041 g.L^{-1}	*B.thuringiensis kurstaki* HD-1	Arcas *et al*., 1984
Milieu Anderson : Glucose 9.77 g.L^{-1}; Yeast extract 4.62 g.L^{-1}; Bacto peptone 4.62 g.L^{-1}; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g.L^{-1}; KH_2PO_4 3.4 g.L^{-1}; K_2HPO_4 4.15 g.L^{-1}; $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 g.L^{-1}; $CaCl_2.2H_2O$ 0.106 g.L^{-1}; Fe-Citrate 0.075 g.L^{-1}; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.0075 g.L^{-1}; $CuSO_4$ 0.0045 g.L^{-1}; $MnSO_4.7H_2O$ 0.05 g.L^{-1}.	*B.thuringiensis var. kurstaki* HD-1	Anderson, 1990 ; Rivera, 1998 ; Amin *et al*., 2008
Milieu Luria Bretani : tryptose 10 g.L^{-1}, extrait de levures 5 g.L^{-1} ; NaCl 10 g.L^{-1} supplémenté de sels ($FeSO_4$, ZnSO4, $MnSO_4$, $MgSO_4$) et 0,2 % de glucose	*B.thuringiensis tolworti*	Valicente *et al*., 2010
Milieu NYSM : glucose 10 g.L^{-1}; peptone 5 g.L^{-1}; beef extract, 3.0 g.L^{-1}; extrait de levures 0.5 g.L^{-1}; $CaCl_2.2H_2O$ 0.102g.L^{-1} ; $MnCl_2.4H_2O$ 0.01g.L^{-1} ; $MgCl_2.6H_2O$ 0.203g.L^{-1}	*B.thuringiensis israelensis*	Prabakaran *et al*., 2008, Socco *et al*., 2009 ; Poopathi et Abidha, 2009, Prabakaran et Balaraman, 2006

I.6.4. Milieux alternatifs

Pour une industrialisation de la production de biopesticides à base de *B.thuringiensis*, des études sur les milieux de culture sont essentielles afin de combiner efficacité et faibles coûts. Ainsi, de nombreux déchets ou sous-produits agro-industriels ont été testés en tant que sources d'éléments nutritifs pour la formulation des milieux de culture de *B.thuringiensis*. Dans chaque cas, le choix du substrat a été justifié par son coût, sa disponibilité locale et sa capacité à produire les δ-endotoxines. Le tableau I.2 regroupe des exemples des milieux alternatifs qui ont été évalués pour la production de *B.thuringiensis.*

Tableau I.2 : Exemples de milieux de culture alternatifs de *B.thuringiensis*

Composition du milieu de culture	**Souche de *B.thuringiensis***	**Résultats**	**Référence**
Touraillons 30 $g.L^{-1}$, glucose 10 $g.L^{-1}$, sels de phosphate 3 $g.L^{-1}$	*B.thuringiensis kurstaki* HD-1	$2,1.10^9$ spores/mL	Arcas *et al*., 1984
- Petit lait de fromage 50 %, lait de la farine de soja 10 %, molasses de canne à sucre 0,5 % (WSM). - Protéine de farine de soja (Samprosoy 90) 5 %, molasses de canne à sucre 0,5 % (SPM) - Ground bombyx mori pupae 15 %, molasses de canne à sucre 0,5 % (BMM)	*B.thuringiensis. kurstaki serotype H : 3a ±3b*	Les trois milieux ont été comparés à un milieu de référence NBY (nutrient broth + yeast extract). Spores et cristaux ont été produits dans tous les milieux étudiés mais la toxicité du produit final la plus élevée a été obtenue pour le milieu NBY alors que le plus faible coût a été pour le milieu BMM	Alves *et al*., 1997
Hydrolysat de gruau (15 $g.L^{-1}$ sucres totaux), sulfate d'ammonium 5,4 $g.L^{-1}$, extrait de levures 5 $g.L^{-1}$	*B.thuringiensis kurstaki* BNS3	Une concentration de 1 $g.L^{-1}$ de δ-endotoxines	Zouari *et al*., 1998

Boues d'eaux usées	*B.thuringiensis. kurstaki HD-1*	La toxicité obtenue dans une boue secondaire était comparable à celle obtenue dans un milieu à base de farine de soja, l'utilisation de la phase liquide de la boue a abouti à un faible potentiel entomotoxique	Montiel *et al*., 2001
2,5 % farine de soja (*Glycine max*) + 1 % solution de sel ($MgCl_2$ 20,3 g ; $CaCl_2$ 10,2 g/L ; $MnCl_2$ 1,0 g/L)	*B.thuringiensis israelensis* (VCRC B-17)	CL 50 8,89 ng/mL contre *Culex quinquefasciattus*	Prabakaran and Balaraman, 2006
Bouillon d'eau de coco préparé en ajoutant 1 % d'une solution de sel ($MgCl_2$ 20,3 g ; $CaCl_2$ 10,2 g ; $MnCl_2$ 1,0 g/L) à 100 ml d'eau de noix de coco	*B.thuringiensis israelensis* (VCRC B-17)	Masse sèche, concentration de spores et CL 50 comparables à celles obtenues dans le milieu NYSM	Prabakaran *et al*., 2008
Lisier de porc 4 % (m/v), glucose 0,2 % (m/v)	*B.thuringiensis tolworti* 344	Toxicité contre S. frugiperda comparable à celle obtenue dans un milieu LB + 0,2 % glucose + sels	Valicente *et al*., 2010
2,5 % (m/v) Farine d'orge, farine de soja, 1 % d'une solution de sel ($MgCl_2$ 20,3 g ; $CaCl_2$ 10,2 g ; $MnCl_2$ 1,0 g/L)	*B.thuringiensis. kurstaki* HD-1	Un rendement de toxines de 9,58 ±0.32 mg/10^8 spores (une valeur qui n'est pas significativement différente de celle obtenue quand la farine d'orge a été remplacée par l'amidon)	Shojaaddini *et al*., 2010
Plumes d'oiseau + son de riz déshuilé	*B. thuringiensis israelensis*	Concentration de protéines toxiques supérieure à celle obtenue dans le milieu NYSM	Poopathi et Abhida, 2009

Plumes d'oiseaux + poudre de gâteau de noix de coco Cocos nucifera	*B.thuringiensis israelensis H-14 (IPS-82)*	Toxicité satisfaisante contre des larves de moustiques, rendement en biomasse supérieur à celui obtenu dans le milieu de référence LB	Poopathi et Archana, 2012
Milieu basal + 10 $g.L^{-1}$ glucose + 0.5 $g.L^{-1}$ pois d'angole + 0.5 $g.L^{-1}$ farine de Soja	*B.thuringiensis* sv2	CL 50 < 4 ppm contre les larves d'Aedes *aegypti,* résultat comparable à celui obtenu dans un milieu LB	Devidas *et al*., 2014

Dans chaque cas, le choix du milieu de culture a été justifié par la faisabilité économique du projet qui est variable suivant les pays. Dans la plupart des milieux de culture cités, des sous-produits ou des déchets de l'agro-industrie ont été utilisés comme sources de protéines mais des compléments en carbohydrates (glucose, molasses) et/ou sources de minéraux ont été ajoutés au milieu.

I.7. Conditions de fermentations

Les études menées par différents chercheurs ont démontré que les conditions du procédé peuvent influencer sensiblement la production du complexe cristal-spore de *B.thuringiensis* (Abdel-Hameed *et al.*, 1991; Avignone-Rossa et Mignone, 1995; Ejiofor, 1991). Les effets des voies métaboliques sur la production des protéines Cry dépendent des conditions de croissance (Deng *et al*., 2014). Les changements dans les conditions de fermentation induisent différentes voies métaboliques dans *B.thuringiensis* qui lui permettent de modifier son rapport ATP: ADP: AMP, sa réserve de matériaux de stockage d'énergie et son équilibre de coenzymes oxydés et réduits (Rowe et Margaritis, 1994; Rodriguez et De la Torre, 1996). L'augmentation de la disponibilité de l'ATP lors de la phase de sporulation et l'excès d'énergie qui en résulte, affectent positivement la production des protéines Cry.

Les paramètres de la fermentation qui jouent un rôle important dans la production de *B.thuringiensis* sont le pH, la température et la concentration en oxygène dissous.

I.7.1. Conditions d'aération

L'alimentation en oxygène est un paramètre déterminant pour la fermentation de *B.thuringiensis*. Le transfert d'oxygène est fonction du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_La). Ce dernier est l'un des facteurs les plus importants pour la mise à l'échelle du procédé. Les paramètres qui affectent les valeurs de K_La dans un réacteur de type cuve agitée sont regroupés dans le tableau I.3.

Tableau I.3. Effets de certains paramètres sur le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène K_La

Paramètres	Effets sur K_La	Références
Viscosité	K_La dépend de la viscosité du milieu de culture. Il diminue quand la viscosité augmente	Ozbek et Gayik, 2001
Température	La diffusion de l'oxygène augmente avec l'augmentation de la température. K_La augmente de 15 % quand la température de l'eau passe de 20 °C à 30 °C.	Doran, 1995, Ferreira, 2010
Sels	Les fortes concentrations en sels font baisser les valeurs de K_La.	Imai *et al*., 1987
Vitesse d'agitation et taux d'aération	K_La augmente avec la vitesse d'agitation et le taux d'aération.	Abdel-hameed, 2001
Taille des particules	K_La augmente avec la taille des particules du solide en suspension.	Ozbek et Gayik, 2001
Vélocité superficielle	K_La augmente significativement pour un accroissement de la vélocité superficielle du gaz. Les petites bulles d'air ont une vitesse d'ascension à la surface plus lente et restent donc plus longtemps dans le liquide accordant plus de temps à l'oxygene pour se dissoudre.	Juarez et Orejas, 2001
Anti-mousse	L'antimousse peut affecter la tension de surface. Une baisse de la tension de surface fait baisser K_La.	Parakulsuksatid, 2000

Plusieurs articles ont été publiés sur l'effet de l'aération sur la croissance, la sporulation et la production de cristaux pour différentes souches de *B.thuringiensis*, mais les résultats ont été parfois contradictoires. Les cultures de *B.thuringiensis* HD-133 cultivées à un ratio du volume de culture/ au volume du ballon de 0,1, 0,2 et 0,33 ont eu une croissance légèrement plus élevée que celles cultivées à un ratio de 0,05, mais le temps de lyse complète des cellules sporulées a été plus grand pour les cultures de 0,1 à 0,33 que celui des cultures de 0,05 (Morris *et al*., 1996). Par contre, la production de biomasse obtenue dans des cultures de *B.thuringiensis* HD-1 pour un ratio volume de culture/volume de ballon de 0,2 et 0,3 a été plus élevée par rapport à un ratio de 0,4 (Keshavarzi *et al*., 2005). Avignone-Rossa *et al*. (1992) ont étudié la production de spores et de cristaux de *B.thuringiensis israelensis* H-14 dans différentes conditions d'aération (flux d'air fixe et vitesse d'agitation variable). Dans les cultures limitées en O_2 où les valeurs maximales des taux de transfert d'oxygène (OTRmax) ont été de 3,1 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$ et 7,2 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$, les concentrations des δ-endotoxines et le nombre de spores ont été significativement plus faibles que ceux obtenus dans les cultures où il n'y avait pas limitation en oxygène (OTRmax : 14,9 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$ à 48,4 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$). Maldonado-Blanco *et al*. (2003) ont montré également que les poudres les plus toxiques de *B.thuringiensis israelensis* ont été produites avec des combinaisons de la vitesse d'agitation et du taux d'aération qui maintiennent la concentration du dioxygène dissous au-dessus de 26 %.

Dans des cultures Fed batch sous concentration constante en oxygène de 20 % pendant 24 h puis en mode batch pour plus de 24 heures à différentes valeurs d'OTR (0, 20, 100 et 250 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$), Sarrafadeh et Navarro (2006) ont étudié l'effet de l'oxygène sur la phase de sporulation de *B.thuringiensis* H 14. Le taux de sporulation élevé (100 %) a été observé en l'absence d'oxygène alors qu'une inhibition partielle de la sporulation mais une toxicité améliorée ont été obtenues dans des conditions d'aération excessive. De même, en maintenant la concentration en dioxygène dissous à 50 % au cours de la phase végétative et la phase de transition et ensuite en élevant l'oxygène dissous à 100 % de saturation tout au long de la sporulation et la lyse cellulaire, Boniolo *et al*. (2012) ont augmenté la toxicité d'une souche standard de *B.thuringiensis israelensis* (IPS-82).

Par contre, dans des procédés semi-continus combinés avec des processus batch pour la sporulation, Da Silva *et al*. (2011) ont rapporté une augmentation de 53,6 % dans la sporulation

de *B.thuringiensis israelensis* IPS 82 dans des conditions aérées, mais la toxicité a été environ quatre fois plus élevée dans des conditions non aérées. Ghribi *et al*. (2006) ont observé une baisse du rendement de spores, mais une amélioration de la synthèse des δ-endotoxines par une souche de *B.thuringiensis kurstaki* BNS3, lorsque 60 % et 70 % de saturation en oxygène ont été assurées au cours des 6 premières heures, avec une chute subséquente de 40 % jusqu'à la fin de la fermentation.

Ces différences entre les conditions optimales d'aération, pour la production des δ-endotoxines, rapportées par différents auteurs peuvent être expliquées par le fait que plusieurs facteurs, autres que l'alimentation en oxygène, peuvent affecter la production des protéines cristallines tels que la souche de *B.thuringiensis*, la température, le pH, les sources de carbone et d'azote et le rapport C:N.

I.7.2. Température et pH

La température optimale de croissance des cellules de *B.thuringiensis* est dans une plage comprise entre 28 et 32 ºC (Dulmage *et a1*.,1990). Pour une souche de *B.thuringiensis* modifiée génétiquement, la température optimale de la culture a été de 28 ºC. En-dessous, le temps de fermentation et la demande en oxygène de la culture augmentent (Yang and Wang, 2000).

En ce qui concerne le pH, la production des cristaux insecticides est favorisée par des valeurs entre 6,5 et 7,5 (Sikdar *et al*., 1991). Pour la sporulation des bactéries, elle est réduite à un pH supérieur à 7,6 et elle est inhibée sous un pH de 5,5 (Salama *et al*., 1983 ; Morris *et al*., 1996). Par ailleurs, Braun (2000) a observé plus de spores à pH neutre qu'à pH 6 ou 8.

I.8. Etude cinétique de la fermentation de *B.thuringiensis*

La détermination des constantes cinétiques fiables de la croissance des cellules de *B.thuringiensis* est une tâche difficile en raison de limitations dans les procédures connues de laboratoire pour mesurer la biomasse et les concentrations de substrat et également en raison de la réponse dynamique des cellules dans différentes conditions environnementales (Rivera, 1998). Peu d'informations sont disponibles au sujet de certains aspects physiologiques et cinétiques du processus de fermentation impliquant ce micro-organisme (Molina *et al*., 2008).

I.8.1. Phases de croissance

L'épuisement de l'un des nutriments essentiels, tels que le glucose, l'azote ou le phosphate peut engager la sporulation massive de *B.thuringiensis*, un processus qui implique des changements majeurs de la membrane cytoplasmique et la construction d'une enveloppe protectrice autour de l'ADN de la cellule, avec un arrêt du métabolisme normal de la cellule (Aubert *et al*., 1961; Schaeffer *et al.*, 1965; Stragier et Losick 1996). Au niveau cellulaire, la sporulation a été décrite comme un processus en sept étapes (Figure I.5):

- Stade I : formation du filament axial

- Stade II : formation du septum de la préspore (la zone du cytoplasme destinée à être incorporée dans la préspore est appelée préspore naissante (Bulla *et al*., 1980)).

- Stade III : engloutissement, première apparition des cristaux et formation d'une préspore. (Betchel et Bulla, 1976).

- Stades IV à VI : formation de l'exosporium, de la paroi primordiale de la cellule, du cortex et de la tunique des spores accompagnée d'une transformation du nucléotide de la spore et d'une augmentation de la réfringence et de la résistance à la chaleur. Le cristal est presque en pleine taille au moment où l'exosporium apparaît (stade IV) (Bechtel et Bulla, 1976).

- Stade VII : maturation des spores, lyse des sporanges et libération de la spore.

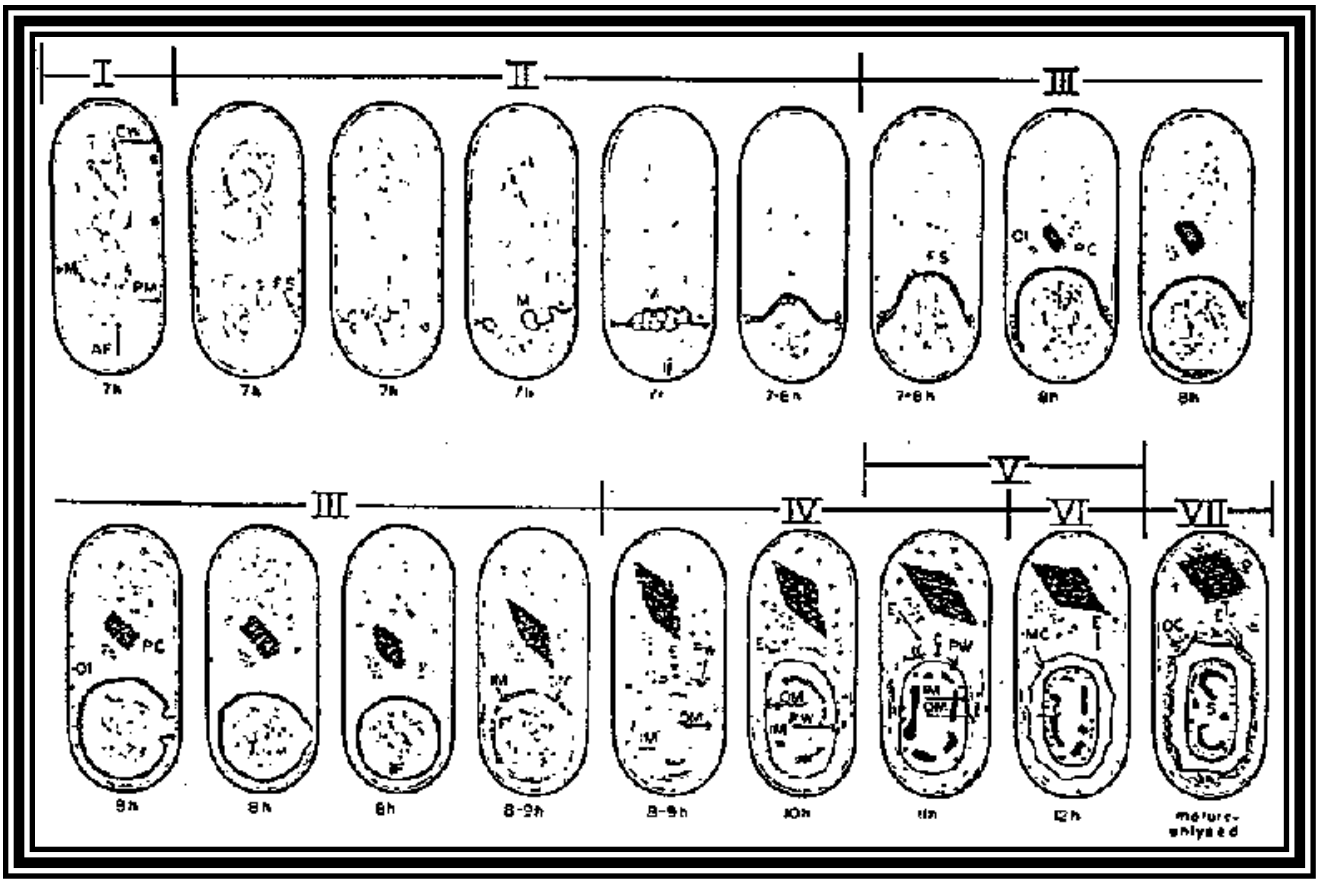


Figure I.5. Diagramme de sporulation de *B.thuringiensis kurstaki* (Bulla *et al*., 1980)

Dans le troisième stade de la sporulation, la membrane cytoplasmique se déchire partiellement pour séparer le compartiment de la pré-spore (Piggot *et al*., 1994). Cette transformation est irréversible, elle pourrait être considérée comme le véritable moment du début de la sporulation. La protéine cristalline est produite principalement lors des phases III (engloutissement de la pré-spore) et IV (formation du cortex). Les processus de formation des protéines des spores et cristaux sont découplés, puisqu'il a été constaté que ces protéines sont codées par des gènes différents et synthétisées par différents ARNm (Luthy *et al*., 1982, Andrews *et al*., 1987). La perception des stades de la sporulation dépend de la technique appliquée pour suivre la culture. Les spores deviennent réfringents seulement après la quatrième étape de la sporulation, ainsi l'estimation de la sporulation à l'aide d'un microscope à contraste de phase n'est pas possible avant ce stade. La permittivité en ligne a permis de distinguer, au cours de la fermentation de

B.thuringiensis H14 en culture Fed batch, trois phases : une phase de croissance rapide jusqu'à 14 h où seules les cellules végétatives ont été présentes dans la culture, une phase de croissance lente entre 14 et 24 h. Durant cette phase le nombre des cellules végétatives est resté presque constant tandis que le nombre total des cellules a continué à augmenter et les cellules sporulées ont commencé à apparaître. Les spores mûres ont pu être observées après la 18ème heure, bien que leur libération ait eu lieu principalement pendant la phase de déclin qui a commencé avec l'arrêt de l'alimentation du substrat. En revanche, la densité optique en ligne, et les mesures de la biomasse et du poids secs n'ont révélé que deux phases : la croissance et le déclin (Sarrafzadeh *et al*, 2005).

L'étude de la cinétique de croissance de *B.thuringiensis israelensis* sur des concentrations élevées de glucose a montré que, indépendamment de la concentration initiale en glucose, en se basant sur les profils de croissance microbienne et les changements de morphologie des cellules, le procédé de fermentation peut être divisé en quatre phases distinctes :

Phase I, la croissance végétative, où seules les cellules végétatives sont présentes, isolées ou disposées en paires et en chaînes, avec une taille uniforme et une grande mobilité,

Phase II, la transition vers la sporulation, caractérisée par des cellules plus courtes et isolées avec moins de motilité et le début de la floculation,

Phase III, la sporulation, où une floculation intense se produit et de grands agrégats se forment,

Phase IV, la maturation des spores et la lyse des cellules et à ce stade il y a disparition des agrégats et lyse cellulaire (Silveira et Molina, 2005; Molina *et al.*, 2008).

Farrera *et al*. (1998) ont rapporté une désynchronisation des cellules de *B.thuringiensis* à fortes concentrations de solides totaux (CST) dans le milieu de culture. Toutes les cellules n'étaient pas dans la même phase: certaines étaient en train de sporuler tandis que d'autres libéraient des spores matures et même des spores germaient. Une forte concentration d'azote aminé tandis que le glucose est toujours disponible, à sporulation précoce, pourrait provoquer une telle désynchronisation. Pour différentes CST, les durées de la phase exponentielle ont été comparables (respectivement 14, 13 et 10 h pour 150, 105 et 60 g.L^{-1}), tandis que le temps total de la fermentation a diminué avec la diminution des CST (38, 28 et 22 h respectivement), à cause

de la rapidité de la sporulation et de la libération des spores. La comparaison des modes de sporulation d'un type sauvage et d'une souche de *B.thuringiensis* ADNr a montré que la souche dont la sporulation a été précoce avait un nombre final de spores plus faible (Lui et Tzeng, 2000).

I.8.2. Taux de croissance

Le taux de croissance spécifique, μ, des micro-organismes unicellulaires qui se reproduisent par fission binaire de la cellule, est définie par l'équation suivante:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

où X est la concentration de la biomasse.

La production des cellules et des spores de *Bacillus* dépend de la vitesse de croissance spécifique (μ) du micro-organisme, qui, à son tour, dépend de la concentration des nutriments disponibles dans la culture, la température, le pH et l'oxygène dissous ainsi que de l'état métabolique.

En général, la croissance végétative de *B.thuringiensis* est caractérisée par une augmentation exponentielle avec un taux de croissance élevé suivie d'une croissance non exponentielle en raison de l'épuisement du substrat. D'autre part, la formation des spores et des cristaux de protéines cause une diminution du taux de croissance de la biomasse, ce qui réduit la concentration finale en biomasse. La réduction du taux de croissance cellulaire pendant la formation de la spore est due à la diminution de l'énergie nécessaire pour exécuter la fission binaire (Anderson *et al*, 2002; Rivera, 1998; Valdez *et al*, 2001; Molina *et al*., 2008). Sakharova *et al*. (1985) ont observé un autre modèle de croissance lorsque *B.thuringiensis* a été cultivé dans un milieu complexe: un taux spécifique de croissance élevé et pas d'assimilation de glucose au début de la phase exponentielle de croissance, suivie par une chute brutale de μ et le début d'une assimilation intensive du glucose du milieu puis une nouvelle hausse du taux de croissance spécifique. Ils ont expliqué ces changements du taux spécifique de croissance au cours de la phase végétative par le fait que la culture a assimilé d'abord les composants de l'extrait de levure puis a commencé à assimiler le glucose et l'ammonium. Anderson et Jayaraman (2003) ont

montré que l'influence de l'extrait de levures sur le taux de croissance spécifique de la culture batch *B.thuringiensis* est plus importante que celle du glucose. Avec une concentration élevée d'extrait de levures, des taux de croissance spécifiques relativement élevés ont été obtenus à des niveaux élevés et faibles de glucose. Ces taux de croissance spécifiques élevés sont justifiés par la consommation de l'extrait de levures comme source de carbone pour la synthèse de la biomasse.

Des chercheurs ont rapporté des valeurs du taux maximal de croissance de *B.thuringiensis* qui varient dans une large gamme (de 0,4 à 1,9 h^{-1}) (Avignone-Rossa et Mignone, 1995; Rodriguez-Monroy et De la Torre, 1996). Cette variation peut être due à des différences des souches, des matières premières et des conditions de culture utilisées (Amin *et al*., 2008). Le taux de croissance spécifique maximal (μ_{max}) n'a pas été affecté pour des concentrations initiales de glucose allant jusqu'à 75 $g.L^{-1}$ (1,0 à 1,1 h^{-1}), mais des concentrations plus élevées de glucose ont conduit à l'inhibition de la croissance par le substrat, révélée par une réduction des valeurs de μ_{max}. Ces concentrations plus élevées ont retardé la sporulation (Molina *et al.*, 2008). Un taux de croissance spécifique maximal élevé ne favorise pas nécessairement la sporulation et la synthèse des inclusions protéiques (Anderson et Jayaraman, 2003). Les données comparatives de taux de croissance spécifique maximal, taux de sporulation spécifique maximal et entomotoxicité obtenus dans trois milieux de culture (TSY, milieu à base de soja et milieu à base de boues des eaux usées) ont montré que la plus grande entomotoxicité et le taux maximal spécifique de sporulation le plus élevé ont été obtenus dans le milieu à base de boues alors que le taux maximal spécifique de croissance obtenu dans ce milieu a été le plus faible en comparaison avec les deux autres milieux (Vidyarti *et al*., 2002). Un taux de croissance spécifique plus élevé (0,31 h^{-1}) a été obtenu dans une culture utilisant le saccharose, en comparaison avec une culture utilisant le glucose (0,17 h^{-1}). Contrairement à la croissance, le nombre final de spores obtenu a été plus élevée dans le milieu contenant du glucose (9,8 x 10^{11} spores/ml) par rapport à la culture avec du saccharose (7,1 x 10^{11} spores/ml) (Mazmira *et al*., 2012).

I.8.3. Variation de pH

Les changements de pH pendant la fermentation dépendent de la composition du milieu utilisé. La diminution rapide du pH qui caractérise la croissance végétative reflète l'accumulation d'acides organiques (acide pyruvique et acide acétique) produits par le métabolisme du glucose.

Les cellules en phase de transition vers la sporulation oxydent les acides organiques; ainsi le pH augmente pendant cette phase (Yousten et Rogoff, 1969; Nickerson *et al.*, 1974; Bulla *et al.*, 1969; Luthy *et al.*, 1982; Mignone et Avignone-Rossa, 1996). Une fermentation typique de *B.thuringiensis*, avec un équilibre entre les sources de sucres produisant des acides et les sources de protéines produisant des substances alcalines, va commencer à un pH de 6,8-7, puis chute rapidement à 5,8- 6 et augmente de façon constante par la suite, jusqu'à des valeurs proches de 8 (Dulmage *et al.*, 1989; Rivera, 1998 ; Amin *et al.*, 2008; Soccol *et al.*, 2009). La Figure I.6 montre la variation du pH au cours de la fermentation de *B.thuringiensis kurstaki* dans différents milieux de culture (milieu TSY, milieu à base de farine de soja, et milieu à base de boues) (Vidyarthi *et al*., 2002).

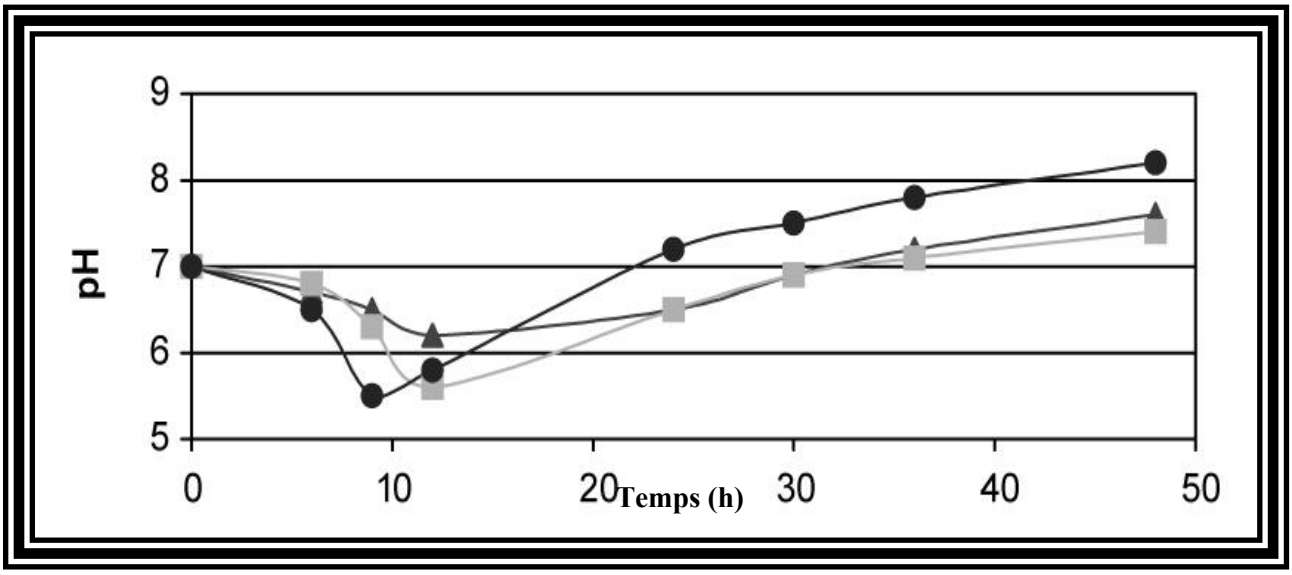


Figure I.6. Variation du pH au cours de la fermentation de *B.thuringiensis kurstaki* dans différents milieux de culture ● Milieu à base de boues ▲ Milieu TSY ■ Milieu Soja (Vidyarthi *et al*., 2002)

I.8.4. Vitesse d'absorption d'oxygène

Au cours de la phase végétative, les cellules de *B.thuringiensis* consomment les substrats et nécessitent de grandes quantités d'oxygène (Nickerson *et al.*, 1974; Bulla *et al.*, 1969; Luthy *et al.*, 1982). Les schémas de l'évolution de la concentration de dioxygène dissous (DO) et du taux d'absorption d'oxygène (OUR) au cours de la fermentation de *B.thuringiensis* indiquent un fort

métabolisme respiratoire de *B.thuringiensis* à partir de la fin de la phase de latence. Les valeurs d'OUR augmentent dans la phase exponentielle pour atteindre un maximum après le début de la décélération de la phase de croissance. Une diminution progressive et prononcée des valeurs d'OUR est observée le long de la phase de transition, indiquant des besoins en oxygène plus petits pour la culture. Un niveau minimum de (OUR) est atteint lors de la phase de maturation des spores et la lyse cellulaire (Rivera *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2008; Amicarelli *et al.*, 2010). Dans une culture batch de *B.thuringiensis israelensis* avec une concentration initiale en glucose de 30,8 $g.L^{-1}$, une valeur maximale d'OUR de 57 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$ a été atteinte après environ 5 h de culture.

Dans une culture batch de *B.thuringiensis kurstaki* dans le milieu Anderson le taux de consommation spécifique d'oxygène (taux de respiration) QO_2 a atteint une valeur maximale au début de la phase exponentielle de croissance. Il a diminué par la suite avec le temps pour atteindre sa valeur minimale au début de la phase stationnaire (Figure I.7) (Rivera, 1998). Rowe *et al*., (2003) ont observé une diminution de QO_2 de 8-10 $mmol.g^{-1}.h^{-1}$ à 1 h après l'inoculation à moins de 2 $mmol.g^{-1}.h^{-1}$ par le temps la croissance est terminée.

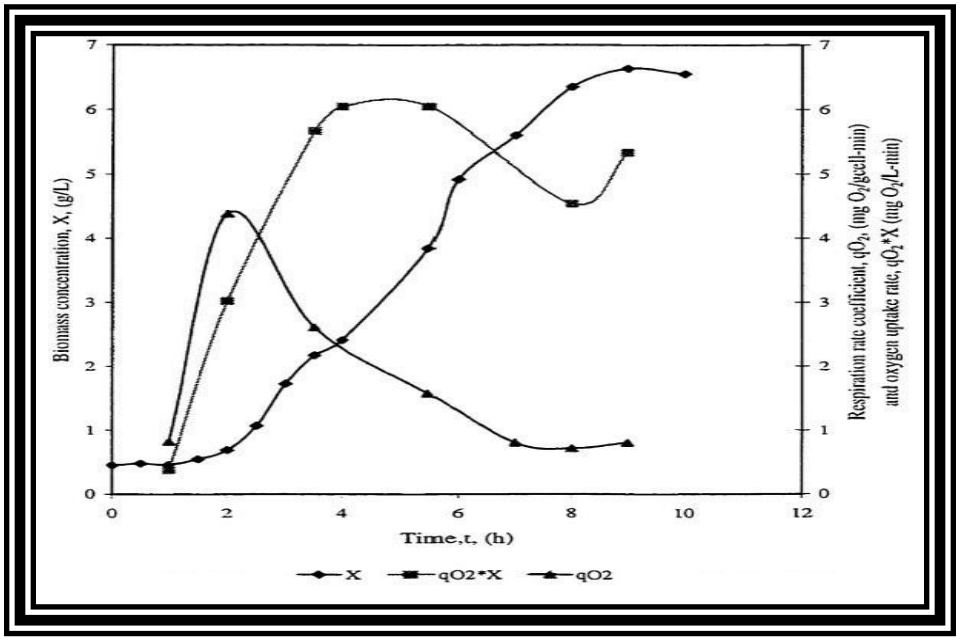


Figure I.7. Variation de la biomasse, du taux d'absorption de l'oxygène et du taux spécifique de consommation de l'oxygène dans une culture batch de B.thuringiensis kurstaki dans un milieu Anderson (Rivera, 1998).

I.8.5. Consommation de substrat

Dans les fermentations en Batch de *B.thuringiensis,* un flux équilibré d'éléments nutritifs est nécessaire. Dans différentes cultures en Batch de *B.thuringiensis galleriae* à différentes concentrations de glucose et d'extrait de levures, après sporulation, une quantité significative de glucose non consommé a été observée dans les milieux où les concentrations initiales d'extrait de levures étaient faibles. Le taux d'utilisation de glucose a augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de levures. En corollaire, l'augmentation de la concentration initiale des sources de carbone et d'azote a entrainé une diminution du rendement en produit par rapport à la quantité consommée du substrat ($Y_{P/S}$). La valeur minimale de $Y_{P/S}$ a été obtenue pour les conditions qui ont donné la densité cellulaire maximale, montrant clairement une orientation du flux métabolique vers la production de la biomasse au détriment de la synthèse des inclusions cristallines. Par ailleurs, avec une faible concentration de glucose, l'augmentation de la concentration de l'extrait de levures a abouti à une diminution significative du rendement en produit par rapport à la biomasse obtenue $Y_{P/X}$, ce qui indique que la culture sous la limitation de la source de carbone a utilisé la source d'azote pour sa croissance (Anderson et Jayaraman, 2003).

Pour une concentration initiale en glucose (S_0) variant de 10 à 152 $g.L^{-1}$ dans des milieux de fermentation de *B.thuringiensis israelensis*, des concentrations équivalentes de la biomasse (Xm = 15,2 à 15,9 $g.L^{-1}$) ont été obtenues pour S_0 inférieure à 30,8 $g.L^{-1}$, avec augmentation de la quantité du substrat résiduel, ce qui suggère une limitation de certains autres éléments nutritifs et l'utilisation de glucose pour former d'autres métabolites. Avec l'augmentation de S_0 de 30,8 à 152 $g.L^{-1}$, le rendement en cellules ($Y_{X/S}$) a diminué de 0,58 à 0,41 g/g. Seulement pour S_0 = 10 $g.L^{-1}$, la croissance a été limitée par le substrat, et $Y_{X/S}$ a atteint sa valeur maximale (0,83 g/g) (Molina *et al*, 2008.).

Pour une concentration de glucose de 20 $g.L^{-1}$ pendant la production de bio-insecticide par *B.thuringiensis kurstaki*, le glucose a été entièrement consommé mais 20 % de la matière première (glucose) a été perdue dans la formation de sous-produits (Amin *et al.*, 2008).

Molina *et al*. (2008) ont montré que durant la phase de transition de la croissance de *B.thuringiensis israelensis*, les valeurs des taux de consommation spécifiques du substrat diminuent de façon continue.

I.9. Conclusions

Suite à cette revue bibliographique, il apparait que les biopesticides à base de *B.thuringiensis* sont les agents de contrôle biologique les plus largement utilisés. En raison de leur haute spécificité et de leur innocuité pour les organismes non-cibles et pour l'environnement en général, leur commercialisation présente un grand intérêt. Malgré une biodiversité très riche de l'espèce, finalement peu de souches de *B.thuringiensis* ont donné lieu à des applications commerciales de biopesticides. Les nouvelles souches isolées sur le sol libanais présentent des toxicités élevées en laboratoire et pourraient s'avérer plus efficaces que les produits commerciaux existants, à condition de parvenir à les produire de façon industrielle. Pour cela, l'optimisation des paramètres de la fermentation et des milieux pour chaque souche est nécessaire car différentes souches peuvent avoir des réponses différentes aux conditions de culture. Il est donc indispensable de déterminer ces conditions pour les nouvelles souches. Les points importants de la bibliographie à retenir pour cet objectif sont que :

- **La nature et la concentration des substrats ainsi que les paramètres de la fermentation peuvent induire différentes voies métaboliques chez *B.thuringiensis* et sont particulièrement importants pour obtenir un rendement maximal de δ-endotoxines.**

- **Il est évident que l'aération joue un rôle clé dans la fermentation de *B.thuringiensis* bien que les effets rapportés sur la croissance, la sporulation et la production des δ-endotoxines soient parfois contradictoires.**

- **Dans la plupart des milieux de culture alternatifs utilisés pour la production de *B.thuringiensis*, des déchets ou des sous-produits de l'agro-industrie ont été utilisés comme source de protéines et ils ont été supplémentés par des carbohydrates (glucose, molasses) et/ou des minéraux.**

- **Peu d'informations sur les aspects cinétiques de croissance de *B.thuringiensis* sont disponibles et les données de la littérature suggèrent que l'effet des conditions opératoires et de la composition du milieu sur la cinétique de la fermentation est très dépendant de la souche utilisée.**

Par ailleurs, il est apparu également au travers cette synthèse que des outils méthodologiques et/ou analytiques manquent pour :

- **Caractériser simplement et rapidement la toxicité du biopesticide à base de *B.thuringiensis*.**

- **Purifier rapidement des cristaux de *B.thuringiensis* sans avoir besoin d'équipements et de réactifs coûteux. De plus, en raison de la différence de tailles entre les cristaux des différentes espèces, une méthode de séparation des spores et cristaux convenable pour une espèce ne l'est pas forcément pour une autre.**

Les travaux réalisés et présentés dans la suite de ce document se sont attachés à prendre en compte ces éléments pour déterminer les conditions de production industrielle d'un biopesticide issu de la fermentation de souches de ***B.thuringiensis.***

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Cultures de *B.thuringiensis*

II.1.1. Les souches de *B.thuringiensis*

Deux souches de *B.thuringiensis* isolées à partir du sol libanais ont été utilisées. La première souche est enregistrée comme Lip^{MKA} et désignée par « Lip » dans ce document. Elle s'est montrée quatre fois plus toxique contre les larves d'un lépidoptère *Ephstia.kuehniella* que la souche standard de *B.thuringiensis kurstaki* HD1 (El Khoury *et al*., 2014). Elle produit des cristaux bipyramidaux ainsi que quelques cristaux cubiques. La deuxième souche est enregistrée comme H_3^{MKA} et désignée par « H_3 ». Elle se caractérise par la production de cristaux sphériques toxiques contre les diptères.

II.1.2. Conservation des souches

Les souches sont conservées à une température de 4 ºC sur boites de pétri avec un milieu solide T_3 dont la composition est présentée dans le tableau II.1. Un repiquage est effectué à intervalles réguliers de 2 mois. Les boites de pétri sont ensuite incubées à 30 ºC pendant 48 h. Un stockage à long terme est également effectué. Il se fait à -20ºC dans un milieu LB à 40 % de glycérol.

Tableau II.1. Composition du milieu T_3 solide

Substrat	Concentration $g.L^{-1}$
Tryptose	3
Tryptone	2
Extrait de levures	1,5
$MnCl_2$	0,005
NaH_2PO_4	6,9
Na_2HPO_4	8,9
Agar	15

II.1.3. Milieux de culture

Quatre milieux de la bibliographie ont été utilisés. Leur composition est donnée dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Composition des milieux de culture utilisés pour les essais de production des différentes souches de *B.thuringiensis*

Milieu de culture / Substrat g.L^{-1}	Luria Bertani	Tryptose-phosphate	Anderson, 1990	Semi synthétique standard (Montiel *et al.*, 2001)
Glucose		2	9,88	5
Amidon				5
Extrait de levure	5		4,62	
Bactopeptone			4,62	
Farine de soja				15
Tryptose		20		
Tryptone	10			
$(NH4)_2SO_4$			1	
KH_2PO_4			3,4	1
K_2HPO_4			4,15	1
$CaCl_2.2H_2O$			0,106	
NaCl	10	5		
Na_2HPO_4		2,5		
$MgSO_4.7H_2O$			0,3	0,3
$MnSO_4.7H_2O$			0,05	
$FeSO_4.7H_2O$				0,02
Citrate de fer			0,075	
$ZnSO_4.7H_2O$			0,0075	0,02
$CuSO_4$			0,0045	
$CaCO_3$				1

II.1.4. Milieu « son de blé »

Ce milieu a été proposé au cours de nos travaux. Il est composé uniquement d'un sous-produit de l'agro-industrie, le son de blé, avec une taille de particules < 200 mesh (75 µm), dilué dans de l'eau distillée. Le son de blé a été fourni par « ***arcenciel »*** (association qui agit pour le développement durable de l'agriculture au Liban) et son origine est les établissements agricoles de Tanail (EAT) des pères jésuites. Dans la section des résultats le pourcentage de son de blé (m/v) utilisé dans chaque expérience sera indiqué.

II.2. Déroulement des fermentations à l'échelle du laboratoire

- Tous les milieux de culture ainsi que le milieu de conservation sont stérilisés par autoclavage à 120ºC pendant 20 min.
- Toutes les cultures en erlenmeyer sont menées dans des flacons erlenmeyer de 1 L fermées avec du coton.
- Pour les fermentations menées en bioréacteurs de 2 et 5 L, avant la stérilisation, les sondes de pH sont calibrées avec des solutions de pH 4 et 7. Un volume de 20 mL d'un agent anti mousse à base de silicone est ajouté au milieu de culture pour éviter la formation de mousse. Après autoclave, les sondes de mesure de dioxygène dissous sont calibrées à 0 % par barbotage du diazote et à 100 % par barbotage de l'air avec une vitesse d'agitation de 500 rpm.
- La température est maintenue constante à 30 ºC dans toutes les fermentations.
- La fin de la fermentation est considérée atteinte lorsqu'au minimum 90 % des cellules ont libérées leur spore dans le milieu.

II.2.1. Préparation de la pré-culture

La préparation de l'inoculum est basée sur le travail de Dulmage, 1990. La pré-culture est réalisée en deux étapes. En premier lieu, un erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL d'un milieu LB est inoculé par quelques colonies de *B.thuringiensis* prises stérilement à partir d'une boite de conservation (un milieu T_3 gélosé). Après 12 h d'incubation à une vitesse d'agitation de 340 rpm, 2 mL du pré-levain ainsi préparé est transféré pour inoculer un autre erlenmeyer de 500

mL contenant 98 mL d'un milieu tryptose phosphate (pourcentage de l'inoculum 2 % v/v) qui sera incubé dans les mêmes conditions pendant 12 h formant ainsi le levain.

II.2.2. Conditions de la culture principale

II.2.2.1. Recherche d'un nouveau milieu de culture et comparaison du milieu conçu au milieu Anderson et au milieu semi-synthétique standard

Dans les essais de recherche d'un nouveau milieu de culture de *B.thuringiensis* et de comparaison du milieu proposé à des milieux de la littérature, les fermentations ont été menées dans des erlenmeyers de 1 L. Les nouveaux milieux proposés ont été testés avec les souches « Lip » et « H_3 ».

Le rapport entre le volume du milieu de culture et le volume de la fiole erlenmeyer a été réduit jusqu'à 1/20 pour minimiser l'effet de limitations en oxygène.

Pour ces fermentations, 1 mL du levain (pourcentage de l'inoculum 2 % v/v) est transféré pour inoculer des erlenmeyer de 1 L contenant 49 mL du milieu de culture (milieu son de blé, Anderson ou semi-synthétique standard). Les erlenmeyers sont incubés à 30 ºC avec une vitesse d'agitation de 340 rpm choisie en se basant sur le travail de Dulmage. (1990).

II.2.2.2. Etude de l'effet de l'aération sur la cinétique de la fermentation de *B.thuringiensis*

L'effet de l'aération sur la cinétique de la fermentation de la souche « Lip » de *B.thuringiensis* a été étudié. Les conditions d'aération ont été définies de façon à faire varier la capacité de transfert de l'oxygène au milieu de culture. Le coefficient de transfert K_La caractérise les différentes conditions.

a) Détermination du K_La

Le K_La est le produit du coefficient K_L (coefficient d'échange global pour O_2 : capacité pour O_2 à passer depuis les bulles de gaz d'aération vers l'état dissous dans le milieu de culture, en $m.h^{-1}$) et du coefficient "a" (aire d'échange spécifique ramenée à l'unité de volume de phase liquide de milieu de culture, en m^2 par m^3 de milieu de culture). K_La est appelé coefficient de transfert volumétrique ramené à l'unité de volume de milieu (en unité de $temps^{-1}$).

K_La a été déterminé en absence de microorganismes dans le milieu de culture, par la méthode de désoxygénation et réoxygénation en suivant le protocole suivant :

- Barbotage du diazote pour éliminer le dioxygène du milieu liquide.
- Arrêt du flux de diazote quand la concentration du dioxygène dissous atteint 0 % de saturation.
- Injection d'air à débit et vitesse d'agitation fixés.
- Suivi et enregistrement de la variation de la concentration du dioxygène dissous par rapport au temps.

- Tracé de $\ln \frac{C^* - C_0}{C^* - C_t} = f(t)$

  C^* : la concentration en dioxygène dissous du milieu de culture à saturation avec la phase gazeuse.

  C_t : la concentration en dioxygène dissous à l'instant t.

  C_0 : la concentration initiale en dioxygène dissous

- Détermination graphique de K_La comme étant le coefficient directeur de la droite obtenue.

b) Conditions des fermentations

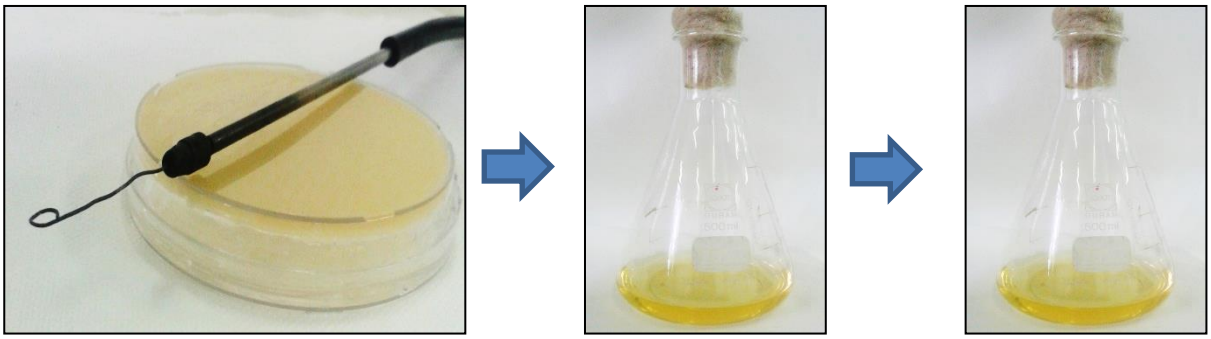
Des fermenteurs « New Brunswick "Bioflo 110" » de 2 L ont été utilisés dans les expériences visant à comparer la cinétique de fermentation de *B.thuringiensis* dans différentes conditions d'aération. Ces fermenteurs sont équipés de système de contrôle automatique du pH, de la température, d'oxygène dissous, d'antimousse, de la vitesse d'agitation et du flux d'entrée d'air. La détermination de dioxyde de carbone et d'oxygène dans le courant gazeux sortant du fermenteur est faite grâce à deux analyseurs placés en sortie du fermenteur. L'analyseur d'oxygène « SERVOMEX 4100 » exploite les propriétés paramagnétiques du gaz alors que l'analyseur de CO_2 « SERVOMEX 4100 » permet sa quantification grâce à l'absorption de radiations IR par la molécule. Ces appareils transmettent à l'ordinateur des tensions électriques proportionnelles à la composition du gaz en sortie du fermenteur. Un système d'acquisition permet l'enregistrement de tous les paramètres déjà cités.

Le bioréacteur contenant 1.45 L du milieu son de blé est inoculé par 50 mL du levain. Différentes valeurs du coefficient volumétrique de transfert de dioxygène (K_La) sont obtenues par la variation du flux d'air et de la vitesse d'agitation (tableau II.3). Le pH et la concentration du dioxygène dissous ne sont pas contrôlés mais suivis de façon continue tout au long de la fermentation à l'aide de sondes (New Brunswick). Des échantillons sont prélevés pour suivre l'évolution des concentrations des cellules, des spores et des cristaux dans le milieu de culture.

Tableau II.3. Conditions d'aération

Vitesse d'agitation (rpm)	Flux d'air ($L.L^{-1}.min^{-1}$)	K_La (h^{-1})
340	0,033	7,2
500	0,033	13,3
500	0,165	40,7
500	0,333	65,5
500	1,000	106,2

Les différentes étapes des fermentations réalisées au niveau du laboratoire, décrites ci-dessus, sont schématisées dans la Figure II.1.



1) Inoculation à partir d'un milieu T_3 solide

2) Prélevain (100 mL milieu LB, incubation à 30 °C, 340 rpm, 12 h)

3) Levain (100 mL milieu tryptose-phosphate, incubation à 30 °C, 340 rpm, 12 h)

4) Culture principale

Inoculum 2 % v/v



Erlenmeyer 1 L



« New Brunswick "Bioflo 110" de 2 L

Figure II.1 Schématisation des déroulements des fermentations à l'échelle du laboratoire

II.3. Essais de production dans le bioréacteur de 1000 L

Des essais de production de biopesticide à base de la souche de *B.thuringienis kurstaki* « Lip » ont aussi été réalisés à plus grande échelle dans un bioréacteur de 1000 L.

II.3.1. Stérilisation

Le fermenteur est stérilisé à la vapeur d'eau à une température de 125ºC (pression de 1,5 bars) pendant 40 minutes.

II.3.2. Préparation de la pré-culture

Le prélevain est préparé comme expliqué dans le paragraphe II.2.1. Pour préparer le levain, un erlenmeyer de 5 L contenant 1,47 L d'un milieu tryptose phosphate est inoculé par 30 mL du prélevain puis incubé dans un bain-marie à 30 ºC, et sous agitation de 340 rpm pendant 12 h. Le levain préparé est entièrement utilisé pour inoculer le bioréacteur de 1000 L (Figure II.2) (pourcentage de l'inoculum 0,5 %).



Figure II.2. Bioréacteur de 1000 L

II.3.3. Conditions de la culture principale

- La température est maintenue à 30ºC dans toutes les fermentations.
- Un agent antimousse à base de silicone est ajouté dans un rapport variant entre 1 et 3 $mL.L^{-1}$ du milieu de culture selon les conditions d'aération.
- Le pH n'est pas contrôlé.
- La vitesse d'agitation est fixée à 500 rpm.
- Trois flux d'air de 0,12 ; 0,29 et 0,58 $L.L^{-1}min^{-1}$ sont testés dans les essais de production dans le fermenteur de 1000 L.

II.4. Techniques et méthodes analytiques

II.4.1. Numération des cellules, spores et cristaux

Les nombres des cellules végétatives de *B.thuringiensis*, des spores et des cristaux peuvent être déterminés par dénombrement direct, à l'aide d'une chambre de comptage Petroff Hausser, sous l'objectif à immersion d'huile d'un microscope Olympus. Les cellules sont comptées en tant que cellules végétatives y compris les cellules contenant des spores. La concentration des spores et celle des cristaux représente les spores et les cristaux libres. Les prélèvements sont soumis à la sonication, a vec un soni cateur de t ype F isher Scientific (135 W, 4 2 kHz), pour casser l'agglutination des cellules ainsi que des spores et cristaux. Le résultat est exprimé en nombre de cellules, spores ou cristaux par mL.

La cellule Petroff Hausser est adaptée à la petite taille des bactéries. Elle a une profondeur de 0,02 mm. Dans cette cellule de comptage, il y a 25 grands carreaux centraux (chacun divisé en 16 petits carreaux) couvrant une surface de 1 mm^2 (Figure II.3). Le volume de chaque carreau central est donc de 1/1250000 cm^3.

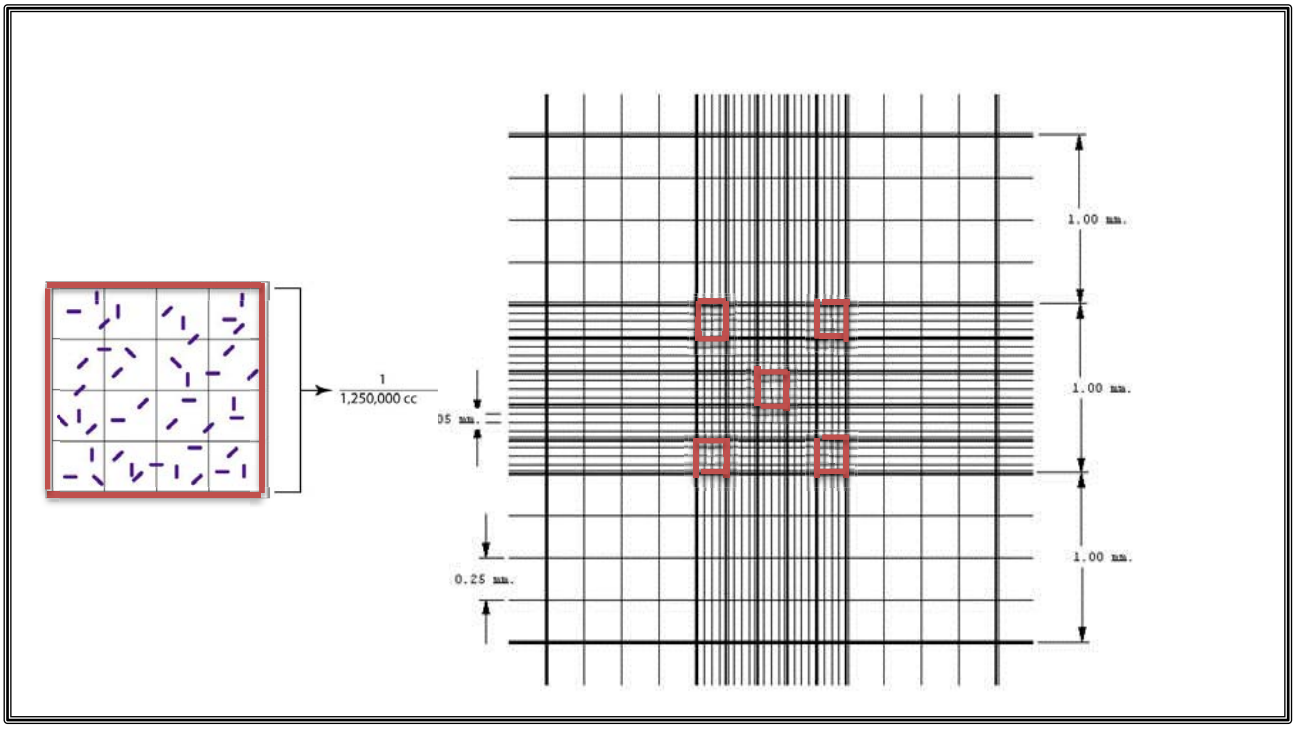


Figure II.3. Schéma du quadrillage d'une cellule Petroff Hausser

Chaque comptage est réalisé à partir de cinq grands carreaux de la cellule et le nombre moyen de bactéries par carreau est ensuite calculé. Dans le cas où les concentrations cellulaires sont faibles (en début de culture par exemple), le comptage est fait sur l'ensemble des 25 grands carreaux. Les prélèvements sont dilués, si nécessaire, pour rester dans la bonne zone de comptage de 130-250 bactéries. Le nombre de cellules est calculé en tenant compte de la dilution de l'échantillon.

La concentration en cellules par mL de milieu est donnée par la relation :

$$\text{Nombre de cellules/mL} = \frac{\text{Nombre de cellules comptées x Facteur de dilution x1250000}}{\text{Nombre de grands carreaux}}$$

La même procédure a été utilisée pour déterminer les concentrations des spores et des cristaux mais après coloration des cristaux par addition, à un rapport v/v, d'une solution de bleu de coomassie (0,13 % (m/v) bleu de coomassie, 50 % acide acétique).

II.4.2. Détermination du nombre de spores par la méthode indirecte (numération en milieu solide)

Un échantillon de 1 mL est prélevé à partir de la culture de *B.thuringiensis*, chauffé à 80ºC pendant 15 minutes pour tuer les cellules végétatives puis dilué en série (dilutions décimales) avec une solution physiologique (NaCl 0,9 $g.L^{-1}$) (Figure II.4). Des boites de pétri contenant un milieu de culture gélosé (T_3 solide) sont inoculées par 0,1 mL des différentes dilutions en duplicat. Les boites sont ensuite incubées à 30ºC pendant 24 h. Les colonies de *B.thuringiensis* qui se développent sont alors comptées et exprimées en UFC/mL. Le nombre de spores est estimé à partir du nombre de colonies. Pour une bonne précision, entre 30 à 300 colonies doivent être comptées par boite.

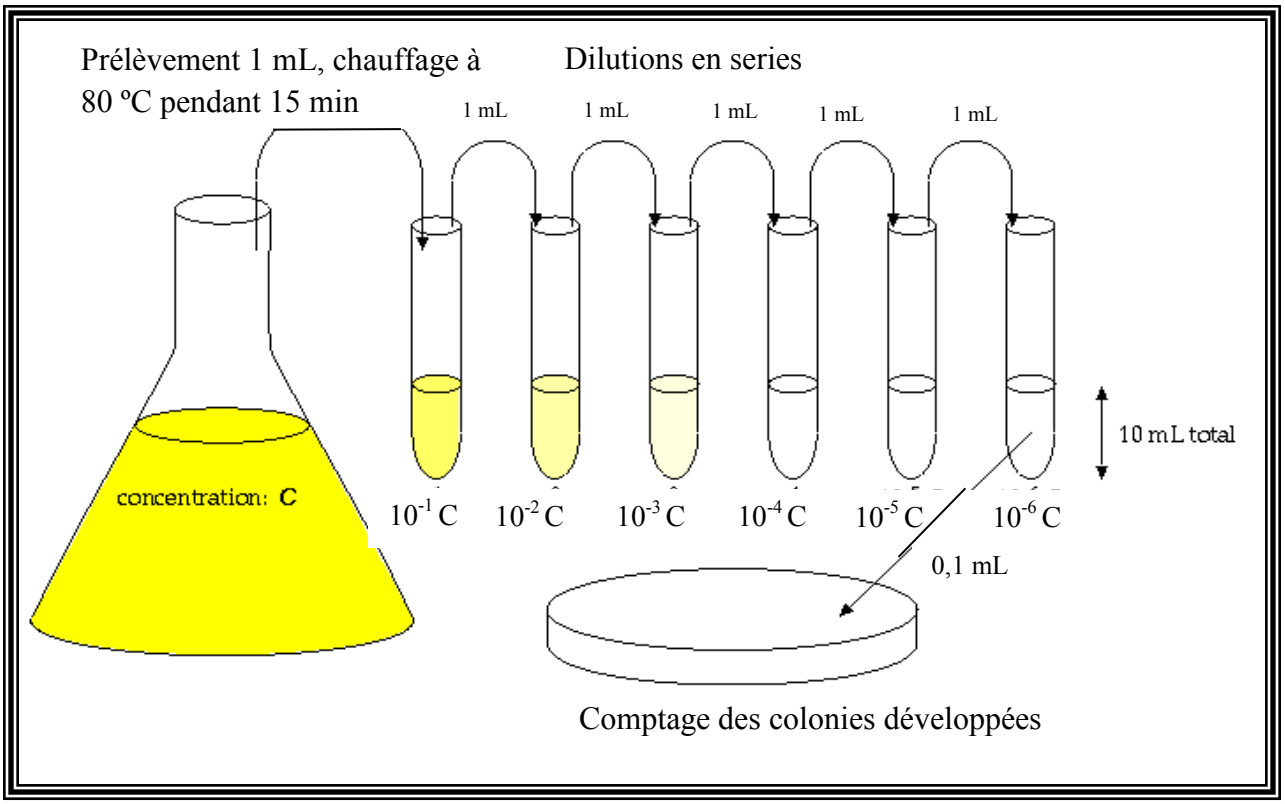


Figure II.4. Schématisation de la méthode indirecte de détermination du nombre de spores

II.4.3. Estimation de la concentration des toxines

Un échantillon de 1 mL de la suspension des cellules lysées à la fin de la fermentation est centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est jeté et le culot est lavé deux fois avec une solution de NaCl 0,14 M-0,01 % Triton X-100 et quatre fois avec de l'eau froide pour éliminer les protéines solubles et les protéases qui peuvent affecter l'intégrité des protéines cristallines. Les protéines cristallines dans le culot sont dissoutes dans une solution de NaOH 0,05 M à 30ºC pendant trois heures sous agitation. La suspension est centrifugée à 13000 rpm pendant 5 min et le culot contenant les spores et les débris est jeté. La concentration des protéines cristallines dans le surnagent est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant l'albumine sérum bovin comme standard. Une partie du surnageant est conservée pour l'analyse SDS-PAGE.

La méthode de Bradford est une méthode spectrophotométrique basée sur l'adsorption du colorant bleu de coomassie G 250 en milieu méthanolique acide, par les protéines. L'adsorption se fait par des liens ioniques pour les acides aminés basiques et des interactions hydrophobes pour les acides aminés hydrophobes. Cette complexation entraine le déplacement de son absorbance de 465 à 595 nm.

A partir d'une solution mère d'albumine sérum bovin (ASB) de concentration 1 $g.L^{-1}$, six solutions étalons de concentrations 100, 200, 300, 400, 500 et 600 $\mu g.mL^{-1}$ sont préparées. 10 µL de chacune des solutions étalons ainsi que des solutions de protéines à doser sont mélangés à 790 µL d'eau distillée et 200 µL du réactif de Bradford dans des tubes eppendorf de 1,5 mL. Les tubes sont laissés à l'obscurité pendant 15 minutes. L'absorbance de toutes les solutions est ensuite mesurée à la longueur d'onde de 595 nm par rapport au blanc (800 µL d'eau distillée + 200 µL du réactif de Bradford). La concentration de chacune des solutions inconnues est déterminée à partir de la droite d'étalonnage obtenue en traçant le graphique $A_{595} = f(C_{ASB})$.

II.4.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

a) Principe

L'électrophorèse SDS-PAGE, comme toute technique électrophorétique, consiste à faire migrer des molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique permettant ainsi leur séparation. Sa particularité réside dans la soumission des échantillons protéiques à un traitement dénaturant. Les protéines sont soumises à l'action de deux composés :

- Le ß-mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures, désorganisant ainsi la structure tridimensionnelle des protéines. La structure native des protéines est donc dénaturée.
- Le SDS, un détergent fort possédant une longue queue carbonée hydrophobe et une extrémité chargée, se fixe sur la périphérie des chaines protéiques, par sa portion hydrocarbonée, leur conférant une charge négative.

Ainsi sous l'influence du SDS, toutes les protéines auront la même charge négative et migreront vers l'anode en fonction de leur masse moléculaire.

b) Protocole

Des échantillons des protéines cristallines, obtenues après dissolution alcaline, sont mélangés à un tampon de charge, dans un rapport de 5 :1 et ensuite portés à ébullition pendant 5 min puis refroidis dans un bain de glace. Les protéines des toxines sont séparées par électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium de polyacrylamide (Lammeli, 1970). La migration des protéines est effectuée dans une cuve BioRad contenant un tampon d'électrophorèse conducteur sous une tension de 120 V pendant 100 min. Le tampon de migration est préparé en dissolvant 4,5 g de Tris base, 21,6 g de glycine et 1,5 g de SDS dans 300 mL d'eau distillée. La solution est ensuite diluée cinq fois. Les compositions du tampon de charge, du gel de concentration, et du gel de séparation sont groupées dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Compositions de : tampon de charge, gel de concentration et gel de séparation

Composé	Pourcentage en volume		
	Tampon de charge	Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide 40 %	-	9,7	24,8
APS 10 %	-	0,5	0,5
Bleu de bromophénol	0,5	-	-
ß-mercaptoéthanol	7,7	-	-
Eau distillée	51,6	64	48,5
Glycérol	15,5	-	-
SDS 10 % (m/v)	-	0,5	1
SDS 20 % (m/v)	15,5	-	-
TEMED	-	0,4	0,2
Tris HCl 1,5 M	-	-	25
Tris HCl 1 M	9,7	-	-
Tris HCl 0,5 M	-	25,9	-

Les bandes des protéines sont visualisées par coloration avec une solution de bleu de coomassie (bleu de coomassie 0,1 % ; éthanol 5 % et acide acétique 5 %) puis décoloration avec un mélange d'éthanol (7,5 %) et d'acide acétique (5 %) dans de l'eau distillée.

II.4.5. Détermination de la concentration des sucres

II.4.5.1. Extraction et hydrolyse des carbohydrates du son de blé

Les principaux carbohydrates du son de blé sont l'hémicellulose, la cellulose et l'amidon. Pour étudier la consommation des sucres du son par *B.thuringiensis*, une étape d'extraction et d'hydrolyse des carbohydrates est nécessaire avant le dosage des sucres.

5 mL d'acide sulfurique 72 % est ajouté à 0,122 g de son ou à 5 mL du milieu de culture contenus dans des flacons. Les flacons sont incubés à 30 ºC pendant 60 min. Apres dilution avec 42 mL d'eau distillée, les échantillons sont autoclavés à 120 ºC pendant 20 min. Ils sont ensuite filtrés à l'aide d'un papier filtre puis à l'aide d'une membrane stérile de 0,45 µm de diamètre de pores. Les filtrats obtenus sont conservés à -20 ºC pour l'analyse HPLC.

II.4.5.2. Dosage des sucres

II.4.5.2.1. Chromatographie : système et appareillage

Après hydrolyse acide des carbohydrates du son, les monomères de glucose, xylose et arabinose sont obtenus. La chromatographie à exclusion d'ions (système « Thermo Separation High performance Liquid Chromatography ») couplée à une détection par réfractométrie a été utilisée pour le dosage de ces sucres. La séparation est faite sur une colonne cationique Bio - Rad Aminex HPX - 87H. Le logiciel « Chromgate » est utilisé pour l'acquisition des données ainsi que pour l'analyse et l'intégration des pics.

II.4.5.2.2. Conditions opératoires

La phase mobile était une solution d'acide sulfurique 4 mM. Le débit de la pompe a été fixé à 0,6 $mL.min^{-1}$. La colonne a été thermostatée dans un four à une température de 63 ºC tout au long de l'analyse. Le volume de chaque injection était de 20 µL et sa durée de passage était de 20 min.

II.4.5.2.3. Détection et quantification

La quantification des pics est basée sur la variation des aires en fonction de la concentration par rapport à des courbes de calibration. Les concentrations de calibration ont été dans la gamme 0,1-0,8 $g.L^{-1}$ pour chaque sucre. La linéarité r^2 pour tous les sucres a été supérieure à 0,99.

II.4.5.2.4. Exemple de chromatogramme

Le chromatogramme de la Figure II.5 montre les trois pics des trois sucres simples (glucose, xylose et arabinose) obtenus après hydrolyse acide des carbohydrates du son de blé.

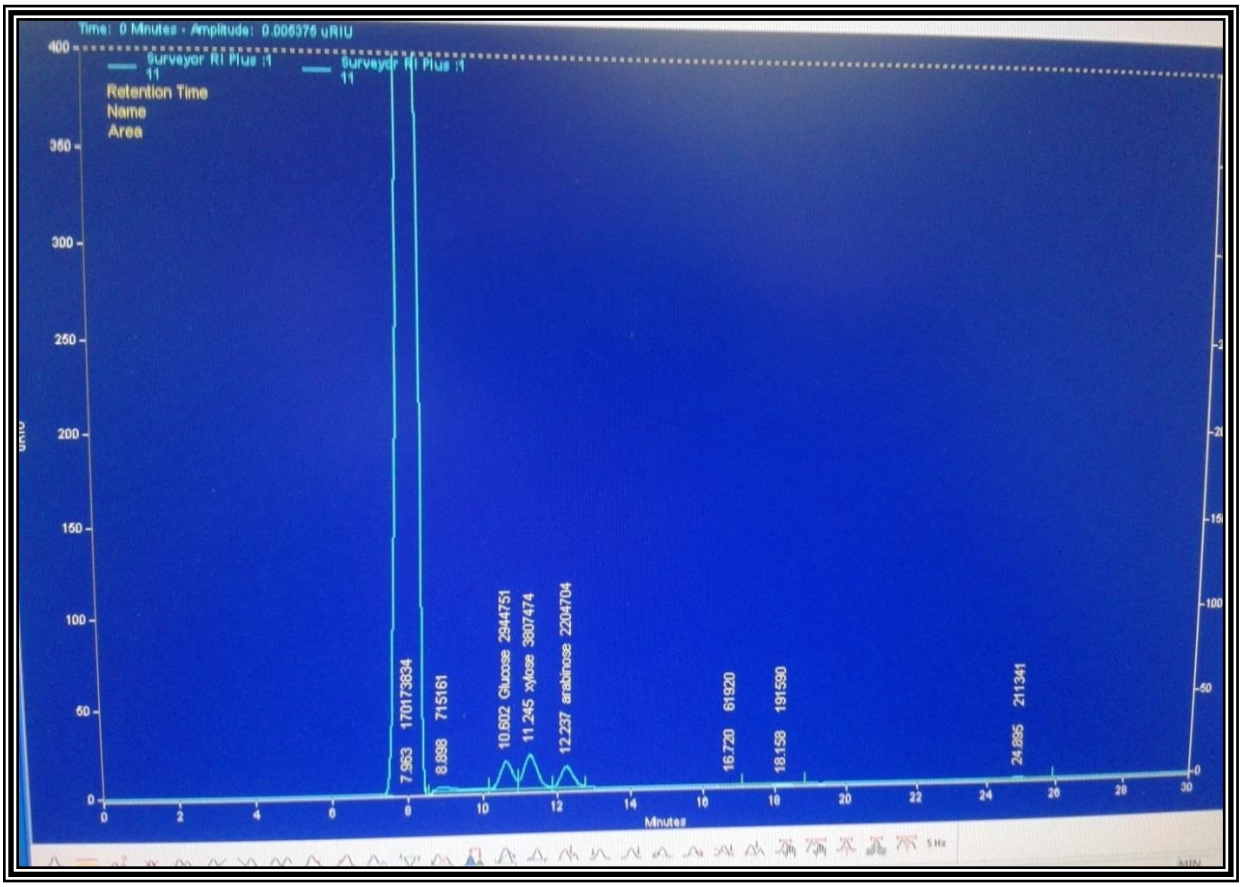


Figure II.5. Chromatogramme de l'hydrolysat du son de blé obtenu par HPLC couplée à la réfractométrie

II.5. Le test de « Congo red » pour l'identification de l'activité cellulosique des souches de *B.thuringiensis*

La cellulose est un polysaccharide linéaire formée de monomères de glucose liés ensemble par des liaisons 1,4 glucosides. Le « Congo red » est un colorant de formule $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ qui peut se lier au polymère ß-1,4-glucoside. L'utilisation du « Congo red » comme un indicateur de la dégradation de la cellulose dans un milieu de culture gélosé fournit un moyen de dépistage rapide et sensible des micro-organismes ayant une activité cellulosique.

Pour vérifier la capacité des souches « Lip » et « H_3 » à dégrader la cellulose, des colonies de ces souches sont repiquées sur un milieu gélosé dont la composition est présentée dans le tableau II.5. Les boites de pétri sont incubées à 30 ºC pendant 24 h. Après incubation, le milieu gélosé est submergé avec une solution de « Congo red » (1mg/mL) pendant 15 minutes puis lavé avec une solution de NaCl 1M pour visualiser les zones d'hydrolyse du carboxyméthylcellulose. L'apparition d'une zone claire autour des colonies est une indication de la dégradation du carboxyméthylcellulose (CMC) et de l'activité ß-glucosidase de la bactérie.

Tableau II.5. Composition du milieu CMC solide

Substrat	Concentration $g.L^{-1}$
NaCl	6
$(NH_4)_2SO_4$	1
KH_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4$	0,1
$CaCl_2$	0,1
CMC	1

Le potentiel quantitatif de la dégradation du carboxyméthylcellulose par les souches est estimé en relatif, par le calcul de la capacité d'hydrolyse qui est le rapport des diamètres de la zone de décoloration et de la colonie.

II.6. Purification des cristaux par la méthode de flottation de Sharpe *et al*. (1978)

Des cristaux de la souche « H_3 » de *B.thuringiensis* ont été purifiés par la méthode de flottation de Sharpe *et al*. (1978) en vue de comparer leur toxicité à celle des cristaux purs obtenus par la méthode de purification mise en place au cours de nos travaux.

Cette méthode de flottation consiste à suspendre le complexe spore-cristal dans 40 mL d'eau et ajouter 1 mL d'une solution de gélatine 2,5 % (m/v) qui joue le rôle d'agent moussant puis agiter vigoureusement, et laisser reposer pendant 2 minutes. La mousse formée riche en spores est enlevée à l'aide d'une cuillère ou par filtration à travers une laine de verre. Après cinq répétitions de la même opération, 93 % des spores sont séparées. Le filtrat liquide riche en cristaux est centrifugé à 6000 rpm à 4 °C pendant 10 minutes. Le culot obtenu est lavé avec de l'eau froide et centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes. Les débris cellulaires forment une couche noire dans le culot, qui sera enlevée à l'aide d'une pipette pasteur.

II.7. Bio essai

En vue de vérifier que la méthode de séparation des spores et cristaux mise en place au cours de nos travaux n'affecte pas la toxicité des cristaux, un bio-essai a été réalisé :

Vingt larves de moustiques *Anophèles gambia* au troisième ou quatrième stade larvaire sont incubées dans 3 mL d'une solution de toxines purifiées soit par la méthode de flottation de Sharpe *et al*., 1978, soit par notre nouvelle méthode à différentes concentrations (50, 20 ou 10 µg/mL). Le nombre de survivants est déterminé toutes les 1 h.

II.8. Méthode « Speckle »

II.8.1. Préparation des échantillons

Des poudres de cristaux purs, spores pures ou mélange (50 % spores, 50 % cristaux) sont dissoutes dans l'eau à des concentrations entre 0 et 1,5 $g.L^{-1}$. Les solutions obtenues sont soniquées à une fréquence de 42 kHz pendant 10 min pour dissiper l'agglutination, puis mélangées avec une solution d'agarose 2 % (m/v), et versées dans des boîtes de Pétri. Après le durcissement du gel, utilisé comme matrice, les échantillons sont prêts à être testés.

II.8.2. Configuration expérimentale

La configuration expérimentale de « Speckle » utilisée dans nos expériences est esquissée sur la Figure II.6. Un laser 7 mW He-Ne délivre un faisceau linéaire polarisé de largeur 1 mm à I_0/e^2 où I_0 est l'intensité maximale du laser à la longueur d'onde de 632,8 nm avec une longueur de cohérence de environ 20 cm. Une caméra CMOS est utilisée pour détecter la lumière diffusée dans la direction $\theta = 15$ °avec un temps d'exposition de 10 ms et une taille de pixel de 8 µmx 8 µm. La distance Z entre la caméra et l'échantillon est fixée à 15 cm.

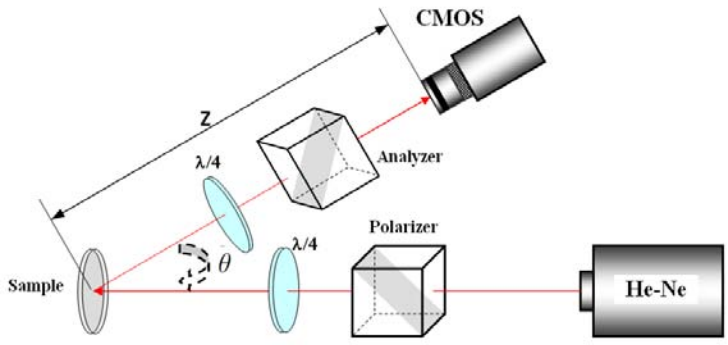


Figure II.6. Vue de dessus de l'installation expérimentale de « Speckle ». λ/2 et λ/4 sont des lames demi-onde de demi et quart d'onde.

II.8.3. Principe

Quand une surface optiquement rugueuse présentant des irrégularités à l'echelle de la longueur d'onde est éclairée par une lumière cohérente comme celle provenant d'un laser, la lumière

diffusée présente une distribution d'intensités aléatoires qui donne l'impression que la surface est couverte par une structure de grains fins. Cette structure granulaire formée par des taches alternativement sombres et claires, de forme et de répartition aléatoires, est nommée speckle. Une telle distribution d'intensités peut être également observée lorsque la lumièe cohérente se propage dans un milieu présentant des variations de son indice de réfraction. Le speckle, remplissant l'espace entourant le milieu diffusant, peut être enregistré en plaçant convenablement un détecteur à une certaine distance de l'échantillon. Les figures sont enregistrées et puis analysées, ce qui conduit à des informations relatives aux caractéristiques intrinsèques des échantillons. Comme chaque échantillon éclairé répond différemment à la polarisation de la lumière incidente en fonction de sa propre distribution de tailles de particules (Morgan *et al*, 2000), les propriétés de polarisation de la lumière rétrodiffusée, quantifiées par le degré de polarisation, peuvent faire remonter cette distribution. Ce paramètre est déterminé à partir des mesures de l'intensité moyenne du speckle à l'aide de l'équation suivante:

$$\mathrm{DOP} = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}$$

Avec $I_{//}$ et $I_{\perp}$ les intensités moyennes détectées en polarisation parallèle et croisée respectivement.

II.9. Etude de l'effet des rayons UV

Pour étudier l'effet des rayons UV sur la concentration des cristaux et celle des protéines de toxines de « Lip » dans le produit de fermentation, des échantillons de 20 mL du produit liquide ont été placés dans des boites de pétri ouvertes à une distance de 15 cm d'une lampe UV 365 nm avec une puissance surfacique de 0,610 $mW.cm^{-2}$. Le liquide a été régulièrement agité manuellement. Des prélèvements ont été effectués après 1, 2, 4, 6, 8 et 12 h.

II.10. Détermination des paramètres cinétiques

II.10.1. Vitesse spécifique de croissance

La vitesse de croissance décrit l'évolution de la biomasse en fonction du temps :

$$\mathbf{rx} = \frac{\mathbf{d[X]}}{\mathbf{dt}}$$

[X] : la concentration en biomasse mesurée à l'instant t

La vitesse spécifique de croissance correspond à la vitesse de croissance rapportée à l'unité de la biomasse :

$$\boldsymbol{\mu} = \frac{\mathbf{d[X]}}{\mathbf{dt}}\frac{\mathbf{1}}{\mathbf{[X]}} = \mathbf{d}\ln\frac{\mathbf{[X]}}{\mathbf{dt}}$$

La vitesse spécifique moyenne de croissance a été déterminée en utilisant la relation suivante :

$$\boldsymbol{\mu moyenne} = (\boldsymbol{LnXmax} - \boldsymbol{LnX0})/(\boldsymbol{tf} - \boldsymbol{t0})$$

t_0 and t_f: temps correspondant au début de la fermentation et la fin de la phase de croissance végétative respectivement.

X_0 et Xmax: les concentrations des cellules à t_0 et t_f respectivement.

II.10.2. Vitesse de transfert du dioxygène

La vitesse de transfert du dioxygène est donnée par la relation :

$$\mathbf{OTR} = \mathbf{K_L\, a(C^*\text{-}C)}$$

C* : concentration en O_2 dissous dans le milieu de culture à saturation avec la phase gazeuse. On a considéré que C*, dans notre milieu de culture de son de blé dilué, est égale à 7,71 $g.L^{-1}$ qui est la valeur de C* dans de l'eau à 30 ºC et à la pression atmosphérique.

C : concentration en O_2 dissous dans le milieu liquide de culture supposé parfaitement homogénéisé ($g.L^{-1}$).

Cette relation traduit que la vitesse de transfert du dioxygène dépend de trois facteurs :

- La difficulté de passage à travers l'interface bulle de gaz/liquide, c'est le facteur K_L.
- La surface de contact gaz/ liquide, c'est le facteur a
- Le gradient de dioxygène entre les bulles de gaz et le liquide, c'est le facteur (C*-C)

OTR est exprimé en quantité d'O_2 par unité de volume et par unité de temps, par exemple mmole $O_2.L^{-1}.h^{-1}$

II.10.3. Vitesse de consommation du dioxygène

La vitesse de consommation de l'oxygène par la biomasse OUR (oxygen uptake rate) est définie par :

$$\mathbf{OUR = Q_{O_2}\,[X]}$$

Q_{O2} : vitesse spécifique de consommation du dioxygène par la biomasse (masse de O_2 par unité de biomasse et par unité de temps).

[X] : concentration en biomasse

OUR est exprimé en quantité d'O_2 par unité de volume et par unité de temps, par exemple mmole $O_2.L^{-1}.h^{-1}$

OUR est calculé en utilisant la relation suivante :

$$\mathbf{OUR = OTR - \frac{dC}{dt}}$$

Les variations de la concentration du dioxygène dissous sont calculées pour des intervalles de temps de 10 min.

II.10.4. Productivité

La productivité est déterminée comme étant soit le rapport de la concentration finale des spores et du temps de la fermentation, soit le rapport de la concentration obtenue de δ-endotoxines et du temps de la fermentation. Elle est exprimée en spores.$mL^{-1}.h^{-1}$ ou en g toxines.$mL^{-1}h^{-1}$.

II.10.5. Rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé

La quantité totale de dioxygène consommé, du début de la fermentation jusqu'à atteindre la concentration maximale de cellules, est calculée par intégration :

Quantité totale de dioxygène consommé = Σ (OUR.Δt) avec Δt= 10 min

Le rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé est calculé comme étant la concentration maximale de cellules produite par g de dioxygène consommé jusqu'au moment où cette concentration est atteinte. Il est exprimé en cellules/g O_2.

II.11. Analyse statistique

Tous les résultats relatifs à la détermination des concentrations des cellules végétatives, des spores, des cristaux et des protéines des toxines sont la moyenne de deux répétitions des mesures de deux expériences séparées pour chaque condition de culture. Les valeurs moyennes sont comparées par un test de Student au niveau $p < 0,05$.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

TROISIÈME CHAPITRE

MÉTHODES DE PURIFICATION ET DE QUANTIFICATION DES CRISTAUX

III.1. Introduction

Comme il a été montré dans la synthèse bibliographique (paragraphe I.4), aucune des méthodes existantes n'est totalement satisfaisante pour caractériser la quantité et la qualité de la production de biopesticide produit à base de *B.thuringiensis*. Pourtant, il est primordial d'être capable d'évaluer régulièrement les caractéristiques du produit lorsque l'on travaille sur l'optimisation de sa production.

Le bio-essai est la méthode permettant d'obtenir la meilleure information puisqu'il renseigne sur l'objectif final du produit, la destruction des insectes. Cette méthode nécessite cependant beaucoup de temps et de complexité (élevage d'insectes) pour pouvoir être utilisée comme tests de routine.

Parmi les méthodes analytiques d'évaluation du produit *B.thuringiensis* déjà utilisées, le dosage des protéines totales est la méthode la plus simple et la moins chère. Mais l'utilisation de cette méthode présente le risque de surestimer la concentration des δ-endotoxines puisqu'elle dose la totalité des protéines du milieu.

Les cristaux de δ-endotoxines jouent le rôle central dans les mécanismes de lutte contre les insectes. Cependant, suivant les souches et les conditions de production, la taille et la forme des cristaux varient mais également leur concentration en protéines. Le lien entre ces paramètres et efficacité sur les insectes n'est pas clairement exprimé dans la littérature. En clair, nous ne savons pas s'il est préférable de produire plus de cristaux ou plus de protéines et si un lien existe entre les deux. Dans la suite de nos travaux, pour évaluer le produit *B.thuringiensis*, nous doserons donc chaque fois la concentration en cristaux et les protéines totales dans le milieu de fermentation, et nous regarderons si un couplage ou non existe entre ces 2 paramètres.

Toutefois, pour aller plus loin dans la caractérisation du biopesticide, nous avons cherché à mieux caractériser les cristaux produits notamment en utilisant une méthode optique, le « laser speckle », permettant de les doser et peut être de les caractériser d'un point de vue taille et forme. La première étape a été l'obtention de cristaux purs afin de tester nos méthodes. La difficulté est qu'ils sont produits dans les milieux de fermentation, en mélange avec les spores de

B.thuringiensis. Les méthodes de séparation des spores et des cristaux déjà rapportées sont partiellement efficaces et assez longues ou elles nécessitent un équipement et des réactifs chers.

Dans ces conditions, nous avons travaillé sur la séparation des spores et des cristaux pour avoir des standards de cristaux purs. Les cristaux de différentes souches de *B.thuringiensis* peuvent avoir différentes tailles, formes et antigènes de surface mais les spores sont couramment hydrophobes. Cette caractéristique des spores a été utilisée pour mettre en place une méthode simple et rapide de préparation des cristaux de pureté élevée à partir du complexe spore-cristal de différentes souches de *B.thuringiensis.*

Dans ce chapitre, la nouvelle méthode de séparation des cristaux et des spores mise en place au cours de nos travaux est développée. Les résultats des essais de caractérisation des cristaux par une méthode optique « laser speckle » sont également présentés.

III.2. La nouvelle méthode de séparation des spores et des cristaux

III.2.1. Séparation des spores et cristaux de la souche H_3 de *B.thuringiensis*

Le procédé de purification développé a été d'abord utilisé pour séparer les cristaux sphériques des spores de la souche H_3 de *B.thuringiensis*.

III.2.1.1. Protocole de la méthode de séparation

Etape 1 : Le milieu de culture liquide est centrifugé à 6000 rpm, 4 ºC pendant 10 minutes.

Etape 2 : Le culot est lavé deux fois par suspension dans une solution de NaCl 1 M contenant 0,01 % triton X-100, suivi d'une centrifugation à 6000 rpm, 4 ºC pendant 10 minutes.

Etape 3 : Le culot est suspendu dans une solution saline (NaCl 9 $g.L^{-1}$) dans un tube Falcon de 50 mL. Un solvant organique (diethylether, dichlorométhane ou hexane) est ajouté à un rapport de 50, 75 ou 100 µL/mL de la suspension aqueuse.

Etape 4 : La suspension est soniquée à 135 W, 42 kHz pendant 10 minutes pour casser l'agglomération des spores et des cristaux puis centrifugée à 6000 rpm, 4 ºC pendant 10 minutes.

Le culot obtenu est de nouveau suspendu dans la solution saline. Les étapes 3 et 4 sont répétées 3 fois.

Etape 5 : Finalement, le culot est lavé avec de l'eau distillée à température ambiante.

III.2.1.2. Efficacité du protocole de séparation

Puisque les ions augmentent les interactions hydrophobiques, le complexe spore-cristal a été suspendu dans une solution saline de chlorure de sodium. Parmi les 3 solvants organiques hydrophobiques testés (diethylether, dichloromethane et hexane) dans les conditions décrites dans la partie III.2.1.1, seul l'hexane a permis de récupérer les spores. Comme il est montré sur la figure III.1, la séparation des spores et des cristaux a été possible à une vitesse de centrifugation relativement faible dans un tube Falcon de 50 mL.

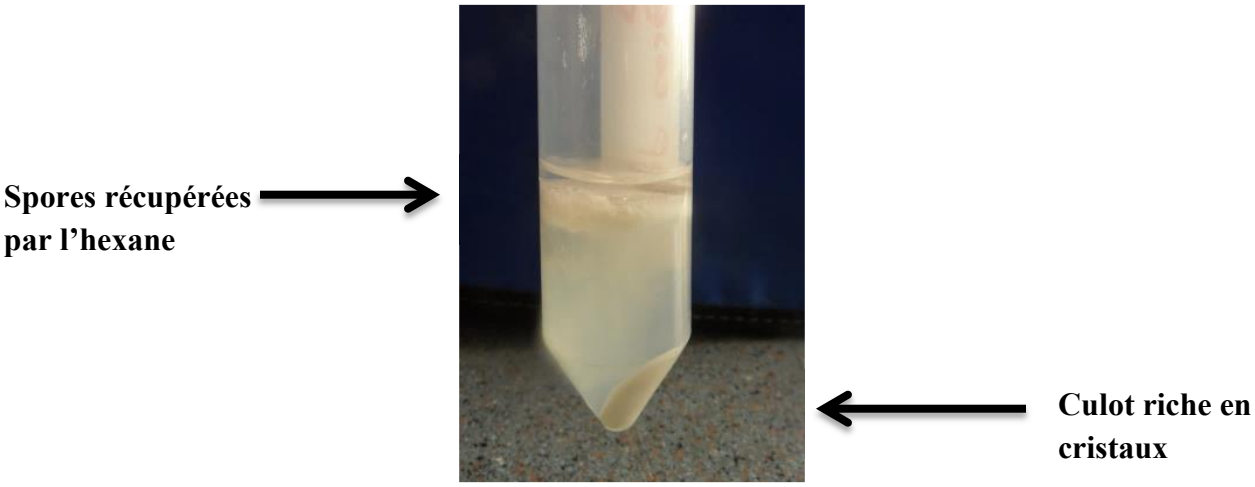


Figure III.1. Séparation des spores, cristaux et débris cellulaires lors de la centrifugation

La composition des différentes phases de la solution centrifugée a été vérifiée par observation à 100x en utilisant un microscope optique après coloration avec une solution de bleu de coomassie ayant la composition suivante : 0,13 % (m/v) bleu de coomassie, 50 % acide acétique. La coloration facilite la distinction entre les spores et les cristaux. Seuls les cristaux de δ-endotoxines sont colorés en bleu. Les spores ont été piégées par l'hexane dans la couche supérieure, les débris cellulaires sont restés dans la phase aqueuse alors que les cristaux se sont accumulés pour former le culot.

Le degré de pureté des cristaux a été estimé à l'aide d'une cellule de Petroff hausser (épaisseur 0,02 mm) en utilisant l'objectif à immersion dans l'huile d'un microscope optique. La plus grande pureté des cristaux a été obtenue lorsque l'hexane a été ajouté dans un rapport de 10 % (v/v). Ce rapport est proche du rapport de 13.3 % pour une adhérence maximale des spores aux hydrocarbures proposé par Doyle *et al*. (1984). L'observation microscopique du culot a montré la présence de seulement 1 % de spores. Des cristaux morphologiquement purs à 99 % ont ainsi été obtenus comme le montre la figure III.2 où ni débris cellulaires, ni spores ne sont observés. Seuls les cristaux colorés au bleu apparaissent.

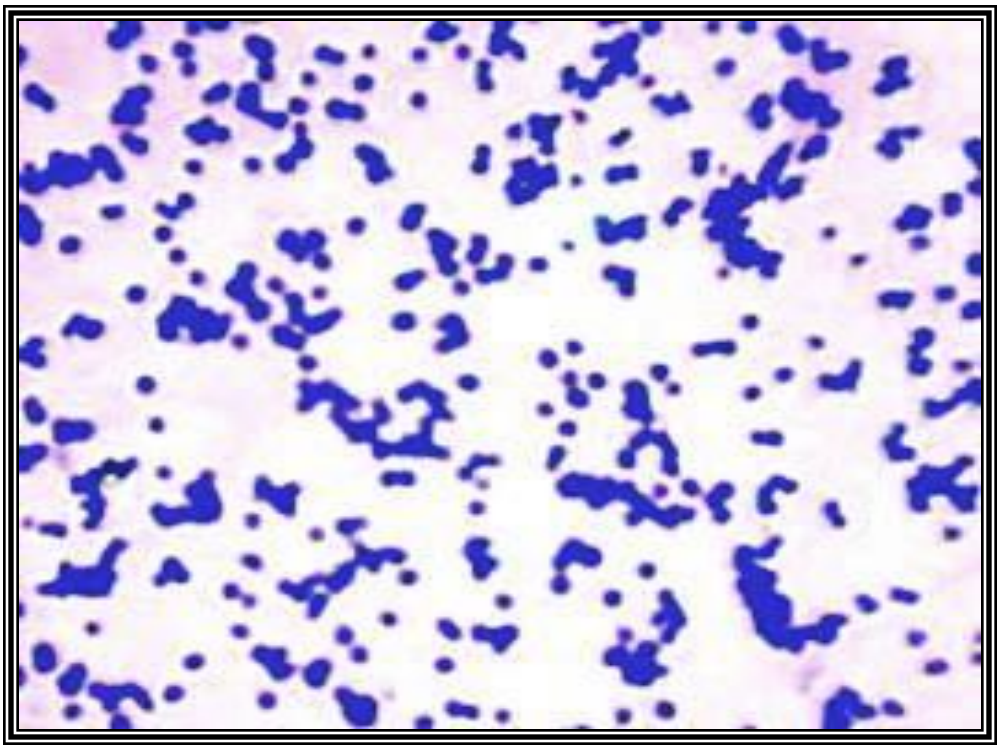


Figure III.2. Micrographie, prise au moyen d'un microscope optique, des cristaux sphériques de H_3 colorés avec une solution de bleu de coomassie

III.2.1.3. Pourcentage de récupération des cristaux

Les cristaux purifiés ont été séchés à l'air (à l'abri de la lumière) et pesés. Après dissolution alcaline des protéines des toxines obtenues dans le milieu de culture comme il a été décrit dans la **partie II.7.3 du chapitre Matériels et Méthodes,** la concentration des protéines a été estimée par la méthode de Bradford (**partie II.7.4 du chapitre Matériels et Méthodes**). Le rendement de récupération des cristaux a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de récupération} = \frac{\text{Masse sèche des cristaux purs x 100}}{\text{Masse des protéines des toxines dans le milieu de culture}}$$

Une masse de l'ordre de 10 mg de cristaux purs à 99 % a été extraite à partir de 35 mL du milieu de culture ayant une concentration de protéines de toxines de 0,65 $g.L^{-1}$, ce qui correspond à un pourcentage de récupération de 44 %.

III.2.1.4. Effet de la méthode de purification sur la composition en protéines des cristaux

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure III.3) montre que les protéines qui composent les cristaux avant et après purification sont identiques. Elles n'ont donc pas été affectées et il n'y a pas eu protéolyse lors de la purification.

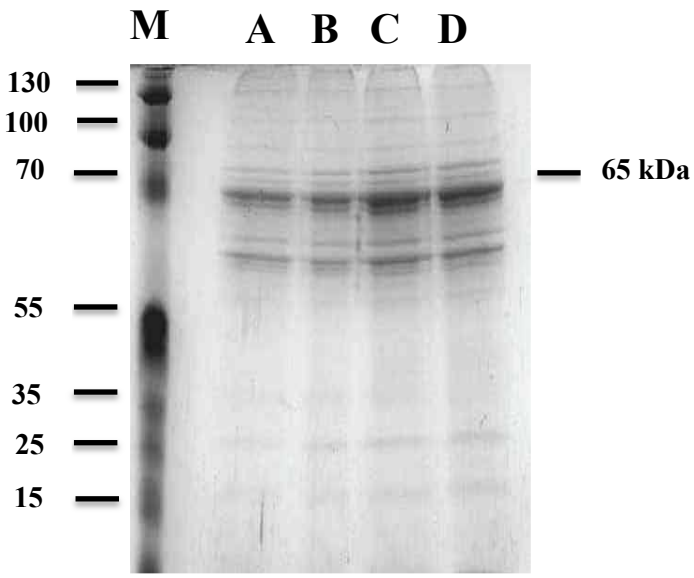


Figure III.3. Gel de polyacrylamide des cristaux de H_3 avant (A, B) et après purification (C, D), M : marqueur de la taille des protéines

III.2.1.5. Test de toxicité des cristaux purifiés par la nouvelle méthode

Pfannenstiel *et al*. (1985) ont utilisé 10 solvants organiques différents pour solubiliser des cristaux de protéines de *B.thuringiensis israelensis*. Ils ont testé la toxicité contre les larves d'insectes de ces cristaux. Les toxines se sont avérées efficaces pour tous les solvants à des concentrations inférieures ou égales à 10 %. Suite à ces observations, dans notre protocole, le solvant organique a été ajouté avec un rapport inférieur ou égal à 10 % en vue de minimiser le risque d'altération des cristaux.

La toxicité des cristaux purifiés par la nouvelle méthode a été comparée à celle des cristaux purifiés par la méthode de flottation de Sharpe *et al*. (1978) qui a été décrite dans la **partie II.4 du chapitre Matériels et Méthodes.** Comme il est montré dans la figure III.4, le nouveau protocole d'extraction n'affecte pas la toxicité des cristaux de H_3 contre les larves d'*Anopheles gambia*. Les variations des pourcentages de survivants parmi les larves traitées par des cristaux purifiés soit par la méthode de flottation ou par la nouvelle méthode ont été similaires pour deux concentrations différentes de cristaux de 20 et 50 µg/mL.

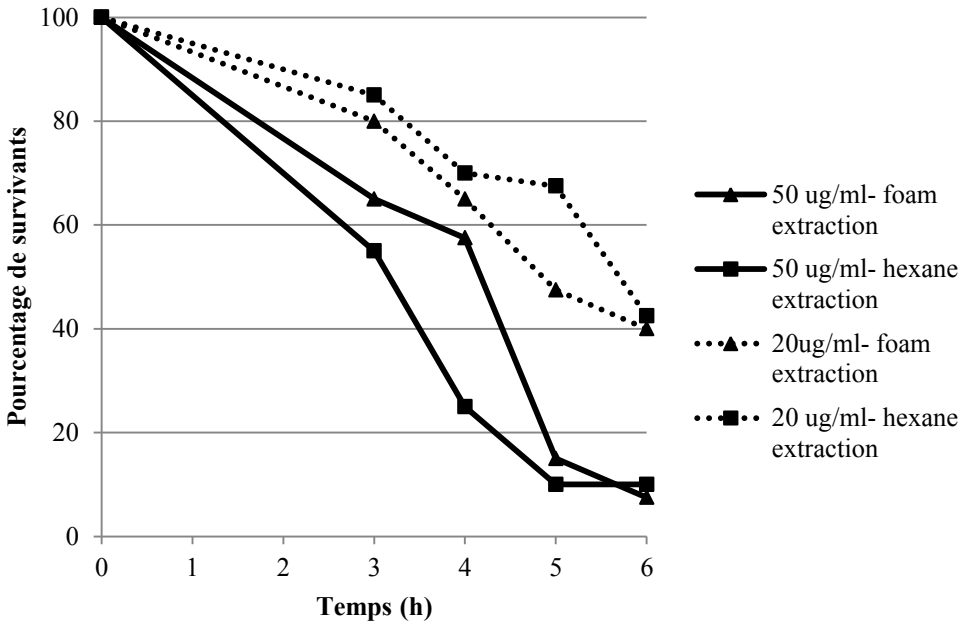


Figure III.4. Survie des larves *Anopheles gambia*, au quatrième stade larvaire, infectées avec des toxines purifiées de H_3. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes. Les mêmes résultats ont été obtenus sur des larves au troisième stade larvaire

III.2.2. Séparation des spores et cristaux de la souche Lip de *B.thuringiensis*

Le procédé de purification a été également testé pour séparer les cristaux d'une autre souche de *B.thuringiensis* "Lip" qui produit des cristaux bipyramidaux et quelques cristaux cubiques. Environ 67 mg de cristaux 99 % purs ont été obtenus à partir de 35 ml de milieu de culture ayant une concentration de protéines de 2,04 $g.L^{-1}$, ce qui correspond à un rendement de récupération de 92 %. La concentration en protéines de toxines déterminée dans un milieu de culture "Lip" a été trois fois supérieure à celle obtenue dans un milieu de culture H_3. Les cristaux de Lip sont plus grands et ont une teneur plus élevée en protéines que les cristaux de H_3, ce qui pourrait expliquer le taux de récupération plus élevé de ces cristaux. La microscopie optique a montré que les préparations de cristaux bipyramidaux de "Lip" sont morphologiquement purs (Figure III.5).

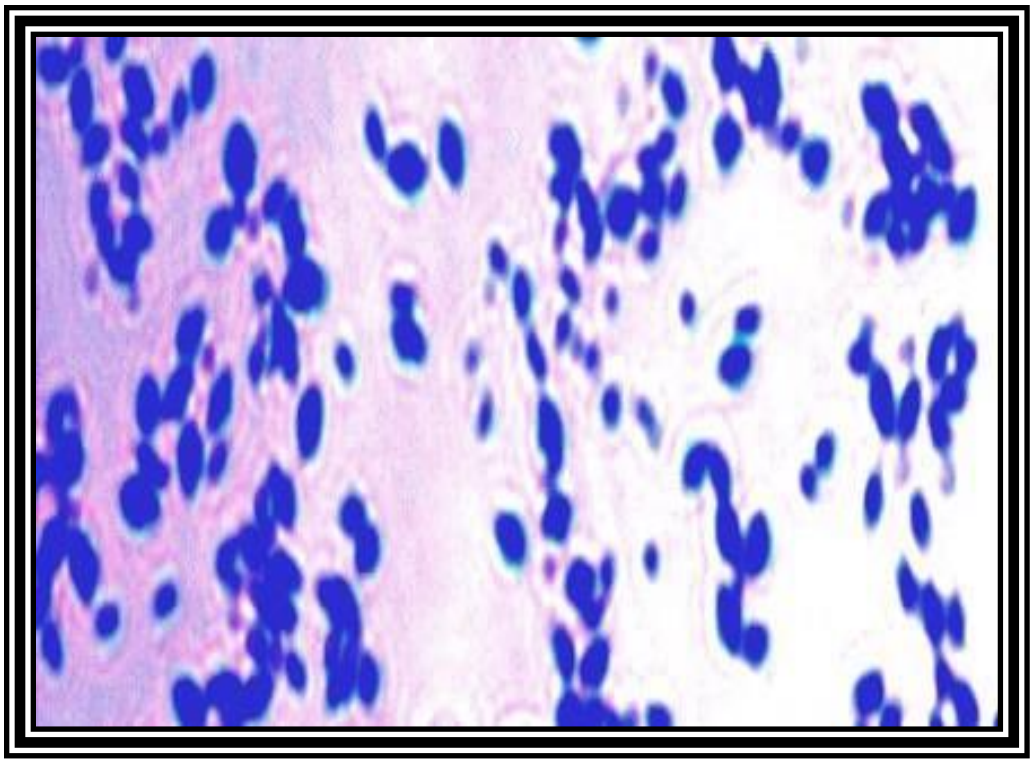


Figure III.5. Micrographie, prise au moyen d'un microscope optique, des cristaux de Lip colorés avec une solution de bleu de coomassie

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique intitulée « A simple separation method of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals » et publiée dans le journal « Microbiological Methods », 10/2014.

III.3. Essais de quantification et caractérisation des cristaux de *B.thuringiensis* par une méthode optique « laser speckle »

La concentration des cristaux dans le produit de fermentation de *B.thuringiensis* peut être déterminée par comptage microscopique sur une cellule de Petroff Hausser après coloration des cristaux par le bleu de coomassie comme il est décrit dans la partie II.4.2 du chapitre Matériels et Méthodes. Mais vu que les résultats de dénombrement par comptage visuel peuvent être influencés par l'opérateur, une méthode plus fiable et plus rapide a été recherchée pour la quantification des cristaux dans le produit *B.thuringiensis*.

La méthode optique « laser speckle » est une méthode non-destructive qui a été largement utilisée pour caractériser quantitativement l'activité d'un matériel biologique telles que la maturation de la viande (Amaral *et al*., 2013), la viabilité des graines (Braga *et al*., 2003) et la maturité des fruits (Nassif *et al*., 2012).

En collaboration avec le département de physique de l'Université Saint Joseph, des essais de quantification des cristaux de « Lip » par cette méthode ont été réalisés.

L'analyse des figures de « speckle » des échantillons de spores pures, cristaux purs et mélanges (50 % spores, 50 % cristaux) de « Lip » a montré que les valeurs normalisées du degré de polarisation linéaire ($NDOP_L$) diminuent avec l'augmentation de la concentration des diffuseurs (spores ou cristaux). Mais les valeurs de $NDOP_L$ obtenues dans le cas des spores ont été du même ordre que celles obtenues pour les échantillons de cristaux comme il est montré dans la Figure III.6. Ainsi, il n'est pas possible de distinguer les spores par rapport aux cristaux de « Lip » par cette méthode. Ceci peut être justifié par le fait que les spores et les cristaux bipyramidaux de « Lip » sont du même ordre de taille. La méthode « laser speckle » ne s'est donc pas révélée efficace pour la quantification des cristaux de « Lip » dans le produit de fermentation de *B.thuringiensis.*

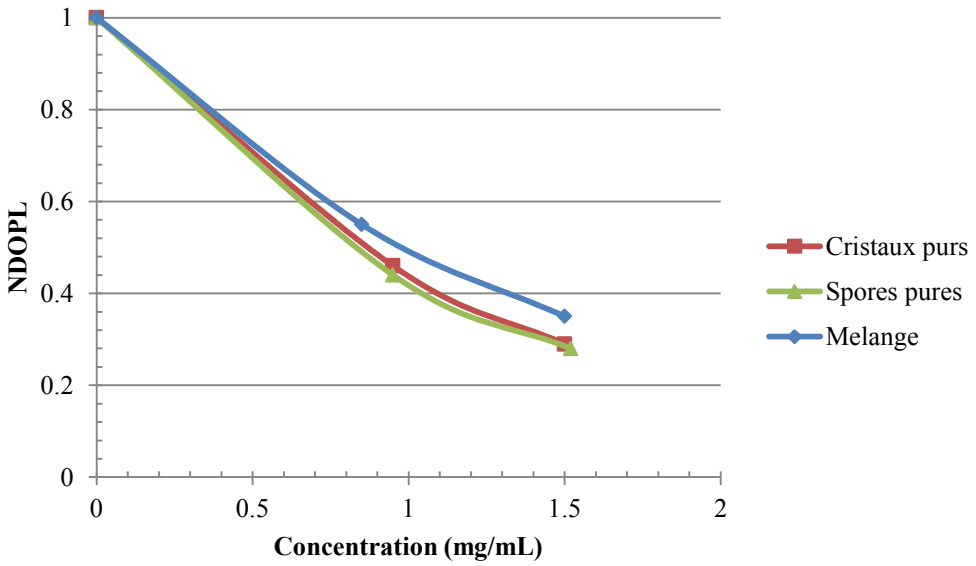


Figure III.6. Variation du degré de polarisation linéaire en fonction de la concentration des diffuseurs

Cette méthode a été également utilisée pour distinguer des tailles de cristaux sphériques de trois souches différentes de *B.thuringiensis* isolées à partir du sol Libanais et désignées par H_3, D10 et G6. Ces 3 souches produisent des cristaux sphériques de tailles différentes dont le diamètre moyen a été déterminé par microscopie électronique. Pour une même concentration de cristaux, le degré de polarisation linéaire donné par la méthode « laser speckle » a diminué avec la valeur moyenne du diamètre des cristaux (tableau III.1).

Tableau III.1: Variation du degré de polarisation en fonction de la taille des cristaux pour deux concentrations différentes

Concentration ($mg.ml^{-1}$)	0.50 ± 0.01			1.50 ±0.01		
Souche	D10	H_3	G6	D10	H_3	G6
Diamètre des cristaux (µm)	1	0,5	0,2	1	0,5	0,2
$NDOP_L$	0.42 ± 0.040	0.4 ± 0.001	0.38 ± 0.010	0.22 ± 0.010	0.17 ± 0.006	0.145 ± 0.010

Les résultats obtenus sont prometteurs car ils laissent penser qu'il sera possible d'utiliser cette méthode optique pour caractériser la taille des cristaux (après séparation des spores par la méthode de purification proposée). Cette information, difficile à obtenir car nécessitant un microscope électronique, pourrait permettre de relier taille des cristaux et concentration spécifique en protéines des cristaux, et peut être trouver un lien avec l'efficacité de lutte contre les insectes.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique intitulée « Characterization of *Bacillus thuringienis* parasporal crystals using laser speckle technique: effect of crystals concentration and dimension » et soumise au journal « Applied Optics ».

III.4. Conclusions

- **Le procédé de purification développé a été efficace pour séparer les spores des cristaux de deux souches distinctes de *B.thuringiensis* ayant différentes formes de cristaux, avec un rendement élevé de récupération de cristaux purs. L'utilisation de ce procédé de purification rendra facile et rapide la préparation de cristaux de grande pureté de *B.thuringiensis*, sans avoir besoin d'ultracentrifugation ou de matériel coûteux. Ces cristaux purs sont utiles comme standards pour la mise au point de méthode de quantification et caractérisation des cristaux et peuvent également servir à la réalisation de tests témoins.**

- **La méthode « laser speckle » ne s'est pas montrée convenable pour la quantification des cristaux dans le produit de fermentation de « Lip », vu la similarité des caractéristiques de diffusion des spores et des cristaux. Par contre, une nouvelle piste a été ouverte pour la caractérisation de la taille des cristaux en utilisant cette méthode ce qui pourrait être utile pour comprendre le lien entre cristaux, concentration en protéines et efficacité du produit. Faute de temps, cette étude n'a malheureusement pu être réalisée dans cette thèse.**

- **Pour la suite, dans notre travail d'optimisation de la production, le dosage des protéines totales et la détermination de la concentration des cristaux par comptage microscopique seront systématiquement réalisés. La corrélation entre ces deux paramètres d'évaluation du produit sera étudiée.**

QUATRIÈME CHAPITRE

MISE AU POINT D'UN NOUVEAU MILIEU DE CULTURE

IV.1. Introduction

Comme il a été montré dans la revue bibliographique, la croissance et la sporulation de *B.thuringiensis* ainsi que la synthèse des cristaux de δ-endotoxines exigent la présence de certains nutriments dans le milieu de culture : une source de carbone tel que le glucose, des sources d'azote organique tels que la peptone ou l'extrait de levures et inorganique comme le sulfate d'ammonium, et des sels minéraux (Dulmage, 1970 ; Nickerson et Bulla, 1974). Des ions métalliques tels que Ca^{2+}, Mg^{2+}, et Mn^{2+} sont également essentiels pour la croissance de *B.thuringiensis* et les ions potassium sont aussi nécessaires pour la production des cristaux de δ-endotoxines.

L'analyse bibliographique montre que des milieux synthétiques contenant les éléments précédemment cités sont généralement utilisés dans les études du laboratoire. Mais, ces substrats synthétiques sont chers. Ainsi, à l'échelle industrielle, ils sont remplacés par des sous-produits ou des déchets de l'agro-industrie en vue de réduire le coût de la production de *B.thuringiensis*. Cette approche permet aussi de valoriser des déchets. Pour différents résidus et sous-produits de l'agro-industrie utilisés comme sources de protéines dans la production de *B.thuringiensis* (partie I.6.4 du chapitre Synthèse Bibliographique) des compléments en carbohydrates (glucose, amidon ou molasses) et/ou sources de minéraux ont toujours été ajoutés au milieu de culture.

Le prix et la disponibilité locale sont des facteurs importants dans le choix d'une source alternative de nutriments pour la production industrielle de *B.thuringiensis*. Avec ces critères, le son de blé a été choisi dans cette étude. C'est un sous-produit de la minoterie de blé, disponible au Liban à faible prix et en quantité considérable. Il représente une bonne source de protéines et de minéraux tels que le phosphore, le calcium, le magnésium, le fer, le cuivre et le zinc (Chee *et al*., 2005) en plus d'être une source riche en carbohydrates (Shenoy et Prakash, 2001). Il a été largement utilisé comme source de carbone pour la production d'enzymes telles que la lipase par *Bacillus megatarium* AKG1 (Sekhon *et al*., 2004), α-amylase par *Bacillus cereus* MTCC 1305 (Anto *et al*., 2006a), et pour la production de divers métabolites intéressants. La bacitracine a été produite par *Bacillus lichenformis* en utilisant le son de blé et la farine de soja avec un rapport de 1 :3 (Farzana *et al*., 2005). Bandelier *et al*. (1997) ont rapporté la production d'une hormone de plante, l'acide gibbérellique par Gibberella fujikuroi, en employant le son de blé dans une fermentation en phase solide. Cependant, pour la production de *B.thuringiensis,* les études sur

l'utilisation du son de blé sont limitées. Seuls, Devi *et al*. (2005) ont utilisé le son de blé mais en le supplémentant avec des mélasses et de l'extrait de levures pour la production en masse de *B.thuringiensis kurstaki* dans des fermentations semi-solides.

Dans ce chapitre, les différentes étapes menés pour la mise au point d'un milieu de culture à base de son de blé sont présentées :

- Mise au point d'un nouveau milieu, en erlenmeyer 1L, permettant une croissance et une production de cristaux.
- Essais pour améliorer cette production et comprendre la consommation des sucres du son de blé par les 2 souches « Lip » et « H_3 ».
- Comparaison du milieu à des milieux de la littérature pour la production de « Lip » et « H_3 ».

IV.2. Mise au point d'un nouveau milieu de culture

IV.2.1. Choix des milieux de référence

Pour évaluer l'efficacité relative du milieu à base de son de blé, il est nécessaire de le comparer à des milieux de références de la bibliographie. Deux milieux ont été choisis. Le premier est le milieu Anderson (Anderson, 1990) qui est un milieu synthétique riche contenant tous les éléments requis pour la croissance, la sporulation de *B.thuringiensis* et la production de δ-endotoxines, avec un rapport C:N empêchant la chute du pH à une valeur inférieure à 5,6. Il a été utilisé par plusieurs auteurs pour l'étude de la production de *B.thuringiensis kurstaki* (Anderson,1990 ; Rivera *et al*., 1998 ; Amin *et al*., 2008).

Le deuxième milieu de référence est un milieu semi synthétique à base de farine de soja qui a été utilisé comme milieu témoin par plusieurs auteurs (Montiel *et al*., 2001 ; Yezza *et al*., 2006b, Vu *et al*., 2012).

IV.2.2. Formulation du nouveau milieu alternatif

La démarche a consisté dans un premier temps à cultiver la souche « Lip » dans le milieu de référence Anderson. La concentration obtenue en protéines de toxines a été de de 1g.L^{-1}. Une série d'expériences a ensuite été réalisée en substituant chacune des sources de nutriments dans le milieu Anderson par du son de blé, à un pourcentage de 3 % (m/v). Les concentrations en toxines produites sont présentées dans le tableau IV.1. Le pourcentage du son de blé de 3 % a été choisi en considérant que 34 % du son de blé est de l'amidon (Palmarola-Adrados *et al*., 2005), et ainsi, à un pourcentage de 3 % de son dans le milieu de culture correspond une concentration en équivalent glucose du même ordre que celle présente dans le milieu Anderson (de l'ordre de 10 g.L^{-1}).

Tableau IV.1. Effet de substitution de chacune des sources de nutriments du milieu Anderson par du son de blé 3 % (m/v) sur la concentration des toxines et des cristaux

Milieu de Culture	Cristaux ± SD (cristal/mL)	Protéines de toxines ± SD (g.L^{-1})
Milieu 1 : Anderson, 1990	$1{,}79.10^9 \pm 0{,}65.10^8$	1 ± 0.04
Milieu 2 : Milieu Anderson où glucose, extrait de levures, bactopeptone et $(NH_4)_2SO_4$ (sources de carbohydrate et d'azote sont substituées par du son de blé 3 % (m/v)	$0{,}98.10^9 \pm 0{,}68.10^8$	1,3 ± 0,04
Milieu 3 : Milieu 2 sans minéraux ($MgSO_4.7H_2O$; $ZnSO_4.7H_2O$ $CuSO_4$; $MnSO_4.7H_2O$)	$0{,}94.10^9 \pm 0{,}65.10^8$	1.27 ± 0.02
Milieu 4: Milieu 3 sans fer, citrate et calcium ($CaCl_2.2H_2O$; Fe-Citrate)	$0{,}92.10^9 \pm 0{,}66.10^8$	1.22 ± 0.04
Milieu 5: Milieu 3 sans phosphate et potassium (KH_2PO_4; K_2HPO_4)	$0{,}97.10^9 \pm 0{,}69.10^8$	1.26 ± 0.02
Milieu 6: Son de blé 3% (w/v)	$0{,}95.10^9 \pm 0{,}68.10^8$	1.25 ± 0.03

Quand les sources de carbone et d'azote du milieu Anderson ont été remplacées par du son de blé à un pourcentage de 3 % (m/v), la concentration des protéines de toxines produites a

augmenté de 1 à 1,3 $g.L^{-1}$ alors que la concentration des cristaux a diminué presque de moitié. Le milieu son de blé permet donc d'obtenir moins de cristaux que le milieu Anderson mais ces cristaux ont des tailles ou des teneurs en protéines beaucoup plus importantes. Les concentrations des cristaux et celles des toxines obtenues dans les milieux 3, 4, 5 et 6, comparées à celles obtenues dans le milieu 2 par un test de Student au niveau $p < 0,05$, n'ont pas été significativement différentes. Ces résultats montrent que le son de blé à un rapport de 3 % (m/v) est non seulement suffisant pour substituer les sources de carbohydrates, de protéines, de minéraux et d'oligoéléments du milieu Anderson mais est plus efficace pour la production de protéines de toxines.

IV.2.3. Optimisation de la quantité du son de blé dans le milieu de culture

Différents rapports de son de blé ont été testés pour des cultures de « Lip » en erlenmeyer de 1 L, en vue de d'améliorer si possible la production de toxines. Pour un pourcentage de son entre 1 et 6 % (m/v), une augmentation proportionnelle de la concentration en protéines des toxines a été observée (Figure IV.1). Par ailleurs, pour cet intervalle de % de son de blé, la concentration des cristaux, déterminée par comptage direct sur une cellule de Petroff Hausser, a également augmenté proportionnellement à la concentration en son de blé. Concentration en cristaux et concentration en protéines ont donc été parfaitement corrélées sur cet intervalle (Figure IV.1).

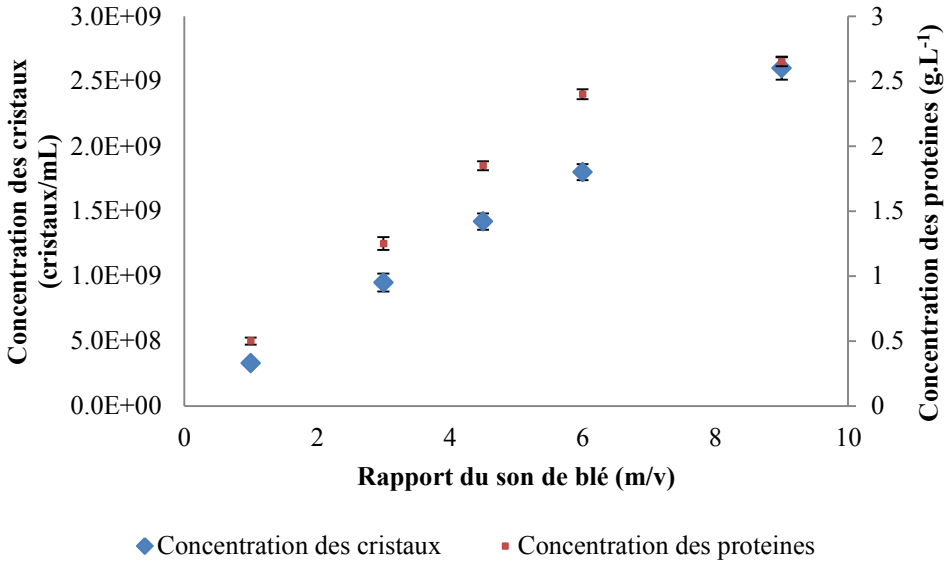


Figure IV.1. Variation de la concentration des cristaux et de la concentration des protéines avec le pourcentage de son dans le milieu de culture

Par contre, une augmentation supplémentaire du pourcentage de son de blé dans le milieu de culture (de 6 % à 9 %) a abouti à une augmentation toujours proportionnelle de la concentration des cristaux mais pas de la concentration des toxines. Les cristaux produits à 9 % ont donc été moins riches en protéines que ceux produits à des % inférieurs.

Le rendement en toxines, défini comme étant le rapport de la concentration des protéines sur le pourcentage de son de blé a ainsi diminué de 40 mg de protéines/g de son pour des pourcentages de son inférieurs à 6 % à 29,4 mg/g pour un pourcentage de son de 9 % (Figure IV.2).

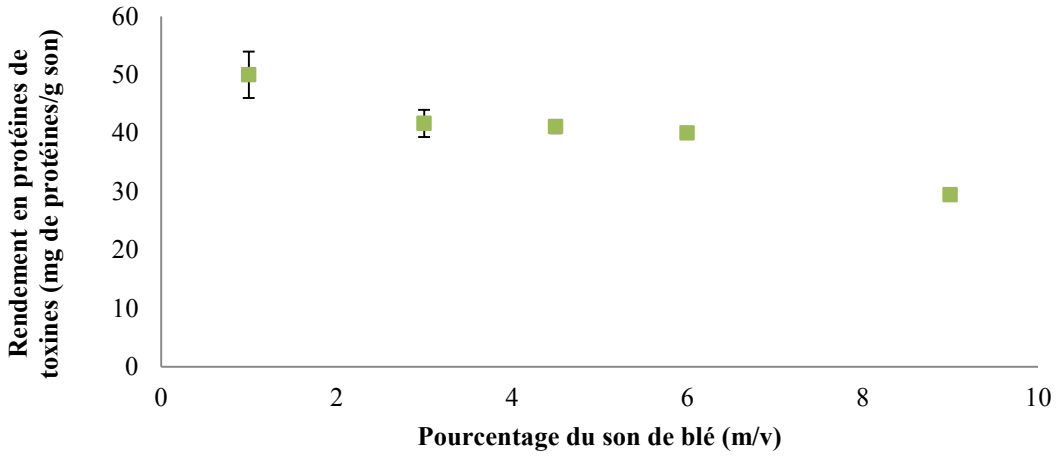


Figure IV.2. Rendement en protéines de toxines par rapport au pourcentage de son de blé dans le milieu de culture

IV.2.4 Essais d'enrichissement du milieu son de blé par une autre source de protéines ou de carbohydrates

Afin d'améliorer la production des δ-endotoxines, des tests ont été réalisés en enrichissant le milieu 6 % son de blé par une source directement assimilable de carbohydrates ou de protéines. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2. Effet de la supplémentation du milieu son de blé 6 % par une autre source de carbohydrates ou de protéines sur la concentration des δ-endotoxines

Composition du milieu de culture	Cristaux (cristaux/mL)	Protéines de toxines ($g.L^{-1}$)
Son de blé 6 %	$1,80.10^9 \pm 0,66.10^8$	2,40 ± 0,035
Son de blé 6 % + glucose 5 $g.L^{-1}$	$1,92.10^9 \pm 0,65.10^8$	2,57 ± 0,035
Son de blé 6 % + extrait de levures 1 $g.L^{-1}$	$1.85.10^9 \pm 0,66.10^8$	2,47 ± 0,034
Son de blé 6 % + $(NH_4)_2SO_4$ 1 $g.L^{-1}$	$1,61.10^9 \pm 0,62.10^8$	2,12 ± 0,033

L'ajout de l'extrait de levures (comme source d'azote) à une concentration de 1 $g.L^{-1}$ n'a pas eu un effet significatif sur la concentration des δ-endotoxines alors qu'elle a diminué après addition de 1 $g.L^{-1}$ de sulfate d'ammonium. La synthèse des δ-endotoxines a été améliorée seulement de 7 % avec ajout de 5 $g.L^{-1}$ de glucose (ce qui correspond à une augmentation d'environ 25 % du substrat carboné) mais la durée de la fermentation (identifiée par la libération de 90 % des spores) a augmenté, passant de 48 à 72 h.

IV.2.5. Test de l'efficacité de l'extrait liquide du son de blé pour la production de « Lip »

En vue de tester l'efficacité de l'utilisation de l'extrait liquide du milieu « son de blé » pour la production de « Lip », un milieu 6 % son a été autoclavé pendant 20 min à 120ºC puis filtré pour éliminer les plus grosses particules (diamètre des pores de 1 mm). Le filtrat a été utilisé pour cultiver « Lip » en erlenmeyers de 1 L. La concentration des toxines obtenue n'a été que de 0,6 $g.L^{-1}$ contre 2,4 $g.L^{-1}$ quand le milieu solide-liquide est utilisé et la concentration des cristaux a diminué de $1,8.10^9$ à $0,44.10^9$ cristaux/mL.

IV.2.6. Discussions des résultats

Le son de blé s'est montré efficace pour être utilisé comme milieu de culture pour la production de δ-endotoxines par la souche de *B. thuringiensis kurstaki* « Lip ». Les quantités de minéraux et d'ions métalliques qu'il contient ne se sont pas avérées limitantes en proportion à ses sources

d'azote et de carbone puisque des ajouts n'ont pas amélioré la production de protéines de toxines. Pour des quantités équivalentes de carbohydrates, il s'est même révélé plus efficace pour la production des δ-endotoxines que le milieu Anderson, milieu synthétique utilisé dans plusieurs études. Un pourcentage de son de blé de 6 % s'est révélé être un bon compromis entre la quantité produite de δ-endotoxines et le rendement protéine/substrat dans des fermentations réalisées en erlenmeyers de 1 L.

La corrélation linéaire entre nombre de cristaux et concentration en protéines observée pour des % de son de blé de 1 à 6 % n'a plus été respectée pour un milieu à 9 % de son de blé. Le plus faible rendement en toxines obtenu dans ce milieu pourrait être dû à une limitation en dioxygène qui donnerait des cristaux moins riches en protéines. Une autre possibilité pourrait être une répression catabolique de la synthèse des δ-endotoxines due à des concentrations élevées du substrat (Zouari *et al*., 2002).

La supplémentation du milieu 6 % son de blé par une autre source de carbohydrates ou de protéines a conduit à une diminution ou à une faible augmentation de la concentration des toxines. Ces résultats suggèrent que le rapport C :N dans ce milieu est optimal pour la production des δ-endotoxines ou que là encore c'est le dioxygène qui est limitant et non pas les sources de carbone ou d'azote.

L'extrait liquide du milieu son de blé 6 % a été testé pour la production de « Lip ». La faible concentration des toxines obtenue suggère que les nutriments requis pour la production des δ-endotoxines ne sont pas tous extraits du son de blé durant l'autoclavage et qu'une activité enzymatique de la bactérie est nécessaire pour rendre disponible les nutriments du son de blé pendant la fermentation (Gowda et Shuvakumar, 2014).

IV.3. Analyse de la consommation des sucres du son de blé dans des cultures de *B.thuringiensis*

IV.3.1. Cultures de « Lip »

Le son de blé contient principalement des carbohydrates sous forme de polymères : cellulose, hémicellulose et amidon. Des échantillons solides de son de blé avant et en fin de fermentation ont été soumis au protocole d'hydrolyse acide décrit dans **la partie II.7.5.1 du chapitre**

Matériels et Méthodes en vue d'extraire et d'hydrolyser les carbohydrates. Les sucres obtenus ont été analysés par HPLC. Le test à l'eau iodée ayant mis en évidence la présence d'amidon dans la phase liquide en fin de la fermentation, le même protocole d'extraction, d'hydrolyse et d'analyse par HPLC a été réalisé pour déterminer le potentiel de carbohydrate restant dans la phase liquide. La masse de son récupérée en fin de fermentation, après séchage, a été déterminée et s'est avérée égale au tiers de la masse initiale. Toutes ces données ont été utilisées pour effectuer un bilan matière sur les sucres au cours de la fermentation de *B.thuringiensis* dans 50 mL du milieu 6 % son de blé.

Les résultats présentés dans le tableau IV.3 donnent les masses des sucres dosés par HPLC après hydrolyse des échantillons. La quantité consommée de 0,972 g de carbohydrates « équivalent glucose » représente 66,5 % de la masse de carbohydrates « équivalent glucose » du son initial et 32,4 % de la masse totale du son. Les masses de carbohydrates « équivalent xylose » et « équivalent arabinose » présentes dans le son initial ont été intégralement retrouvées en fin de fermentation pour 40 % environ en phase liquide et 60 % en phase solide. Les bactéries n'ont donc pas utilisé les pentoses (xylose et arabinose) qui dérivent de l'hydrolyse de l'hémicellulose du son de blé.

Tableau IV.3. Consommation des sucres durant la fermentation de « Lip » dans 50 mL du milieu son de blé 6 % dans des expériences au niveau des erlenmeyers de 1 L

	Son initial (a)	Son final (b)	phase liquide à T_f (c)	Sucres consommés (a-(b+c))
Masse de glucose (g)	1.462 ± 0.047	0.221 ± 0.019	0.269 ± 0.025	0.972 ± 0.002
Masse de xylose (g)	0.503 ± 0.035	0.295 ± 0.016	0.205 ± 0.019	0.003 ± 0.0008
Masse d'arabinose (g)	0.287 ± 0.029	0.178 ± 0.023	0.105 ± 0.005	0.004 ± 0.0002

T_f: le temps correspondant à la fin de la fermentation

IV.3.2. Cultures de « H_3 »

La même procédure décrite dans **la partie IV.3.1** a été suivie pour déterminer la nature et les quantités des sucres du son de blé qui ont été consommées dans des cultures de 50 mL de H_3 en erlenmeyers de 1 L. Les résultats obtenus présentés dans le tableau IV.4 montrent que les souches H_3 ont consommé 1,094 g de carbohydrates « équivalent glucose » durant la fermentation dans le milieu 6 % son de blé ce qui représente 75 % de la masse de carbohydrates « équivalent glucose » dans le son initial et 36,5 % de la masse totale du son, du même ordre de grandeur donc que la souche « Lip ». Ces résultats montrent aussi que cette souche n'a pas consommé les carbohydrates « équivalent pentoses » (xylose, arabinose).

Tableau IV.4. Consommation des sucres durant la fermentation de « H_3 » dans 50 mL du milieu son de blé 6 % dans des expériences au niveau des erlenmeyers de 1 L

	Son initial (a)	Son final (b)	phase liquide à T_f (c)	Sucres consommés (a-(b+c))
Masse de glucose (g)	1.462 ± 0.047	0.211 ± 0.013	0.157 ± 0.025	1.094 ± 0.008
Masse de xylose (g)	0.503 ± 0.035	0.293 ± 0.021	0.206 ± 0.02	0.003 ± 0.0003
Masse d'arabinose (g)	0.287 ± 0.029	0.172 ± 0.023	0.112 ± 0.01	0.005 ± 0.0004

T_f: le temps correspondant à la fin de la fermentation

IV.3.3. Test de la capacité des souches « Lip » et « H_3 » à utiliser la cellulose

La vérification de la capacité des souches de *B.thuringiensis* (Lip et H_3) à dégrader la cellulose a été effectuée par repiquage sur un milieu gélosé de carboxyméthylcellulose (CMC). Après incubation à 30 ºC pendant 24 h, le milieu CMC est coloré avec du « Congo red » et décoloré avec du NaCl comme il a été décrit dans la **partie II.6 du chapitre Matériels et méthodes**. La

consommation du carboxyméthylcellulose par les bactéries est identifiée par la formation de halos autour des colonies.

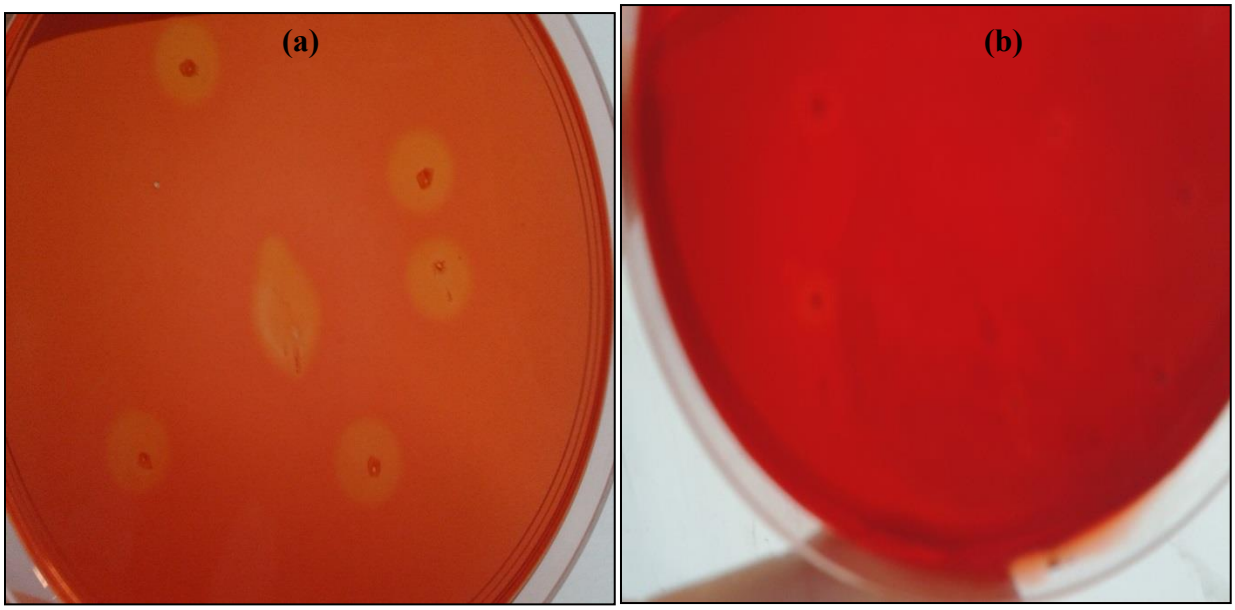


Figure IV.3. Test de « congo red » pour vérifier la capacité des souches de *B.thuringiensis* à dégrader la cellulose, (a) H_3 ; (b) Lip

Les colonies de H_3 ont montré un potentiel plus élevé de dégradation de la cellulose que celles de « Lip » comme il peut être déduit en comparant les diamètres des halos obtenus sur l'agar de carboxyméthylcellulose aux diamètres des colonies (Figure IV.3).

IV.3.4. Discussions des résultats

L'analyse de la consommation des sucres du son par « Lip » et par « H_3 » a montré que les deux souches n'ont pas utilisé les pentoses. La fermentation de xylose ou de l'arabinose par *B.thuringiensis* a été rarement rapportée. A notre connaissance, seule la souche *B.thuringiensis* IAM 12077 a été citée pour son utilisation du xylose pour la production de l'acide polyhydroxybutyrique (PHB) (Pal *et al*., 2009).

Sachant que l'activité amylase de *B.thuringiensis* a été prouvée par plusieurs auteurs (Kupussamy *et al*., 1990 ; Avignone-Rossa et Mignone, 1995 ; Zouari et Jaoua, 1999b) et

puisqu'il y avait des quantités restantes d'amidon dans la phase liquide à la fin de la fermentation, on suggère que le glucose qui a été consommé au cours de la fermentation de « Lip » et celle de « H_3 » dérivait en grande partie de l'hydrolyse de l'amidon du son de blé. Les masses de carbohydrates « équivalent glucose » consommées par « Lip » et « H_3 » représentaient 32,5 et 36,5 % de la masse du son, valeurs du même ordre que la proportion d'amidon dans le son de 34 % d'après Palmarola-Adrados *et al*. (2005). Il n'est cependant pas exclu qu'une partie de « l'équivalent glucose » consommé provienne de l'hydrolyse de la cellulose puisque les souches « Lip » mais surtout « H_3 » ont montré avec le test Congo red qu'elles étaient capables de dégrader ce polymère.

IV.4. Comparaison du milieu 6 % son de blé au milieu Anderson et au milieu standard semi synthétique

IV.4.1. Production de « Lip »

La souche « Lip » a été cultivée dans différents milieux, en erlenmeyers de 1 L, en vue de les comparer au milieu 6 % son de blé proposé. Les compositions des milieux ont été données dans le paragraphe II.1.3 du Chapitre Matériels et Méthodes. Les principales caractéristiques des cultures sur ces 4 milieux sont données dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5. Comparaison du milieu son de blé 6 % au milieu Anderson et au milieu standard semi synthétique pour la production de « Lip »

	Anderson 10 $g.L^{-1}$	Anderson 20 $g.L^{-1}$	Semi synthétique standard	Son de blé 6 %
Cellules (x 10^9 cellule/mL)	$2,05^{(a)}$	$3,90^{(b)}$	$1,98^{(a)}$	$1,96^{(a)}$
Spores (x 10^9 spores/mL)	$1,70^{(a)}$	$3,20^{(b)}$	$1,68^{(a)}$	$1,66^{(a)}$
Cristaux (x 10^9 cristaux/mL)	$1,79^{(a)}$	$3,50^{(b)}$	$1,78^{(a)}$	$1,80^{(a)}$
Protéines de toxines ($g.L^{-1}$)	$1,00^{(a)}$	$1,56^{(b)}$	$1,56^{(b)}$	$2,40^{(c)}$
Rendement relatif (mg de toxines /10^9 CFU)	$589,4^{(b)}$	$487,5^{(a)}$	$932,6^{(c)}$	$1447,4^{(d)}$
Glucose ou équivalent glucose consommé ($g.L^{-1}$)	$9,91^{(b)}$	$19,94^{(c)}$	$8,95^{(a)}$	$19,44^{(c)}$
Rendement en toxines par rapport au glucose consommé (mg toxines/g glucose)	$100,8^{(b)}$	$78,2^{(a)}$	$174,5^{(d)}$	$123,5^{(c)}$
Productivité (mg de toxines/L/h)	$30,3^{(a)}$	$32,5^{(b)}$	$43,4^{(c)}$	$50,0^{(d)}$
Coût de 1 L de chaque milieu ($)	1,8	2	3,9	0,006

Les valeurs dans une même ligne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes

La croissance, les concentrations des spores et celles des cristaux ont été du même ordre dans les milieux Anderson 10 $g.L^{-1}$ glucose, semi synthétique standard et son de blé 6 %. Dans les différents milieux, les concentrations des spores ont été légèrement inférieures à celles des cristaux ce qui peut être attribué à la différence dans les méthodes de comptage utilisées : comptage direct au microscope à l'aide d'une cellule de Petroff Hausser pour les cristaux, dénombrement après culture sur boîte du nombre de colonies formées pour les spores. L'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu Anderson à 20 $g.L^{-1}$ a abouti à une augmentation proportionnelle des concentrations des cellules, spores et cristaux mais pas de celle des protéines de toxines.

La concentration des protéines obtenues dans le milieu 6 % son de blé a été 2,4 et 1,54 fois plus grande que celles obtenues dans les milieux Anderson 10 $g.L^{-1}$ et semi synthétique standard respectivement.

La consommation de presque la même quantité de sucre dans le milieu Anderson 20 $g.L^{-1}$ et le milieu son 6 %, a abouti à une population de cellules plus élevée dans le milieu Anderson alors que la production des protéines de toxines a été plus importante dans le milieu son.

Les profils des protéines du complexe spore/cristal obtenues dans les différents milieux de culture, déterminées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ont été similaires comme il est montré dans la Figure IV.4. Des bandes de protéines de 130 et 65 kDa ont été principalement observées.

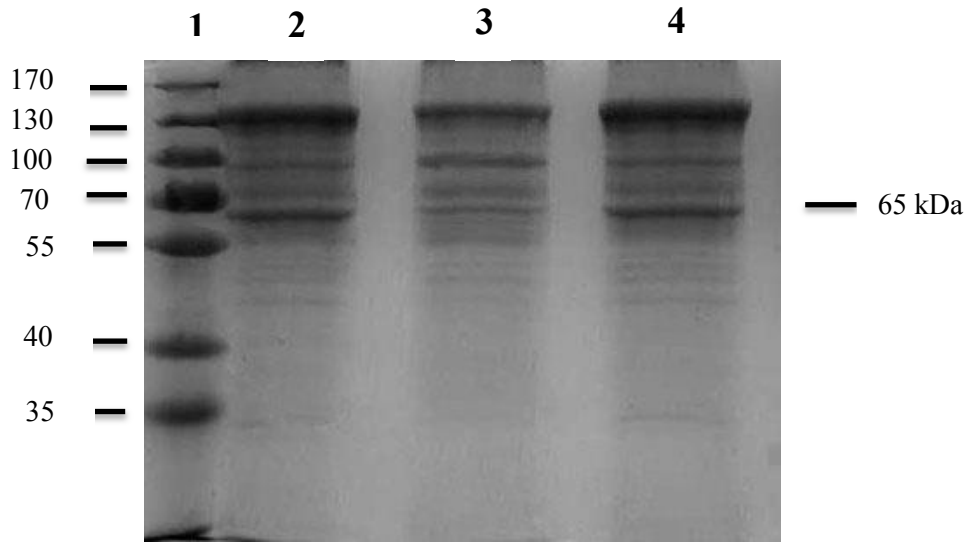


Figure IV.4: Analyse Comparative par SDS/PAGE des profils de protéines du complexe spore/cristal de "Lip" obtenus dans différents milieux de culture: 1: marqueur de taille des protéines; 2: milieu semi synthétique standard; 3: milieu Anderson 10 g.L $^{-1}$ de glucose, 1990; 4: milieu son de blé 6 %

IV.4.1.1. Discussions des résultats

Une croissance similaire mais différentes concentrations de δ-endotoxines ont été obtenues dans trois milieux (Anderson 10 g.L^{-1}, semi synthétique standard et son de blé 6 %). La taille, la forme et la quantité des toxines dans les cristaux peuvent être affectées par la composition du milieu de culture (Sherrer *et al*., 1973 ; Faloci *et al*., 1993 ; Farerra *et al*., 1998). Cela est le cas ici. Différentes sources de protéines et carbohydrates ont été utilisées dans les trois milieux comparés ce qui peut justifier la différence de la concentration des δ-endotoxines dans les cristaux synthétisés. Keshavarsi *et al*. (2005) ont étudié la relation entre les quantités obtenues du complexe spore /cristal et les constituants biochimiques, notamment les carbohydrates et les protéines, du milieu de culture et ils ont trouvé que le milieu optimal, en termes de composition des protéines, contient des niveaux élevés d'acide glutamique qui est l'acide aminé le plus abondant dans les protéines des cristaux (Fast, 1981). Ceci va dans le sens de nos résultats pour lesquels la concentration la plus élevée de δ-endotoxines a été obtenue dans le milieu son de blé où les acides aminés majoritaires sont principalement l'acide glutamique (18,6 %) et l'acide

aspartique (7,2 %) (Shewry *et al*., 2009). La farine de soja contient surtout de la leucine et de l'arginine (Dulmage, 1990).

D'autre part, plus de carbohydrates « équivalent glucose » ont été consommés dans le milieu son de blé 6 % alors que les concentrations des cellules obtenues dans les milieux Anderson 10 $g.L^{-1}$ glucose, semi synthétique standard et son de blé 6 % n'ont pas été significativement différentes. Le glucose dans les milieux Anderson et semi synthétique standard a été peut être utilisé par « Lip » comme une source d'énergie alors que la source de carbone pourrait être l'extrait de levures ou la farine de soja. La plus grande consommation de glucose dans le milieu son de blé pourrait s'expliquer par l'utilisation de glucose (dérivant de l'amidon) comme une source de carbone et d'énergie à la fois. Une autre explication pourrait être qu'une part du glucose consommé a été utilisée pour la formation d'autres métabolites. De plus, la masse sèche de la population des cellules n'a pas été déterminée alors qu'elle peut être différente dans les différents milieux de culture.

Le rendement en protéines de toxines par rapport au glucose consommé obtenu dans le milieu son de blé 6 % a été plus élevé que dans le milieu Anderson 20 $g.L^{-1}$.Il semble donc que le flux métabolique de glucose dans le milieu Anderson 20 $g.L^{-1}$ a été dirigé vers la croissance en priorité alors qu'il a été en partie orienté vers la synthèse des toxines dans le milieu complexe de son de blé. L'effet positif du milieu complexe pour la culture de *Bacillus* a également été observé par d'autres auteurs (Montiel *et al*, 2001; Vidyarthi *et al*, 2002).

Les profils de protéines similaires obtenues dans les trois milieux de culture ont montré que ce n'était pas la nature des protéines qui expliquaient les différences de rendement relatif (protéines/cristaux) mais bien que la plus grande concentration des protéines de toxines obtenue dans le milieu son de blé correspondait à une concentration plus élevée de δ-endotoxines.

Les δ-endotoxines étant les composés les plus importants dans le biocontrôle (Yang et Wang, 1998), l'optimisation de la fermentation de *B.thuringiensis* vise à augmenter la productivité de ces toxines. Notre travail a montré que le milieu 6 % son de blé permet la plus grande productivité de δ-endotoxines par rapport aux 2 milieux de références testés. D'autre part, comme le son est un sous-produit de l'agro-industrie, le coût de la préparation du milieu 6 % son

de blé s'avère négligeable comparé au milieu Anderson et au milieu semi synthétique puisqu'il est 300 et 650 fois moins cher que ces deux milieux.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique intitulée « Evaluation of a cereal milling byproduct for the low cost production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* in submerged fermentation » et publiée dans le journal « European Journal of Biotechnology and Bioseciences » 6/ 2014.

IV.4.2. Production de H_3

L'efficacité du milieu son de blé a été testée pour une autre souche de *B.thuringiensis*, la souche H_3 qui est toxique contre les diptères. La culture dans ce milieu a également été comparée aux cultures dans les milieux Anderson et semi synthétique standard en erlenmeyers de 1 L (tableau IV.6).

Tableau IV.6. Comparaison du milieu son 6 % son de blé au milieu Anderson et au milieu standard semi synthétique pour la production de « H_3 »

	Anderson, 1990	Standard semi synthétique	6 % son de blé
Cellules (x10^9 cellule.mL^{-1})	2,77$^{(a)}$	2,78$^{(a)}$	4,58$^{(b)}$
Spores (x10^9 spores.mL^{-1})	1,12$^{(a)}$	1,79$^{(b)}$	3,29$^{(c)}$
Cristaux (x10^{9}cristaux.mL^{-1})	0,94$^{(a)}$	1,78$^{(b)}$	2,70$^{(c)}$
Protéines des toxines (g.L^{-1})	0,35$^{(a)}$	0,68$^{(b)}$	1,95$^{(c)}$
Pourcentage de sporulation	40,4$^{(a)}$	64,4$^{(b)}$	71,8$^{(c)}$
Rendement (mg de toxines /10^9 CFU)	312,5$^{(a)}$	382,7$^{(b)}$	722,2$^{(c)}$
Productivité (mg de toxines/L/h)	11,7 $^{(a)}$	19,0 $^{(b)}$	40,6$^{(c)}$

Les valeurs dans une même ligne qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes

La culture de H_3 dans le milieu son de blé 6 % a donné des concentrations élevées de spores et de δ-endotoxines de 3,29.10^9 spore.mL^{-1} et 1,95 g.L^{-1} respectivement. En comparaison avec le milieu Anderson et le milieu complexe à base de soja et d'amidon, la croissance de H_3 a été plus importante dans le milieu son de blé. Le pourcentage de sporulation et la concentration des

spores et des δ-endotoxines synthétisées ont été aussi plus élevées dans le milieu son. La comparaison des rendements relatifs, obtenus dans les différents milieux de culture, montre que les cristaux formés dans le milieu son sont de plus grandes dimensions et contiennent davantage de δ-endotoxines.

IV.4.2.1. Discussions des résultats

Alors que les concentrations des cellules, des spores et des cristaux de « Lip » ont été du même ordre dans les trois milieux de culture comparés, la population maximale et le pourcentage de sporulation de H_3 ont été plus élevés dans le milieu son par rapport au milieu Anderson et au milieu semi synthétique standard. Yang et Wang. (1998) ont montré que des concentrations élevées des sources de nitrogène directement assimilables par les bactéries peuvent réduire le pourcentage de sporulation, ce qui peut expliquer la faible sporulation de H_3 obtenue dans le milieu Anderson. Cet effet n'a pas été observé dans les cultures de « Lip » où les pourcentages de sporulation ont été élevés et du même ordre dans les trois milieux de culture comparés. Mais, il est bien connu que l'influence de la composition du milieu de culture sur la croissance, la sporulation et la synthèse des toxines de *B.thuringiensis* dépend de la souche étudiée (Dulmage,1990 ; Kaur, 2000). Une concentration plus élevée de cristaux plus riches en protéines a été obtenue dans les cultures de H_3 dans le milieu son par rapport aux milieux de la littérature. La concentration estimée des δ-endotoxines de H_3 a été 2.85 et 5.57 fois plus grande dans le milieu 6 % son de blé que dans les milieux Anderson et semi synthétique standard respectivement.

IV.5. Conclusions

D'un point de vue pratique :

- **L'emploi du son de blé comme substrat de fermentation pour *B.thuringiensis,* comparé à deux milieux classiquement utilisés dans la bibliographie a montré :**
  - **une meilleure production de δ-endotoxines**
  - **une meilleure productivité de δ-endotoxines**
  - **un meilleur rendement relatif (rapport δ-endotoxine/nombres de cristaux)**

- **une importante économie financière**

Ces constatations ont été faites sur les 2 souches de *B.thuringiensis* testées. Il est donc probable que ce milieu soit également adapté pour d'autres souches non testées.

En plus du coût très bas et de son efficacité, la simplicité de préparation de ce milieu de culture mono composant ne nécessitant pas l'addition des carbohydrates et/ou des sels minéraux contrairement aux autres sous-produits de l'agriculture testés dans la bibliographie est également un atout pour une industrialisation de la production de *B.thuringiensis.*

D'un point de vue connaissance :

- **L'analyse de la consommation des sucres du son par deux souches de *B.thuringiensis* a montré que parmi les carbohydrates du son (cellulose, hémicellulose, amidon), l'amidon était vraisemblablement le seul utilisé par ces souches. La consommation de 20 g « équivalent glucose » dans le milieu complexe de son a été plus efficace pour la synthèse des δ-endotoxines que la consommation de la même quantité de glucose dans un milieu semi synthétique.**

- **Les souches de *B.thuringiensis* possèdent des activités enzymatiques nécessaires à la solubilisation des polymères carbonés du son de blé puisque le filtrat obtenu après autoclavage de ce son ne permet pas une croissance importante de la bactérie.**

- **Le rendement relatif quantité de protéines/nombre de cristaux s'est avéré très dépendant du type de milieu. Si les protéines formées semblent être les mêmes leur concentration par cristaux varient.**

CINQUIÈME CHAPITRE

ETUDE CINÉTIQUE

V.1. Introduction

À échelle industrielle, afin de minimiser les coûts, il est important de produire le biopesticide visé en quantité maximale, en un minimum de temps. Afin d'optimiser cette productivité de δ-endotoxines et de dimensionner correctement un fermenteur industriel, la connaissance de l'influence des paramètres environnementaux sur la cinétique des phénomènes est primordiale.

Comme nous l'avons vu dans **la partie 1.7 de la Revue Bibliographique**, les données dans la littérature sur la cinétique du processus de fermentation de *B.thuringiensis* sont peu nombreuses. Parmi les quelques études disponibles, il apparait que l'apport en oxygène est un paramètre déterminant sur la croissance, la sporulation et la production des cristaux de différentes souches de *B.thuringiensis* (Sarrafadeh and Navarro, 2006 ; Ghribi *et al*., 2006 ; Da Silva *et al*., 2011 ; Boniolo *et al*., 2012). Cependant, les conclusions de ces auteurs sur les conditions optimales d'aération sont assez différentes, voire même contradictoires. En fait, l'influence de la souche semble être très importante et chacune semble avoir des besoins différents.

Nous nous sommes donc intéressés en priorité à l'effet de l'aération sur la cinétique de croissance et de sporulation de notre souche de *B.thuringiensis* var *kurstaki*. L'objectif était de déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir la meilleure productivité dans le milieu complexe mono-composant de son de blé présenté précédemment. Pour cela, différents taux de transfert d'oxygène ont été réalisés dans un milieu 6 % (m/v) son de blé en fermenteurs de 2 L. Les cinétiques obtenues pour différentes concentrations de son de blé à taux d'oxygène constant ont également été analysées.

V.2. Croissance, sporulation et production de δ-endotoxines dans le milieu 6 % (m/v) son de blé pour différentes valeurs de K_La

V.2.1. Conditions d'aération

L'alimentation en oxygène des cultures de « Lip » dans un milieu 6 % (m/v) son de blé a été caractérisée par le coefficient volumétrique de transfert du dioxygène, K_La, déterminé par la

méthode de désoxygénation-réoxygénation présentée dans **Matériels et méthodes (partie II.2.2.3a).** Cinq débits constants d'aération ont été appliqués avec une vitesse d'agitation constante de 340 ou 500 rpm . Les valeurs de K_La correspondant à ces conditions d'aération ont été les suivantes: 7,2 ; 13,3 ; 40,7 ; 65,5 ; 106.2 h^{-1}.

V.2.2. Concentration du dioxygène dissous

La variation de la concentration du dioxygène dissous (dO_2) a été suivie tout au long de la fermentation pour chacune des valeurs étudiées de K_La. Les courbes de variation de dO_2 sont présentées sur la Figure V.1. Ces courbes montrent que les valeurs de K_La de 7,2, 13,3, 40,7 et 65,5 h^{-1} correspondent toutes à des conditions de limitation en oxygène. Pour K_La égal à 7,2 h^{-1}, la concentration du dioxygène dissous a diminué plus rapidement que pour les autres K_La pour atteindre une valeur de 0 % 3,2 h après le début de la fermentation. Dans ces conditions d'aération, la concentration du dioxygène dissous dans le milieu de culture est restée nulle durant les 120 h de suivi de la culture. La durée de la limitation en oxygène est passée de 28,5 h à 1 h lorsque le K_La a augmenté de 13,32 h^{-1} à 65,52 h^{-1}. Pour un K_La égal à 106,2 h^{-1}, la concentration du dioxygène dissous a diminué après l'inoculation pour arriver à une valeur de 0 % à la fin de la croissance végétative mais a augmenté juste après, ce qui montre que pour cette valeur de K_La, le taux de transfert d'oxygène répond à la demande en oxygène de la souche étudiée. Pour cette condition, nous pouvons considérer qu'aucune limitation en oxygène n'a été observée.

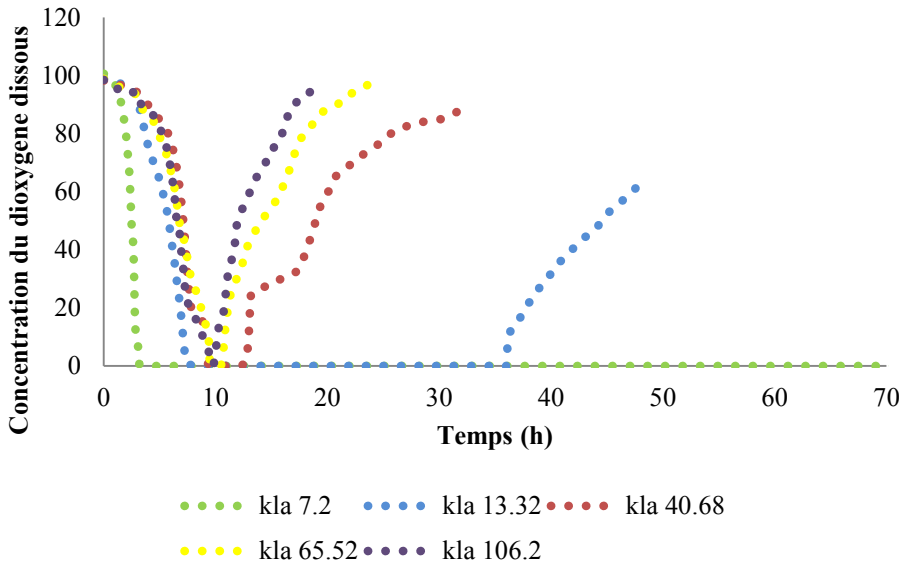


Figure V.1. Variations de la concentration du dioxygène dissous pour différentes valeurs de K_La

V.2.3. Courbes de croissance

Les cellules de *B.thuringiensis* ont été comptées en tant que cellules végétatives y compris les cellules contenant des spores comme il a été décrit dans la **partie II.4.1 du chapitre Matériels et méthodes.**

La Figure V.2 montre le profil de croissance de « Lip » dans les différentes conditions d'aération étudiées. Pour K_La égal à 7,2 h^{-1}, la croissance a été inhibée, la population maximale atteinte a été beaucoup plus faible en comparaison avec celles obtenues pour les autres valeurs de K_La. Par ailleurs, la lyse cellulaire entrainant la diminution du nombre des cellules, n'a pas eu lieu pour cette condition. Pour toutes les autres valeurs étudiées de K_La, la concentration des cellules a augmenté après inoculation pour atteindre une valeur maximale à la fin de la croissance végétative. Une stabilisation du nombre total des cellules (cellules végétatives + cellules sporulées) a été ensuite observée et elle a été suivie par un déclin qui correspond à la lyse cellulaire et la libération des spores et cristaux.

Pour K_La entre 13,3 et 106,2 h^{-1}, les concentrations maximales des cellules atteintes ont été du même ordre (Tableau V.1). Par contre, le temps nécessaire pour accéder à ces concentrations a

augmenté de 8,5 h pour des K_La de 65,5 et 106,2 h^{-1} jusqu'à 10,5 et 12,5 h pour les K_La de 40,7 et 13,3 h^{-1} respectivement (traits verticaux, Figure V.2).

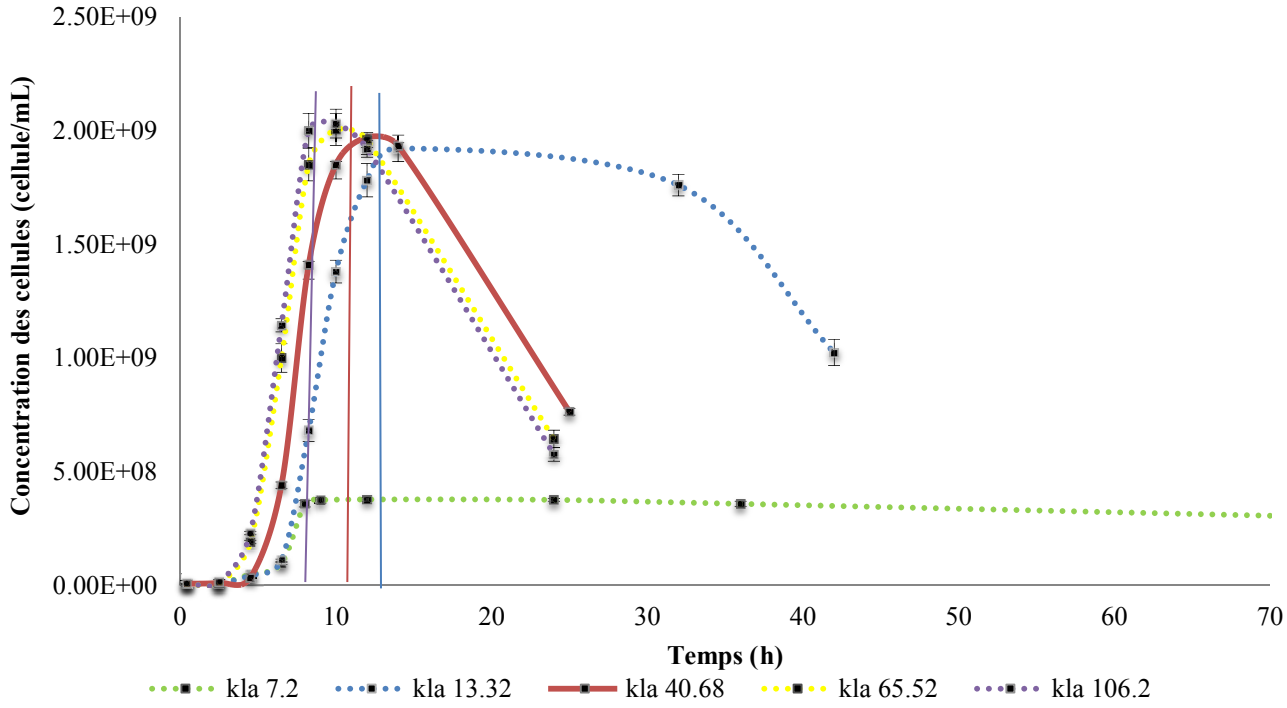


Figure V.2. Courbes de croissance de « Lip » à différentes valeurs de K_La

V.2.4. Sporulation

La concentration de spores dans le milieu de culture a été déterminée tout au long des fermentations par comptage direct des spores libres à l'aide d'une cellule de Petroff Hausser. L'observation microscopique a montré que la sporulation a été déficiente pour K_La égal à 7,2 h^{-1}. Pour toutes les autres valeurs de K_La dans la gamme de 13,32 h^{-1} à 106,2 h^{-1}, le pourcentage de sporulation a été supérieur à 98 % et les concentrations maximales de spores obtenues n'ont pas été significativement différentes (Tableau V.1). La Figure V.3 montre les variations, au cours du temps, de s concentrations de spores libres dans le milieu de culture dans les différentes conditions d'aération étudiées. Les concentrations maximales des spores pour K_La de 65,5 h^{-1} et 106,2 h^{-1} ont été atteintes après 28 à 29 h alors que pour K_La égal à 13,3 h^{-1}, la libération de la plupart des spores n'a commencé que 36 h après le début de la fermentation.

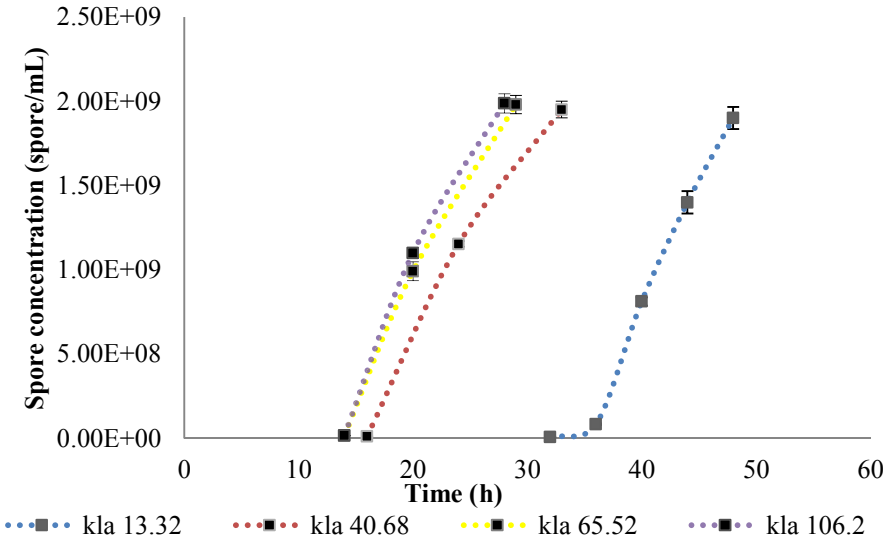


Figure V.3. Variation de la concentration des spores libres pour différents K_La

V.2.5. Production de δ-endotoxines

Pour un K_La égal à 7,2 h^{-1}, la formation de cristaux bipyramidaux de δ-endotoxines n'a pas été observée. Les valeurs estimées des concentrations des protéines de toxines obtenues pour les autres valeurs de K_La sont groupées dans le tableau V.1. Aucune corrélation n'a été observée entre la concentration des spores et celle des protéines de toxines. Alors que les concentrations obtenues des spores n'ont pas été significativement différentes, la concentration des protéines de toxines a augmenté de 2,19 $g.L^{-1}$ à 2,49 $g.L^{-1}$ pour des K_La de 13,3 h^{-1} et 65,5 h^{-1}. La différence n'a pas été significative entre les concentrations des protéines de toxines obtenues pour des K_La de 65,5 h^{-1} et 106,2 h^{-1}.

Tableau V.1. Concentrations maximales des cellules, spores, cristaux et protéines des toxines à différentes valeurs de K_La

K_La (h^{-1})	Cellules (x 10^9/mL)	Spores (x 10^9/mL)	Cristaux (x 10^9/mL	Protéines de toxines $g.L^{-1}$
7,2	$0,38^{(a)}$	-	-	-
13,3	$1,92^{(b)}$	$1,9^{(a)}$	$1,88^{(a)}$	$2,19^{(a)}$
40,7	$1,97^{(b)}$	$1,95^{(a)}$)	$1,92^{(a)}$	$2,35^{(b)}$
65,5	$2^{(b)}$	$1,98^{(a)}$	$1,94^{(a)}$	$2,49^{(c)}$
106,2	$2,03^{(b)}$	$1,99^{(a)}$	$1,95^{(a)}$	$2,44^{(c)}$

Les valeurs, dans une même colonne, qui sont suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p>0,05$)

Une concentration de spores de $1,9.10^9$/mL-$1,99.10^9$/mL a été obtenue pour K_La entre 13,32 et 106,2 h^{-1}. Ces valeurs sont comparables ou plus grandes que celles obtenues dans des cultures de *B.thurigiensis kurstaki* où la concentration du dioxygène dissous dans le milieu de culture a été maintenue au-dessus de 70 % de saturation (Bihari *et al*., 2002) ou au-dessus de 30 % de saturation (Yezza *et al*., 2005) tout au long de la fermentation. Entre K_La de 13.3 h^{-1} et K_La de 65.5 h^{-1}, la concentration des protéines de toxines a augmenté de 13.7 % tandis que les concentrations des cristaux obtenues pour les différentes valeurs de K_La n'ont pas été significativement différentes. L'effet de l'aération sur la production des δ-endotoxines a été rapporté par plusieurs auteurs. Selon Avignone-Rossa *et al*. (1992), la production des δ-endotoxines de *B.thuringiensis israelensis* dans des conditions de limitation en oxygène a été 50 % plus faible que dans les conditions où il n'y avait pas de limitation. Boniolo *et al*. (2012), ont aussi observé un effet de l'aération beaucoup plus remarquable sur la concentration des protéines de toxines que sur la sporulation. Suivant les conditions d'aération, les cristaux formés sont donc plus ou moins concentrés en protéines, une forte aération augmentant cette concentration.

V.2.6. Phases de croissance

La méthode adoptée pour la détermination de la concentration des cellules et des spores libres par comptage direct sur une cellule de Petroff Hausser, a permis de distinguer les étapes suivantes dans la croissance de *B.thuringiensis* :

- I.a. Phase de latence
- I.b. Croissance exponentielle
- I.c. Décélération de la croissance

- II. Fin de la croissance végétative - début de libération de spores matures
- III. Début de libération des spores matures - fin de la fermentation identifiée par la libération de 90 % des spores.

La représentation de ces phases est visible sur la figure V.4 pour la condition d'aération correspondant à K_La de 13,3 h^{-1}.

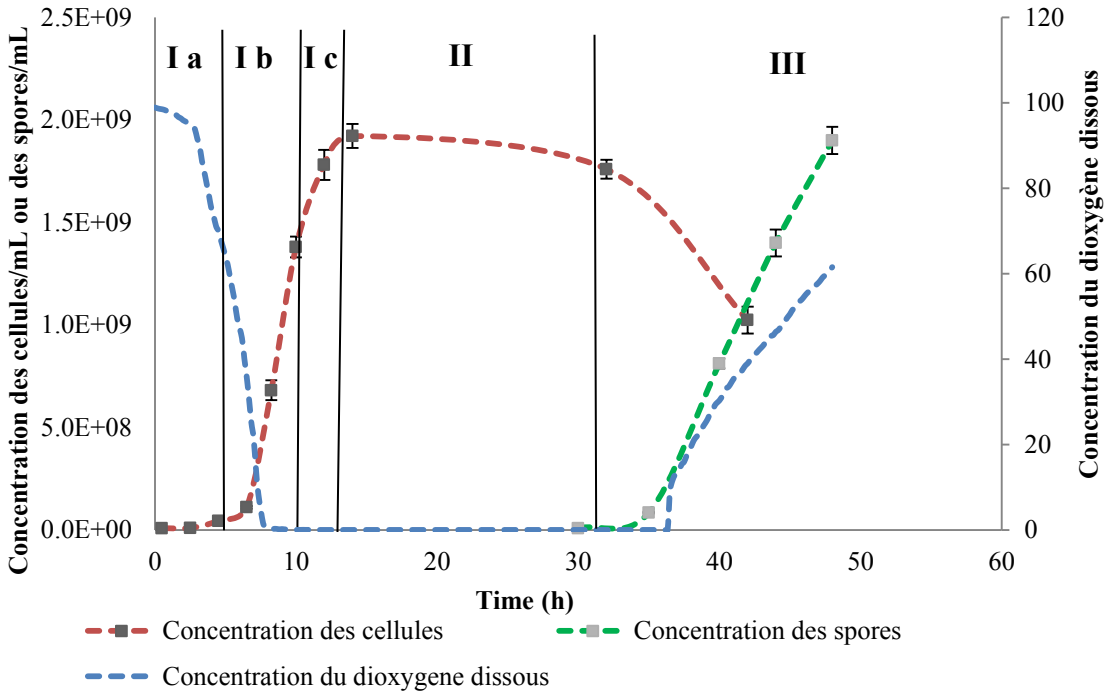


Figure V.4. Variations de concentration des cellules, concentration des spores, et concentration du dioxygène dissous pour K_La de 13,3 h^{-1}

Il est remarquable de noter que la croissance a continué même après que la concentration du dioxygène dissous ait atteint une valeur de 0 % après 8 h du début de la fermentation (Figure V.4). L'oxygène reste limitant jusqu'à maturation et début de libération des spores après 35 h. Lorsque les cellules entrent en déclin avec production de spores, l'oxygène dissous commence à ré-augmenter ce qui traduit une consommation d'O_2 plus faible que son transfert qui n'est plus alors limitant.

Pour K_La égal à 40,68 h^{-1}, dO_2 s'est annulé dans la phase de décélération de la croissance et il a ré-augmenté avant le début du déclin des cellules. Une limitation en O_2 d'une heure a été observée au cours de la phase de transition à la sporulation dans les conditions correspondant à K_La de 65,5 h^{-1}. Pour K_La de 106,2 h^{-1}, nous pouvons considérer qu'aucune limitation en oxygène n'a été observée. Ainsi, il n'a pas été possible de corréler la concentration du dioxygène dissous avec les phases de croissance de « Lip » pour les différentes valeurs de K_La.

Le tableau V.2 donne l'intervalle de temps correspondant à chacune des étapes de croissance pour les différentes valeurs de K_La.

Tableau V.2. Temps de fin de chacune des étapes de croissance de « Lip » pour les différentes valeurs de K_La

	K_La (h^{-1})			
	13,3	**40,7**	**65,5**	**106,2**
I.a. Phase de latence	4,5 h	4,5 h	2,5 h	2,5 h
I.b. Croissance exponentielle	10 h	8,5 h	6,5 h	6,5 h
I.c. Décélération de la croissance	14 h	10 h	8,5 h	8,5 h
II. Fin de la phase végétative – début de libération des spores matures	32 h	14 h	12 h	12 h
III. Début de libération des spores matures – fin de la fermentation (90 % de spores libres)	48 h	33 h	29 h	28 h
Temps ou dO_2 devient nul	8 h	9,33 h	9,5 h	9,83 h
Temps ou dO_2 commence à ré-augmenter	35 h	12,6 h	10,5 h	9,83 h

Couch (2000) a décrit *B.thuringiensis* comme étant des bactéries avides d'oxygène et il a rapporté qu'il faut éviter que la concentration du dioxygène dissous dans le milieu de culture tombe à une valeur inférieure à 20 % pour ne pas nuire à la production. Notre travail a montré en

revanche que la production de *B.thuringiensis* n'a pas été affectée même avec une période de limitation en oxygène de 28,5 h. L'augmentation de K_La dans l'intervalle 13,3-106,2 h^{-1} n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration maximale de cellules obtenue mais le temps d'un cycle a été réduit quand K_La a augmenté de 13,3 à 65,5 h^{-1}. D'une manière similaire, quand *Escherichia coli* qui est aussi une bactérie anaérobie facultative a été cultivée dans un milieu TB (le milieu TB est similaire au milieu LB-glycérol tamponné mais contient moins de glycérol et plus de composés complexes), la limitation en oxygène a abouti à un temps de fermentation plus long mais elle n'a pas causé une perte dans le rendement en cellules.

V.2.7. Taux de consommation du dioxygène

A partir de l'oxygène dissous et du K_La il est possible de déterminer la quantité instantanée d'O_2 consommé par la souche dans les différentes conditions. La Figure V.5 montre cette information.

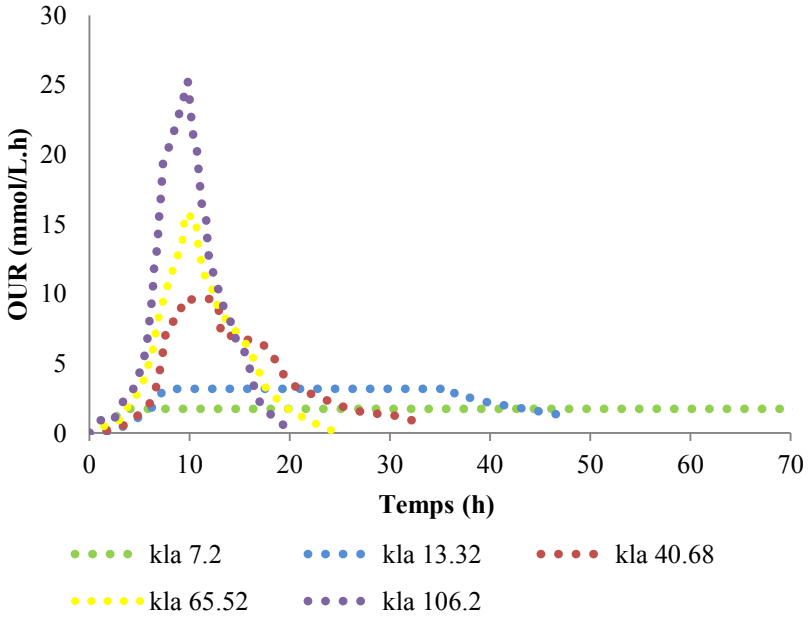


Figure V.5. Variations de la vitesse de consommation du dioxygène pour les différentes valeurs de K_La

En général, la vitesse de consommation du dioxygène augmente au cours de la croissance végétative de *B.thuringiensis* et diminue durant la phase de sporulation (Amicarelli *et al*., 2010). Pour K_La égal à 7,2 h^{-1} où la sporulation a été déficiente, OUR a atteint une valeur maximale de

1,74 mmol.$L^{-1}h^{-1}$ et n'a plus diminué même après 120 h de fermentation. Pour K_La égal à 13,3 h^{-1}, le taux de consommation d'oxygène a atteint une valeur maximale de 3,2 mmol.$L^{-1}.h^{-1}$ après 8 h de fermentation et n'a diminué qu'après 35 h avec le commencement de libération des spores matures comme il a été montré dans la Figure V.4. Pour les autres conditions d'aération étudiées, les valeurs maximales atteintes par le taux de consommation d'oxygène ont été plus grandes mais OUR a diminué juste après avoir atteint le maximum (K_La = 106.2 h^{-1}) ou après une faible période de stagnation (K_La 40,7 et 65.5 h^{-1}).

Ainsi parmi les conditions d'aération qui ont été étudiées, une consommation minimale de 3,2 mmol.$L^{-1}h^{-1}$ de dioxygène s'est avérée nécessaire pour que la sporulation de la souche de *B.thuringiensis kurstaki* ait lieu.

V.2.8. Relation entre phase de croissance et pourcentage de CO_2 dans l'air effluent à différents K_La

Le pourcentage de CO_2 dans les gaz de sortie du fermenteur a été suivi et enregistré tout au long des fermentations. Ses variations pour K_La 7,2 ; 13,3 et 65,5 sont présentées sur les Figures V.6 à V.8.

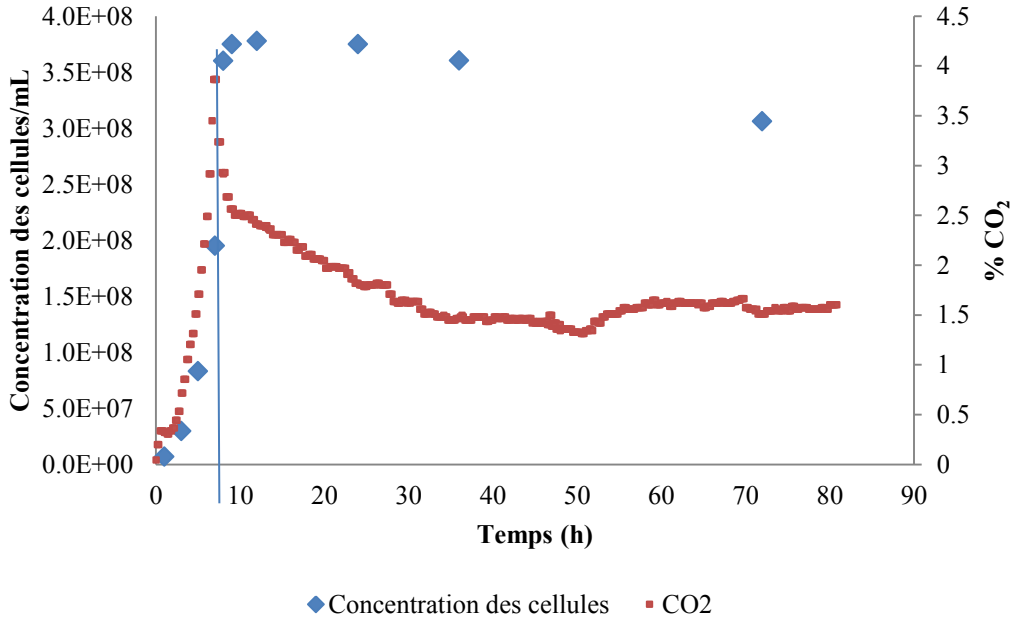


Figure V.6. Variation du pourcentage de CO_2 pour K_La 7,2 h^{-1}

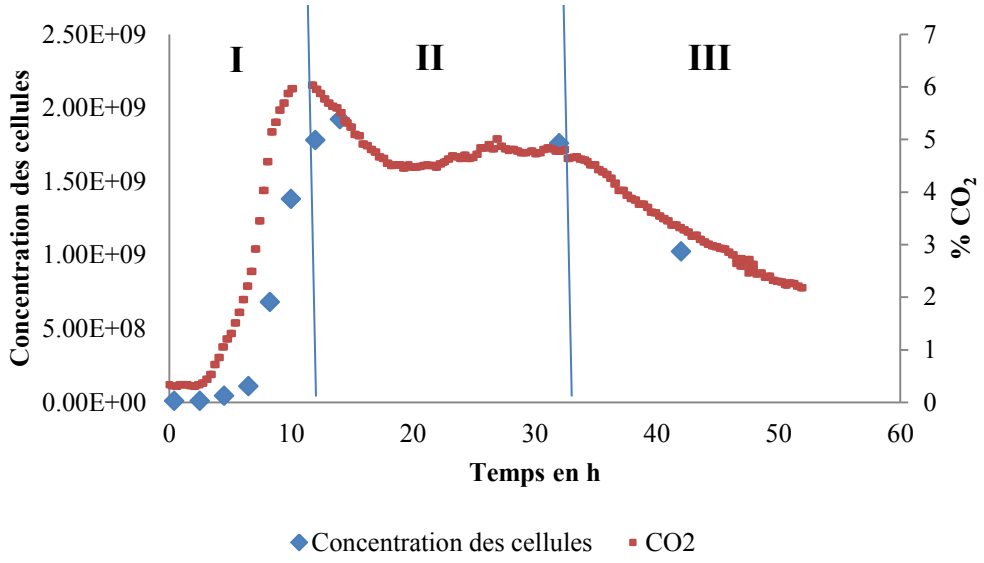


Figure V.7. Variation du pourcentage de CO_2 pour K_La 13,3 h^{-1}

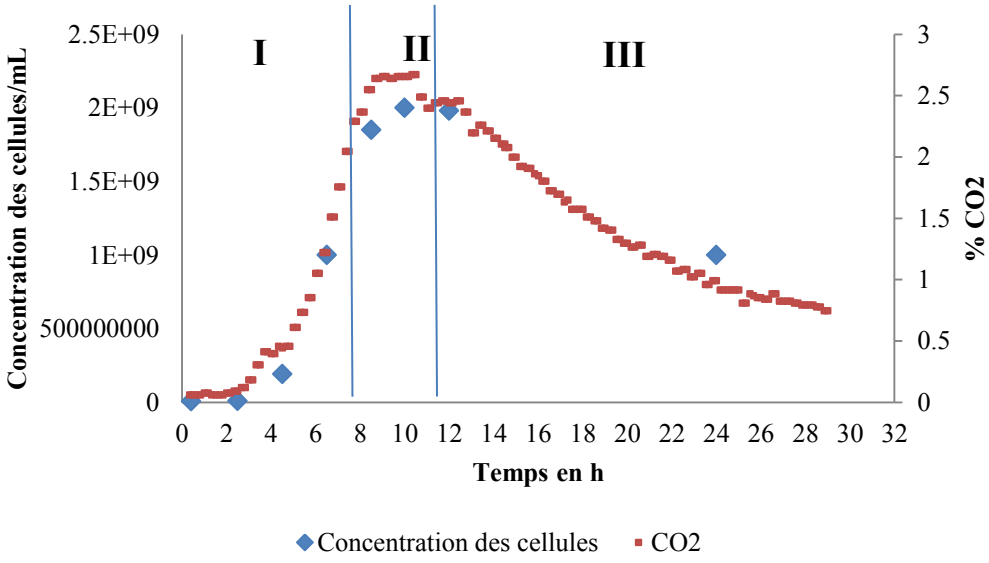


Figure V.8. Variation du pourcentage de CO_2 pour K_La 65,5 h^{-1}

Les courbes de variation du pourcentage de CO_2 dans les gaz effluents peuvent être divisées en trois domaines :

- I. Hausse jusqu'à atteindre une valeur maximale
- II. Variation irrégulière avec tendance à la stagnation
- III. Baisse continue

Seule, la courbe de variation obtenue pour K_La égal à 7,2 h^{-1} présente une allure différente : après avoir atteint une valeur maximale, le pourcentage de CO_2 baisse pour se stabiliser. Le troisième domaine, cité ci-dessus, n'est pas observé.

Il est remarquable que les intervalles de temps des trois domaines de la courbe de variation du pourcentage de CO_2 correspondent à trois phases de la croissance de la souche locale de *B.thuringiensis kurstaki* « Lip » :

- Le premier domaine correspond à la croissance végétative et la valeur maximale du pourcentage de CO_2 est atteinte vers la fin de cette phase.
- Le deuxième domaine correspond à l'intervalle de temps entre la fin de la croissance végétative et le début de libération des spores matures.
- Le troisième domaine correspond à l'intervalle de temps entre le début de libération des spores matures et la fin de la fermentation où 90 % des spores sont libres.

Il est donc possible de prévoir l'évolution des cellules bactériennes entre les phases de croissance végétative, de sporulation et de libération des spores matures dans le milieu de culture en suivant la variation du pourcentage de dioxyde de carbone dans les gaz effluents. Cela peut s'avérer utile pour un suivi en ligne de l'évolution des fermentations.

V.2.9. Variations du pH

Le pH initial du milieu 6 % (m/v) son de blé est de 6,2. Sauf pour K_La égal a 7,2 h^{-1}, des variations du pH dans la gamme 5,6-6,8 ont été observées. Les variations du pH pour les valeurs de K_La de 65,5 h^{-1} et 7,2 h^{-1} sont présentées dans la figure V.9.

Les profils de variation pour toutes les conditions où la souche a sporulé sont similaires. Le pH diminue au début de la fermentation pour atteindre une valeur minimale (entre 5,6 et 6) après un temps plus ou moins long (6 h et 5.3 h pour K_La égal à 13.3 h^{-1} et 40.7 h^{-1} respectivement et 4.3 h pour les deux K_La de 65.5 h^{-1} et 106,2 h^{-1}). Ceci correspond aux temps des phases de croissance. Après ce minimum, le pH remonte pour atteindre un maximum (entre 6 et 6,8) après presque 8 h

du début de la fermentation et continue par la suite à fluctuer pour prendre vers la fin de la fermentation une valeur de l'ordre du pH initial. Ce profil de variation du pH observé dans le milieu son de blé est diffèrent de celui observé dans d'autres milieux complexes tels que le TSY et le milieu à base de farine de soja où le pH diminue au début de la fermentation pour atteindre une valeur minimale vers la fin de la croissance végétative puis augmente régulièrement jusqu'à la fin de la fermentation (Vidyarthi *et al*., 2002) . Mais vu que les fluctuations du pH dans le milieu son restent dans l'intervalle 5,6-6,8, il n'y a pas de risque de nuire à la croissance de *B.thuringiensis* ni à la sporulation et à la production des δ-endotoxines (Dulmage, 1990).

Pour le K_La égal à 7,2 h^{-1}, où la sporulation n'a pas eu lieu, le comportement est différent : le pH a continué à diminuer du début de la fermentation jusqu'à 11 h où il a atteint une valeur de 5,4. Par la suite, il a fluctué aux alentours de cette valeur et n'a pas dépassé 5,8 même après 80 h de fermentation.

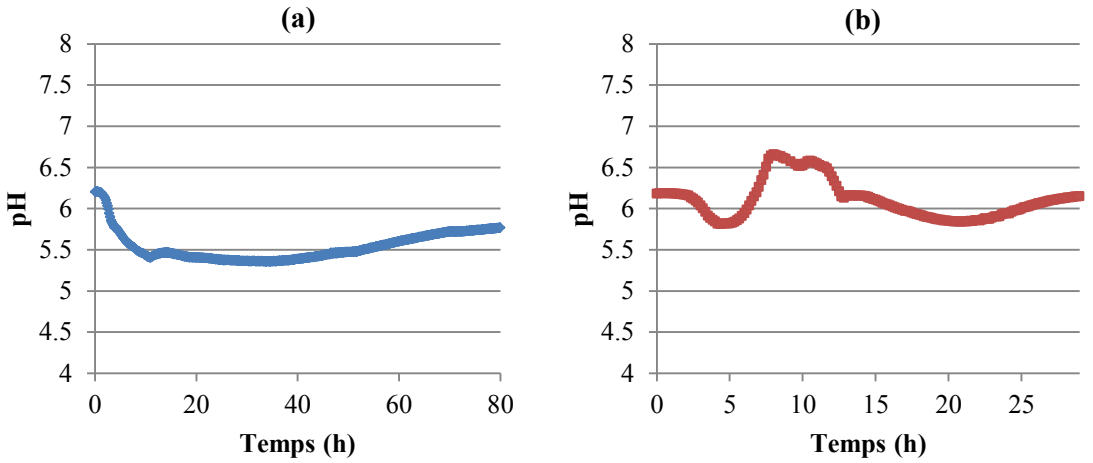


Figure V.9. Variation du pH au cours de la fermentation de « Lip » dans le milieu 6 % son de blé pour (a) K_La de 7,2 h^{-1} ; (b) K_La de 65,5 h^{-1}

V.2.10. Variations de la vitesse spécifique moyenne de croissance et du taux spécifique maximal de consommation du dioxygène en fonction de K_La

La Figure V.10 présente les variations de la vitesse spécifique moyenne de croissance ($\mu_{moyenne}$), déterminée pendant la phase de croissance végétative, et du taux spécifique maximal de consommation d'oxygène pour les différentes valeurs de K_La.

La même tendance de variation de $\mu_{moyenne}$ et QO_{2max} est observée: une augmentation linéaire pour K_La dans la gamme 13,3 h^{-1}-65,5 h^{-1} puis un palier à partir de K_La égal a 65,5 h^{-1}.

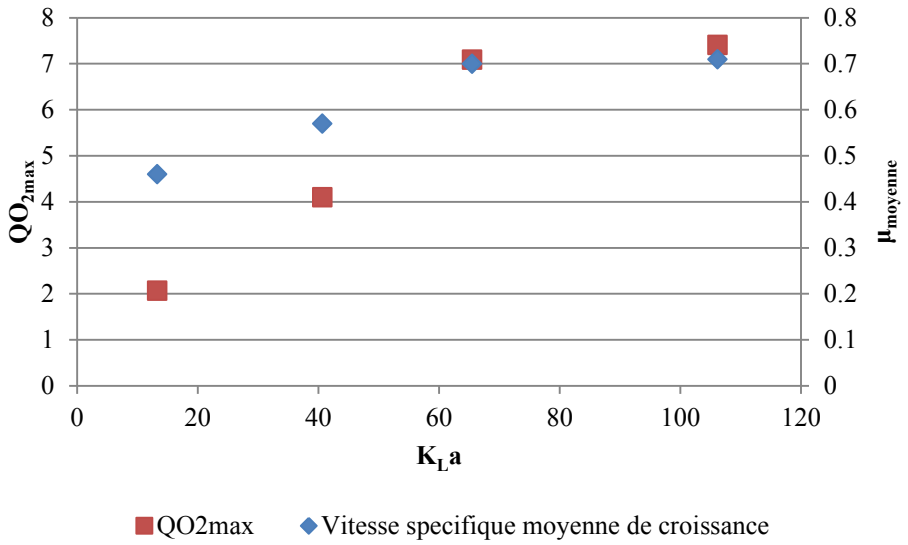


Figure V.10. Variation de $\mu_{moyenne}$ et QO_{2max} pour différentes valeurs de K_La

L'augmentation de la vitesse spécifique de croissance peut être ainsi attribuée à la plus grande production d'énergie avec l'augmentation du taux maximal spécifique d'absorption d'oxygène. Yezza *et al*. (2005) ont aussi obtenu de plus grandes biomasses et des vitesses spécifiques plus élevées en augmentant le taux de transfert de l'oxygène par la réduction du volume du milieu de culture dans le bioréacteur de 10 à 8 L.

V.2.11. Productivité

Bien que les concentrations finales des spores obtenues pour les valeurs de K_La dans la gamme 13,3-106,2 h^{-1} n'ont pas été significativement différentes, le temps mis pour obtenir ces concentrations a varié. Pour K_La égal à 65.5 h^{-1}, le temps d'un cycle a été de 29 h alors que pour K_La égal à 13,32 h^{-1}, la libération de la plupart des spores matures n'a commencé qu'à partir de 36 h de fermentation. Les productivités des spores et des protéines de toxines, à différentes valeurs de K_La, sont présentées sur la Figure V.11.

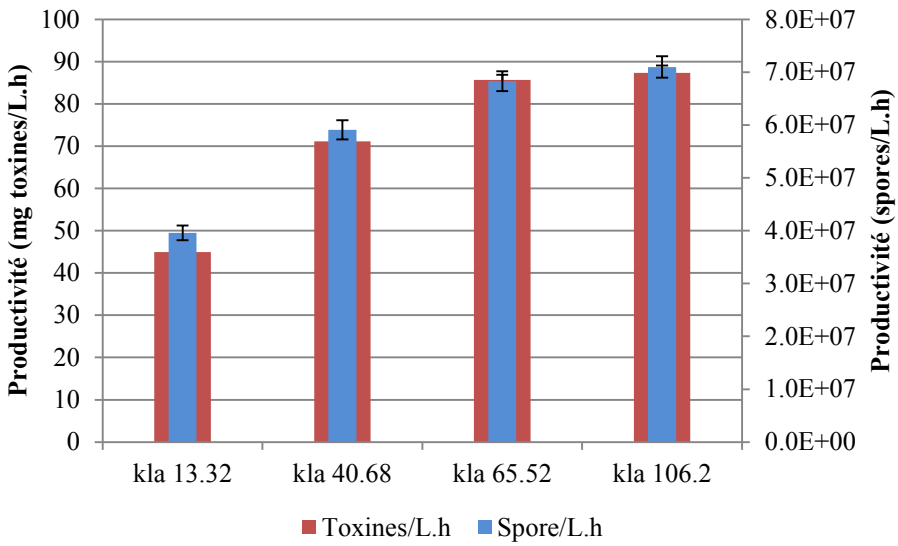


Figure V.11. Productivités des spores et des toxines à différentes valeurs de K_La

Par ailleurs, contrairement à Sarrafzadeh et Navarro (2005) qui ont signalé un taux plus rapide de libération des spores matures en absence d'oxygène, Une augmentation de la productivité de 78,64 % pour les spores et 94.9 % pour celle des protéines de toxines a été observée entre les cultures à K_La de 13,3 h^{-1} et celles à K_La de 65,5 h^{-1}. Les valeurs des productivités des spores et celles des protéines de toxines obtenues pour K_La de 65,5 et 106,2 h^{-1}, comparées par un test de Student au niveau $p < 0,05$, n'ont pas été significativement différentes. Ainsi, dans le milieu son de blé 6 %, les conditions d'aération correspondantes à K_La égal à 65,52 h^{-1} sont les conditions optimales de production de la souche locale de *B.thuringiensis kurstaki* « Lip ».

V.2.12. Rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé

Le rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé, calculé en évaluant la quantité totale du dioxygène consommée du début de la fermentation jusqu'à ce que la concentration maximale des cellules soit atteinte, n'a pas été le même pour toutes les valeurs de K_La. La variation de ce rendement en fonction des conditions d'aération est présentée dans la Figure V.12.

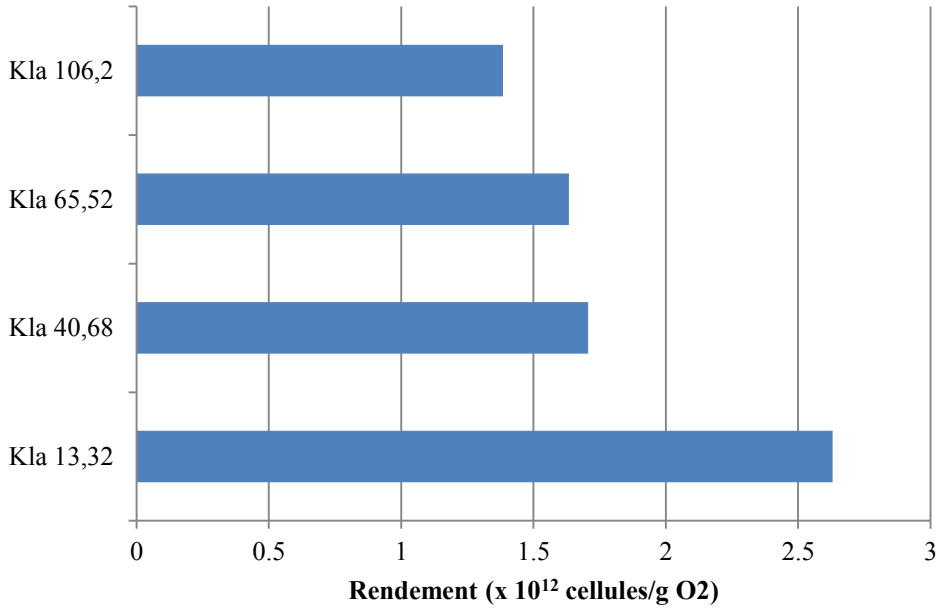


Figure V.12. Rendement en cellules par rapport au dioxygène consommé

La différence n'a pas été significative entre les valeurs obtenues pour les deux valeurs de K_La de 40,7 et 65,5 h^{-1}. Une diminution notable du rendement a été observée entre K_La de 13,3 et K_La de 106,2 h^{-1}. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Rizzi *et al*.,(1989) et Avignone Rossa et Mignone (1992), qui ont suggéré une meilleure efficacité de la consommation de l'oxygène pour la production de cellules dans les conditions de limitation en oxygène.

V.2.13. Effet de la diminution du flux d'air à la fin de la croissance végétative

Une fermentation a été réalisée en injectant l'air à un flux de 1 v/v/m (conditions d'aération correspondant à K_La 65,5 h^{-1}) jusqu'à ce que la concentration maximale des cellules végétatives soit obtenue, le flux étant ensuite réduit à 0,033 v/v/m (conditions d'aération correspondant à K_La 13,3h^{-1}) jusqu'à la fin de la fermentation. Les courbes de la Figure V.13 montrent que l'effet de l'aération sur chacune des phases (croissance cellules végétatives et sporulation) est indépendant. En effet, pour l'essai où l'aération a été baissée en fin de phases cellules végétatives, la sporulation suit exactement le même profil que l'essai où l'aération avait été maintenue constante à sa faible valeur.

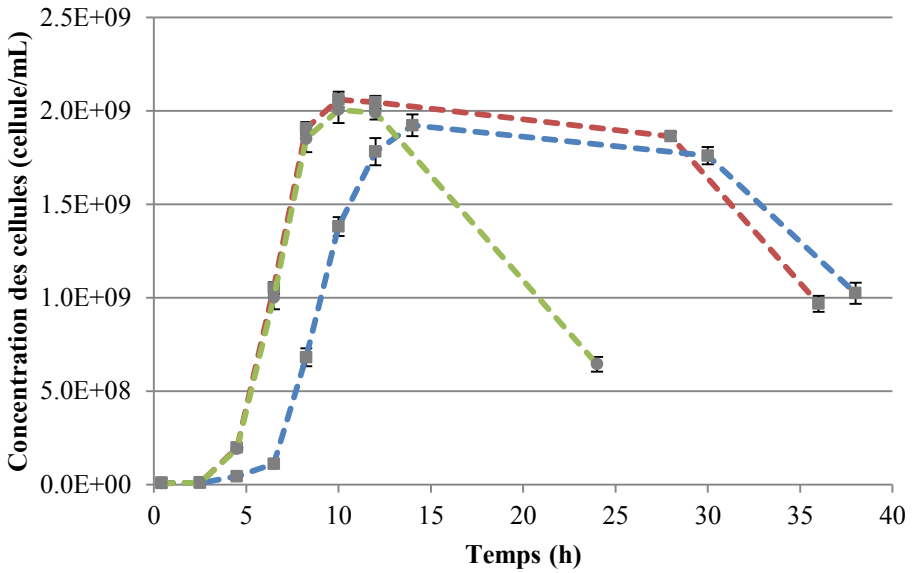


Figure V.13. Comparaison entre les courbes de croissance de « Lip » dans des conditions constantes d'aération correspondant à K_La de 13,3 h^{-1} ; des conditions constantes correspondant à K_La de 65,5 h^{-1} et des conditions variables correspondant à K_La de 65,5 h^{-1} durant la phase de croissance et K_La de 13,3 h^{-1} au cours de la sporulation

V.3. Croissance, sporulation et production de δ-endotoxines pour différents rapports (m/v) du son de blé dans le milieu de culture dans les mêmes conditions d'aération

Une autre série d'expériences a été réalisée en maintenant l'aération constante mais en faisant varier le % de son de blé du milieu, donc la quantité de substrats pour les bactéries.

Dans les conditions d'aération de 500 rpm, 0,33 L/L/min (correpondant à un K_La de 65.5 h^{-1} pour le milieu son 6 %), la cinétique de croissance de la souche Lip de *B.thuringiensis k*urstaki a été comparée pour des rapports (m/v) du son de blé dans le milieu de culture de 3, 6 et 9 %. Le coefficient de transfert K_La étant influencé par la composition du milieu, sa mesure a montré qu'il valait 52,9 h^{-1} dans le milieu son 9 % et 72,4 h^{-1} dans le milieu 3 %. Donc, malgré des conditions d'aération identiques, l'oxygène disponible pour les 3 concentrations est différent, compliquant un peu les interprétations. Des informations intéressantes peuvent tout de même être retirées de ces essais.

V.3.1. Concentration du dioxygène dissous

Dans le milieu son de blé 3 %, la concentration du dioxygène dissous n'est jamais descendue au-dessous de 43 % tout au long de la fermentation. Des périodes de limitation en oxygène de 1 h et 12 h ont été observées pour les milieux à 6 et 9 % respectivement (Figure V.14).

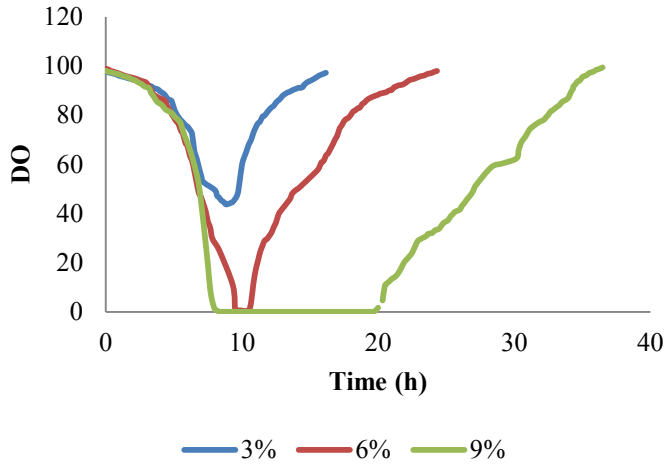


Figure V.14. Variation de la concentration du dioxygène dissous à différents rapports de son de blé

V.3.2. Courbes de croissance

Les courbes de croissance de « Lip » de ces expériences sont présentées dans la Figure V.15.

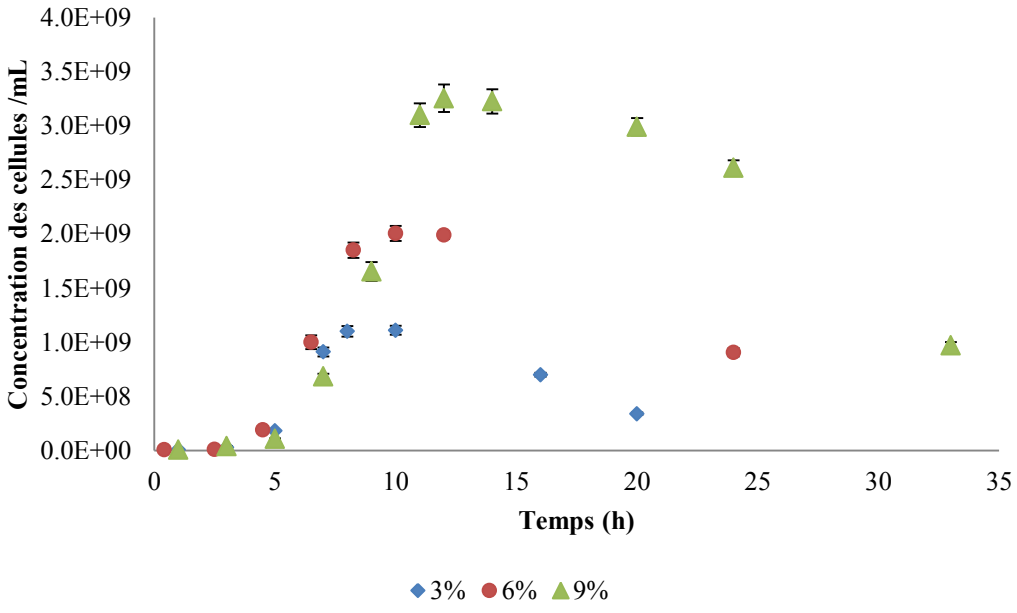


Figure V.15. Courbes de croissance de « Lip » à différents rapports (m/v) du son dans le milieu de culture

Les concentrations maximales des cellules ont été parfaitement corrélées au rapport du son dans le milieu de culture ce qui montre que le rapport élevé de son de 9 % n'inhibe pas la croissance.Les valeurs moyennes de la vitesse de croissance spécifique au cours de la phase végéative de croissance de « Lip » pour les différents pourcentages de son de blé dans le milieu de culture ont été déterminées. Des valeurs de 0,72 ; 0,7 et 0,61 h^{-1} ont été obtenues dans les milieux 3, 6 et 9 % respectivement. Le temps au bout duquel la population maximale est obtenue est passé de 8,5 h à 11 h avec l'augmentation du rapport du son de blé de 6 à 9 %. La phase de sporulation et la lyse cellulaire ont été aussi décalées et le temps d'un cycle a augmenté de 29 à 36 h. Dans des fermentations de *B.thuringiensis israelensis*, Molina *et al*. (2008) ont observé de plus longues phases de croissance pour des concentrations de glucose supérieures à 30,8 $g.L^{-1}$. Dans notre cas, à l'effet de l'augmentation de la concentration du substrat, s'ajoute l'effet de la diminution du taux de transfert de l'oxygène dans le milieu son 9 % entrainant le prolongement du temps de la fermentation.

V.3.3. Sporulation et production de cristaux de δ-endotoxines

Les courbes de variations de la concentration des spores libres dans le milieu de culture pour différents rapports de son de blé sont présentées dans la Figure V.16.

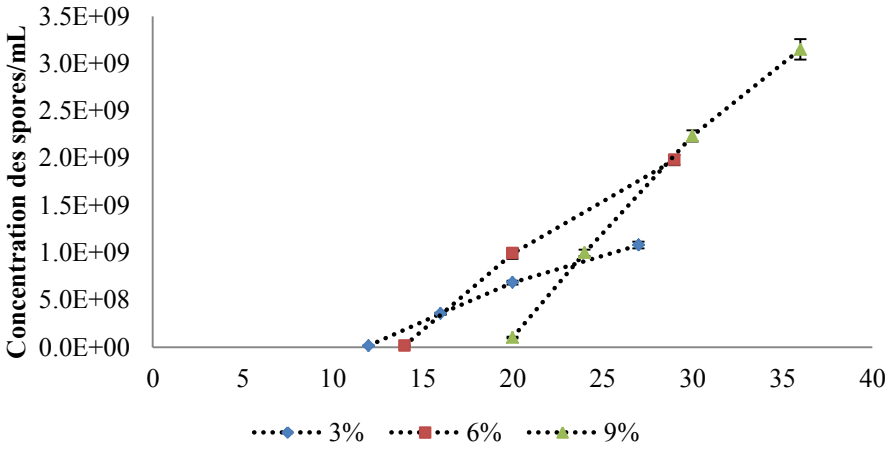


Figure V.16. Variations de la concentration des spores libres pour différents rapports de son

Les concentrations maximales des spores et des protéines de toxines obtenues à différents rapports de son dans le milieu de culture sont regroupées dans le tableau V.3.

Tableau V.3. Concentrations des spores, des cristaux et des toxines pour différents rapports (m/v) de son de blé

Rapport de son (m/v)	3 %	6 %	9 %
Concentration des spores/mL	$1{,}08.10^9$	$1{,}98.10^9$	$3{,}25.10^9$
Concentration des cristaux/mL	$1{,}06.10^9$	$1{,}94.10^9$	$3{,}06.10^9$
Concentration des toxines $g.L^{-1}$	1,28	2,49	2,83

Tout comme les concentrations des cellules, les concentrations des spores ainsi que des cristaux ont été parfaitement corrélées au rapport du son dans le milieu de culture avec un coefficient de corrélation de 0,99 (Figure V.17). Par contre, la concentration des protéines de toxines n'a pas augmenté proportionnellement avec le rapport de son entre 6 et 9 %. Le rendement en protéines de toxines quasi identique pour les milieux 3 % et 6 %, diminue de 41,5 à 31,4 mg protéines/g de son dans le milieu 9 % (Figure V.18). Cette diminution du rendement des protéines de toxines, déjà observée dans les cultures au niveau des erlenmeyers dans le **chapitre IV,** suggère que les cristaux formés dans le milieu 9 % (m/v) sont moins concentrés en protéines que les cristaux obtenus dans le milieu 6 %. Maldonado-Blanco *et al*. (2003) ont également conclu que des concentrations élevées des spores et des cellules de *B.thuringiensis israelensis* ne garantissent pas des concentrations élevées de toxines.

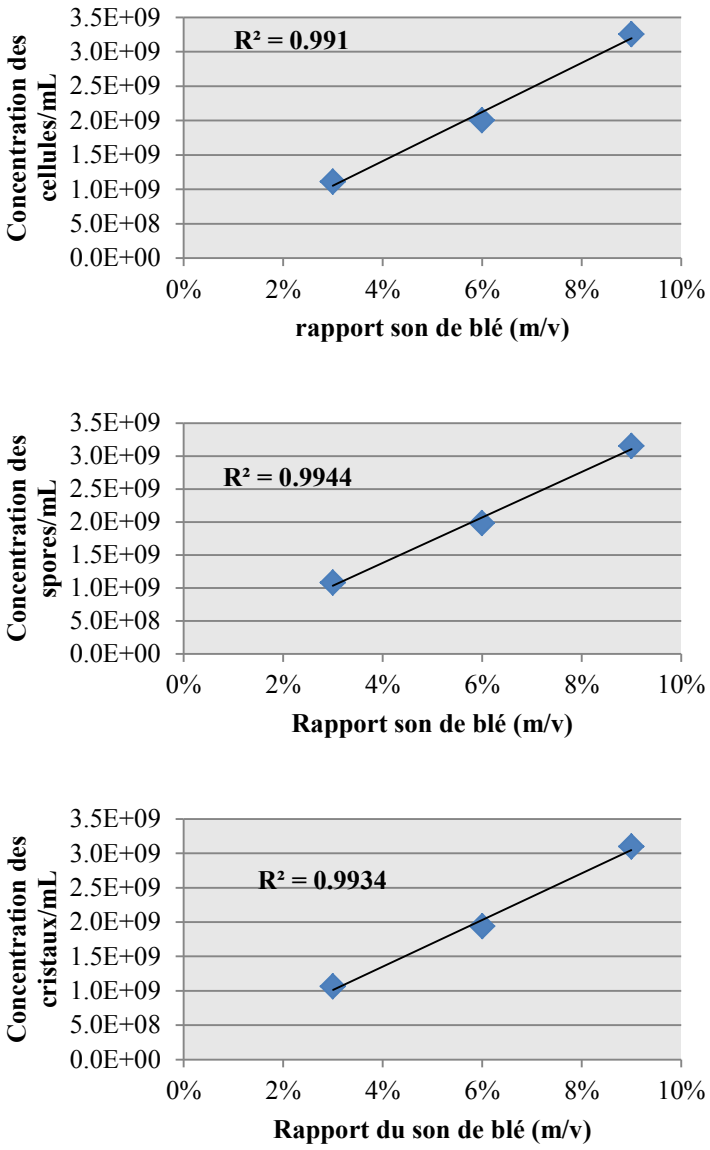


Figure V.17. Corrélations entre les concentrations des cellules, des spores et des cristaux et le rapport du son de blé dans le milieu de culture

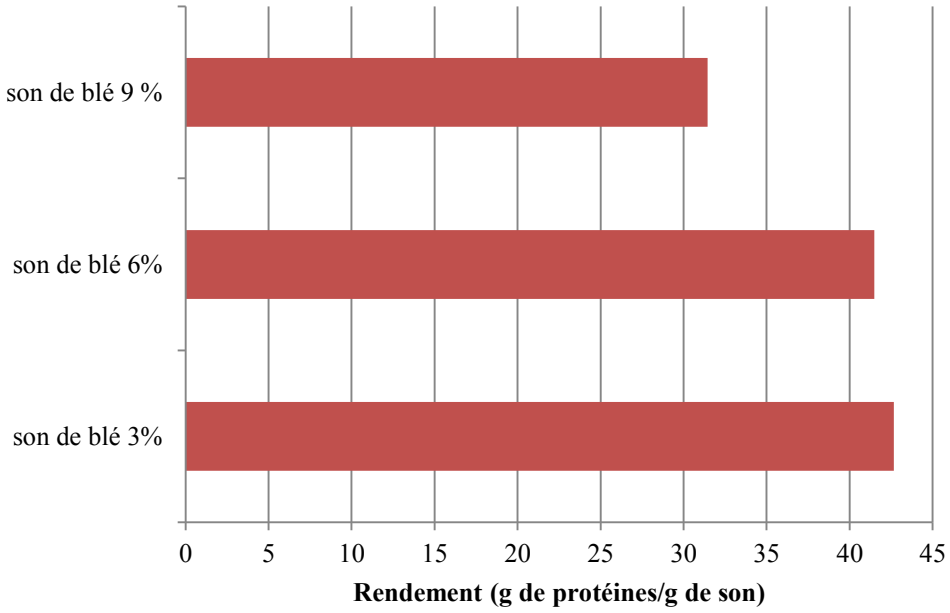


Figure V.18. Rendement en protéines des toxines (g de protéines/g de son)

En prenant en compte la notion de durée pour produire les cristaux et les protéines, la Figure V.19 montre que la productivité des spores (de même que celle des cristaux) a augmenté avec l'augmentation du rapport de son dans le milieu de culture tandis que la meilleure productivité des protéines de toxines a été obtenue dans le milieu son 6 %.

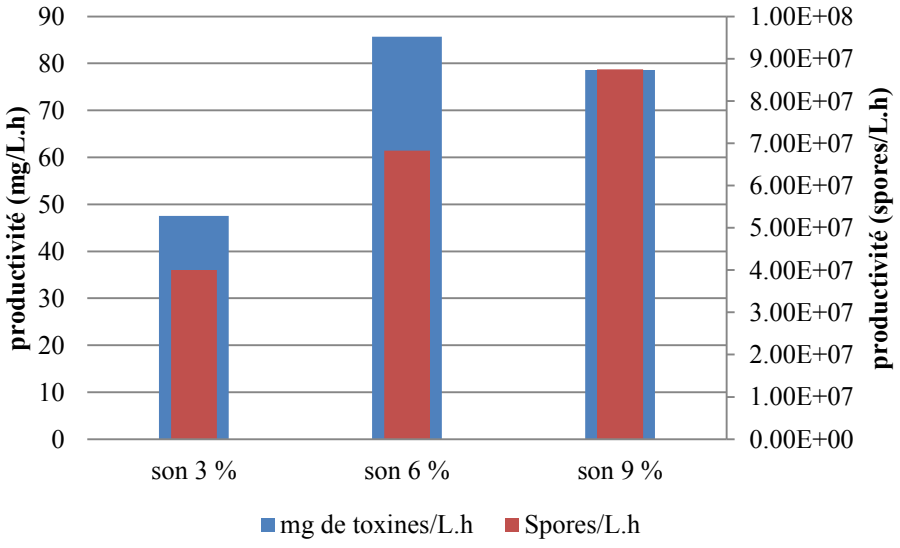


Figure V.19. Productivité des spores et des protéines des toxines à différents rapports de son de blé dans le milieu de culture

V.3.4. Variation du pourcentage de CO_2 dans l'air effluent pour différents rapports de son de blé

Les variations du pourcentage de dioxyde de carbone dans l'air évacué ont été suivies pour les 3 milieux (3, 6 et 9 %). Comme observé précédemment, le pourcentage de CO_2 mesuré et courbe de suivi de la population sont parfaitement corrélés : le temps où le pourcentage maximal de CO_2 est atteint correspond à la fin de la croissance végétative (les barres verticales sur la Figure V.20) et une baisse continue du pourcentage de CO_2 débute au moment de la libération des spores matures.

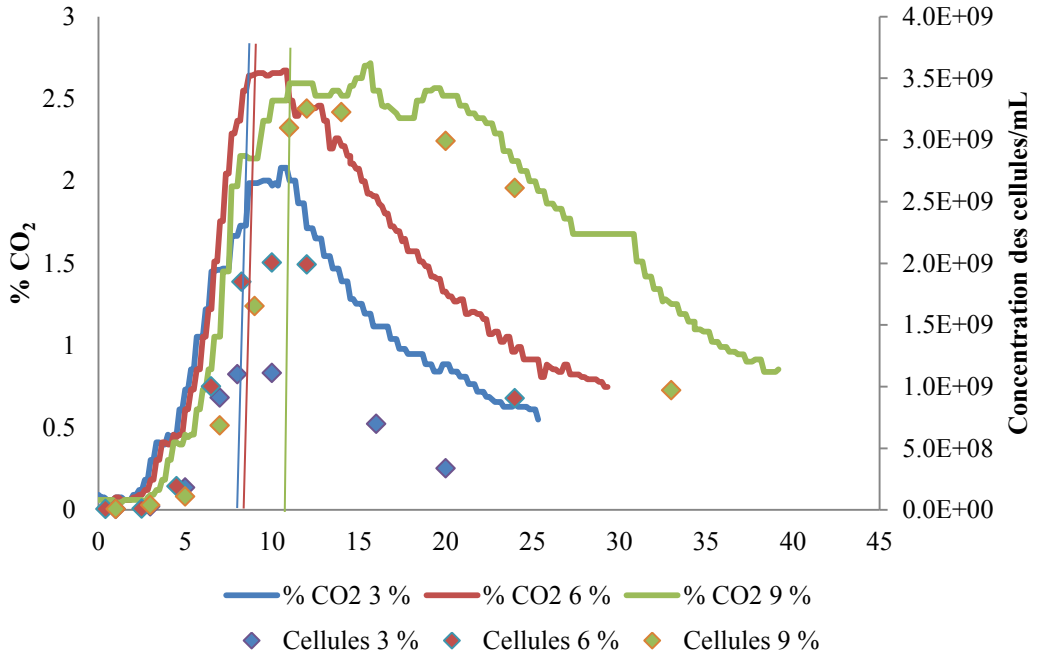


Figure V.20. Pourcentage de CO_2 dans l'air effluent pour différents rapports de son de blé

V.3.5. Corrélation entre la concentration de dioxygène consommé et la concentration des cellules obtenue

Dans les mêmes conditions d'agitation et de flux d'air, pour différents rapports de son de blé dans le milieu de culture, une corrélation positive a été observée entre la quantité de dioxygène consommé pour atteindre la concentration maximale des cellules et la concentration maximale des cellules obtenue avec un coefficient de corrélation de 0,99 (Figure V.21).

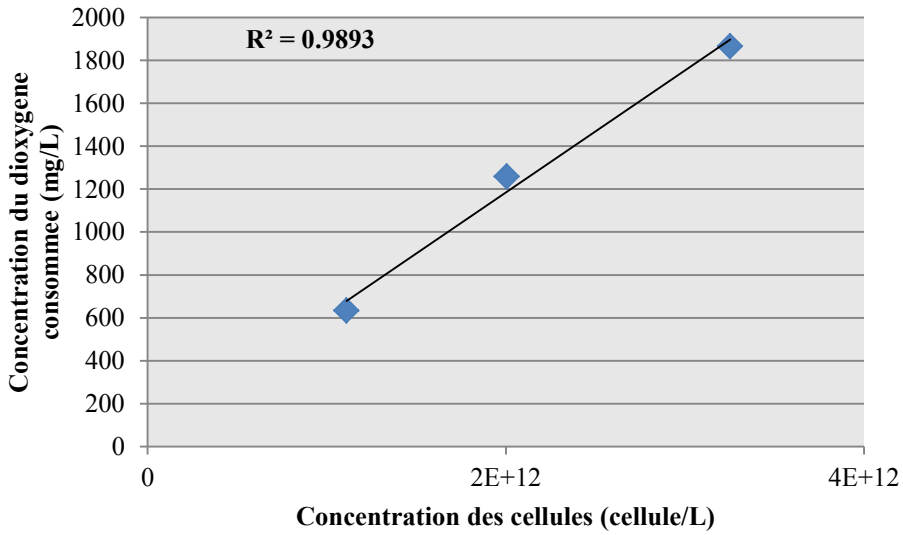


Figure V.21. Corrélation entre la concentration des cellules obtenue à différents rapports de son et la quantité de dioxygène consommé

Ainsi, le temps au bout duquel la phase de croissance végétative se termine peut être estimé à partir de la courbe de variation du pourcentage de dioxyde de carbone dans l'air effluent et le calcul de la quantité de dioxygène consommé permettra d'estimer la concentration de cellules obtenue.

V.3.6. Essai d'amélioration du rendement en protéines de toxines dans le milieu 9 % (m/v) son de blé

Visant à améliorer le rendement en δ-endotoxines dans le milieu 9 % (m/v) son de blé, des cultures de *B.thuringiensis* ont été réalisées en augmentant le flux d'air dans le bioréacteur de 2 L jusqu'à un maximum de 1,34 L/L/min avec une vitesse d'agitation maintenue à 500 rpm. La valeur de K_La correspondant à ces conditions était 102 h^{-1}. Une période de limitation en oxygène de 5 h a été observée contre 12h pour l'aération précédente. Une concentration de protéines de toxines de 3,17 $g.L^{-1}$ (contre 2.83 $g.L^{-1}$ précédemment) a été obtenue en un cycle de 33 h (contre 36h) sans changement significatif de la concentration en cellules et en cristaux. Une productivité des protéines de toxines de 96,1 mg/L.h a été atteinte (contre 78,6) et le rendement en protéines

de toxines par rapport au pourcentage de son dans le milieu de culture a augmenté jusqu'à 35,2 mg de protéines/g de son de blé (contre 31,4).

La production des protéines des toxines a été ainsi améliorée en haussant le débit de dioxygène de 0,34 à 1,34 L/L/min. Le rendement en protéines par rapport au pourcentage du son de blé ou encore la concentration en protéines des cristaux sont restés cependant toujours plus faibles que celui obtenu dans le milieu 6 % son. Ces résultats reflètent de nouveau l'effet de l'oxygène sur les voies métaboliques impliquées dans la synthèse des protéines de toxines, et ils sont en accord avec ceux de Ghribi *et al*. (2006) qui ont montré que des concentrations de substrats plus élevées peuvent être utilisées sans affecter la synthèse des toxines si des profils d'aération adéquats sont appliqués.

V.4. Conclusions

L'étude de l'effet de l'aération sur la cinétique de la fermentation de *B.thuringiensis* effectuée dans ce chapitre nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- **Lorsque la disponibilité de l'oxygène est faible (K_La égal à 7,2 h^{-1} pour nos conditions de milieu), la croissance de notre souche est inhibée et la sporulation n'a jamais lieu. A partir d'un seuil d'aération suffisant (13,3 h^{-1} ici), l'aération permet une croissance puis une sporulation de notre souche. L'augmentation de cette aération n'a cependant pas eu un effet significatif sur la concentration maximale des cellules, des spores et des cristaux mais elle a favorisé les cinétiques des phases de croissance, de sporulation et de libération des spores. A partir de conditions correspondant à un K_La égal à 65.5 h^{-1}, l'oxygène n'a plus été limitant (milieu 6 % de son de blé) pour la production des protéines de toxines et la cinétique de la fermentation a été similaire pour K_La égal à 106,2 h^{-1}.**

- **Pour les mêmes conditions d'agitation et de flux d'air (0,34 $L.L^{-1}min^{-1}$, 500 rpm), le K_La a diminué avec l'augmentation du pourcentage de son dans le milieu de culture. Les quantités maximales de cellules, spores, et cristaux obtenues ont toujours été**

proportionnelles au pourcentage de son dans le milieu ce qui traduit une limitation par le « substrat solide » et pas par l'oxygène.

- **Les quantités de protéines de toxines produites ont par contre été affectées par le niveau d'oxygénation. Si leur quantité a augmenté avec l'aération, le rendement protéines de toxines par rapport au pourcentage de son dans le milieu ainsi que le rapport cristaux produits/protéines produites ont diminué. L'augmentation du taux de transfert d'oxygène dans le milieu 9 % a entrainé une amélioration de la production des protéines de toxines sans changement de la concentration des cellules montrant que le flux d'énergie générée dans le catabolisme n'a pas été utilisé pour générer de nouvelles cellules (croissance) ou pour maintenir l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules (maintenance), mais pour la synthèse de delta-endotoxines. On peut ainsi déduire que les besoins en oxygène de la souche « Lip » pour la croissance ne sont pas identiques à ces besoins pour une production optimale de protéines de toxines.**

En termes de résultats pour le passage à une échelle industrielle, il a été montré que :

- **La meilleure productivité des protéines de toxines de 96,1 mg/L.h a été obtenue dans le milieu 9 % dans des conditions d'aération correspondant à un K_La de 102 h^{-1} (flux d'air de 1,34 $L.L^{-1}min^{-1}$). Cependant ce flux d'air (et K_La) semble difficile à atteindre à l'échelle industrielle.**

- **Lorsque le flux d'air (et le K_La) a été abaissé à des valeurs plus raisonnables, la meilleure productivité en protéines de toxines (85.7 mg/L.h) a été atteinte dans le milieu 6 %. Par contre la meilleure productivité en cristaux a été atteinte pour le milieu 9 % mais avec des cristaux moins concentrés en protéines que ceux obtenus à 6 %.**

- **Une très bonne corrélation a été observée entre les courbes de croissance de *B.thuringiensis* et les courbes de variations du pourcentage de CO_2 dans les effluents**

gazeux pour les différentes conditions de culture. Le suivi de ce paramètre pourrait s'avérer un outil utile et rapide de prédiction de la phase de croissance de la bactérie, permettant de surveiller et contrôler le procédé de production à l'échelle industrielle.

CHAPITRE VI

ESSAIS INDUSTRIELS

VI.1. Introduction

Avec l'augmentation de la conscience des dangers liés à l'utilisation des pesticides, la solution alternative d'utilisation de biopesticides est devenue une priorité tant pour les scientifiques que pour les politiques. Le Liban, comme beaucoup d'autres pays, tente de faire émerger une politique nationale pour l'utilisation de « biopesticides » à des prix abordables pour les agriculteurs. Aujourd'hui, il n'existe pas de production locale de biopesticides au Liban. Toutefois, deux entreprises importent actuellement des biopesticides sur le marché libanais au prix de 33$/L (coût de traitement pour 0,02 à 0,1 hectare) ce qui reste relativement assez élevé et empêche un développement de ces produits. Dans ce contexte, l'Université Saint Joseph (USJ) et l'ONG ***arcenciel***, dans le cadre de son programme environnement, ont lancé en juillet 2011 le projet « des biopesticides pour une alimentation plus saine au Liban » visant à réduire l'impact des pesticides chimiques sur l'environnement et la santé au Liban. L'objectif est de produire localement des pesticides biologiques produits à partir de *B.thuringiensis* et de promouvoir leur utilisation à large échelle. Suite à la signature de l'annexe à l'accord-cadre entre USJ, ***arcenciel*** et une troisième partie, les établissements agricoles de Taanail, cette dernière a consacré un terrain de 300 m^2 pour la construction du centre de l'unité de production de biopesticides dans un domaine appartenant aux Pères Jésuites – couvent Taanail, et donc affilié au gouvernement français.

Ce partenariat a abouti à la construction d'un centre de production qui s'est achevé pour les parties génie civil en janvier 2014. Les différents éléments de la chaine de production ont été mis en place en avril 2014 : le fermenteur de 100 L, le fermenteur de 1000 L, la cuve de décantation de 800 L, les cuves pour les acides, bases et anti-mousses, le système de refroidissement et toutes les vannes et les valves (Figure VI.1). La programmation pour faire l'automatisation des machines a été préparée mais n'est pas encore mise en place mais de premiers essais ont pu être réalisés en contrôlant la température et l'oxygénation.

Les chapitres précédents ont montré, au niveau du laboratoire, la mise au point d'un nouveau milieu de culture à base d'un déchet de l'agro-industrie disponible au Liban à faible prix, le son de blé, et la détermination des conditions optimales de production des protéines de toxines dans ce milieu de culture. Ces travaux ont révélé que l'aération est un facteur clé affectant la

productivité des protéines de toxines de la souche « Lip » de *B.thuringiensis*. En se basant sur ces résultats, des premiers essais pour la production au niveau du bioréacteur de 1000 L ont pu alors être réalisés. Cependant, étant donné la réception tardive dans le déroulement de la thèse de l'installation industrielle, seuls quelques premiers tests ont pu être effectués. Ces résultats, bien que parfois incomplets, sont présentés dans ce chapitre car ils permettent de donner une idée du potentiel de l'installation mais aussi de la marge de progression restante pour atteindre une production industrielle aboutie.

Un autre aspect pour aller vers une commercialisation du produit biopesticide est la stabilité et les conditions d'utilisation du produit. De premiers tests, préliminaires là aussi, ont été réalisés et sont présentés dans ce chapitre.



Figure VI.1. Unité de production des biopesticides à Taanail

VI.2. Essais de production au niveau du fermenteur de 1000 L

Les essais de production faits au niveau du bioréacteur de 1000 L visaient surtout à valider à l'échelle industrielle les résultats obtenus au laboratoire. Dans les chapitres précédents, nous avons vu que le meilleur rendement (protéines de toxines produites par rapport au son de blé utilisé) a été obtenu dans un milieu son de blé 6 % (masse/volume) dans des conditions d'aération correspondant à un K_La de 65,5 h^{-1} (500 rpm et 0.33 $L.L^{-1}min^{-1}$) alors que la meilleure productivité (protéines de toxines produites par unité de temps) a été atteinte dans le milieu 9 % pour un K_La de 102 h^{-1} (500 rpm et 1.34 $L.L^{-1}min^{-1}$). Pour les premiers tests, le milieu son de blé 6 % a été choisi en raison notamment de sa plus faible viscosité. Celle-ci doit simplifier la pulvérisation du produit final. Différentes conditions d'aération ont été testées. La vitesse d'agitation a été fixée à 500 rpm ce qui représente la vitesse maximale qui peut être atteinte par le mobile d'agitation dans le bioréacteur de 1000 L. Trois flux d'air ont été testés : 0.12, 0.29 et 0.58 $L.L^{-1}.min^{-1}$ (**partie II.3.3 du chapitre Matériels et Méthodes)**. Pour des problèmes techniques et par manque de temps pour résoudre ces problèmes, la détermination du K_La n'a pu être faite au niveau du bioréacteur de 1000 L. Les résultats de ces essais sont regroupés dans le Tableau VI.1.

Tableau VI.1. Concentration des spores et des cristaux et concentration et productivité des protéines obtenues pour différentes conditions d'aération dans le fermenteur de 1000 L

Flux d'air ($L.L^{-1}.min^{-1}$)	Spores ($x10^9$ spore/mL)	Cristaux ($x10^9$ cristal/mL)	Protéines ($g.L^{-1}$)	Productivité ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)
0.12	1,92	1,9	2,04	34
0.29	1,93	1,9	2,21	46,0
0.58	1,96	1,93	2,4	66,7

Les concentrations obtenues des cristaux et des spores ont été du même ordre dans les différentes conditions d'aération testées alors que la concentration et la productivité des protéines des toxines ont augmenté avec l'augmentation du flux d'air. Les tendances de variation observées dans les essais de production effectués au niveau du laboratoire se retrouvent donc ici : les

quantités de protéines produites et la productivité augmentent quasi linéairement avec l'oxygénation apportée (graphe VI.2), tout au moins dans la gamme de flux d'air utilisé.

Si les tendances de variations de la productivité des protéines de toxines en fonction du flux d'air dans les fermenteurs de 2 L et 1000 L sont identiques, la comparaison des valeurs absolues montre une différence entre les deux échelles de fermenteurs (Figure VI.2).

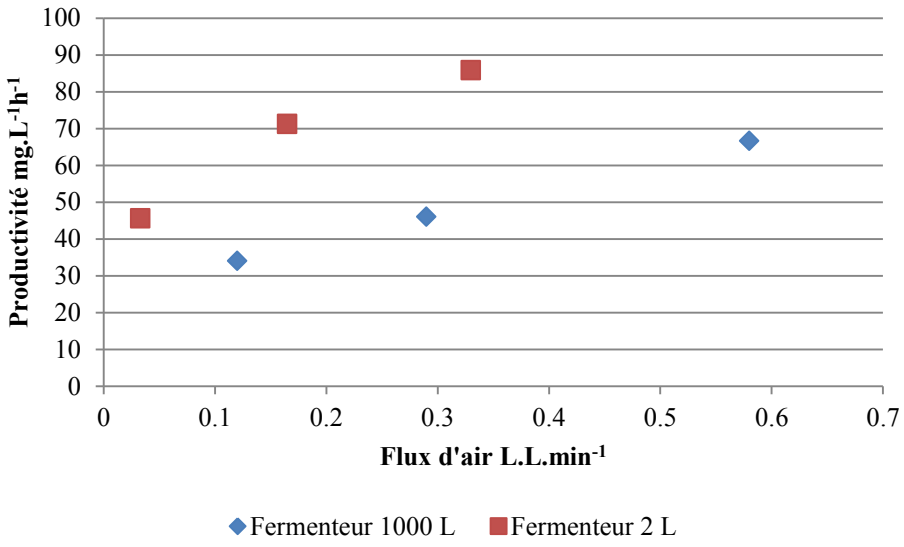


Figure VI.2. Variation de la productivité des protéines en fonction du flux d'air dans les fermenteurs de 2 et 1000 L

Pour une vitesse d'agitation identique de 500 rpm, la productivité des protéines de toxines obtenue dans le fermenteur de 1000 L pour un flux d'air de 0,29 L.L.min^{-1} est du même ordre que celle obtenue dans le bioréacteur de laboratoire de 2 L pour un flux environ 10 fois plus petit de 0,033 L.L.min^{-1}. Pour le flux maximum testé de 0,58 L.L^{-1}min^{-1} dans le fermenteur de 1000 L, la productivité obtenue correspond à un flux environ 5 fois plus petit dans le fermenteur de 2 L. Ces différences peuvent s'expliquer par des valeurs de K_La différentes entre les 2 installations. Une même vitesse d'agitation et un même débit d'aération ne conduisent pas obligatoirement à un même transfert d'oxygène. Les natures géométriques du mobile d'agitation et de la cuve jouent également un rôle.

Dans notre cas, le fermenteur de 2 L comporte deux turbines d'agitation qui sont des turbines Rushton alors que l'agitation dans le fermenteur de 1000 L est assurée par deux turbines, chacune à deux pales inclinées. D'après karimi *et al*. (2013), la turbine Rushton est plus efficace pour briser les bulles d'air car elle a une aire plus élevée de la surface transversale et une amélioration de 23 à 77 % des valeurs de K_La a été obtenue en utilisant la turbine Rushton par rapport à d'autres turbines (turbines à quatre pales inclinées, turbines à deux pales inclinées).

Les meilleures productivités obtenues à l'échelle de 2L pourraient donc s'expliquer par un meilleur K_La. Cette hypothèse pourra être confirmée dès que nous serons techniquement en mesure d'évaluer le K_La dans le fermenteur de 1000L. Les résultats sont toutefois encourageants car le comportement de la souche vis-à-vis de l'aération semble similaire.

Pour le flux d'air de 0,58 $L.L^{-1}min^{-1}$, qui est le flux maximal qui peut être appliqué pour un volume utile de 600 L dans le bioréacteur de 1000 L, la cinétique de la fermentation de « Lip » a été suivie. La courbe de croissance obtenue est présentée dans la Figure VI.3.

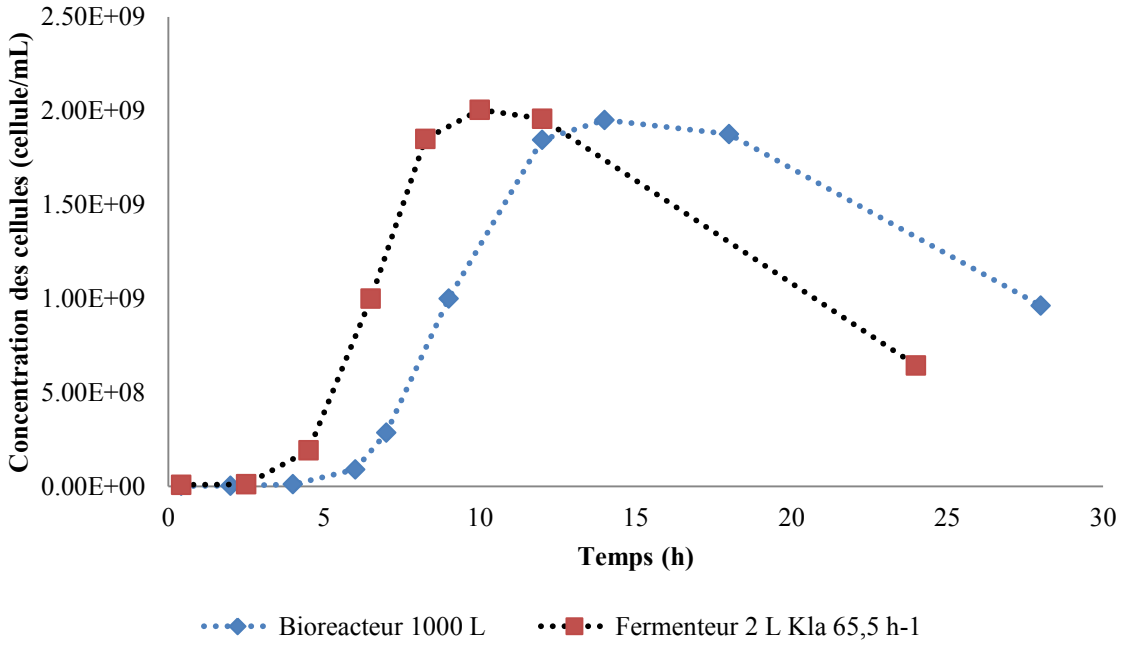


Figure VI.3. Comparaison des courbes de croissance de « Lip » dans le fermenteur 2 L pour K_La de 65,5 h^{-1} et dans le bioréacteur de 1000 L pour un flux d'air de 0,58 $L.L^{-1}min^{-1}$

Le tableau VI.2 montre le temps correspondant à chacune des phases de croissance de « Lip » dans le bioréacteur de 1000 L en comparaison avec le fermenteur de 2 L.

Tableau VI.2. Temps de fin de chacune des étapes de croissance de « Lip » dans le fermenteur de 1000 L en comparaison avec le fermenteur de 2 L

	Fermenteur 1000 L	Fermenteur 2 L
I.a. Phase de latence	**5 h**	**2,5 h**
I.b. Croissance exponentielle	**10 h**	**6,5 h**
I.c. Décélération de la croissance	**12 h**	**8,5 h**
II. Fin de la phase végétative – début de libération des spores matures	**18 h**	**12 h**
III. Début de libération des spores matures – fin de la fermentation (90 % de spores libres)	**36 h**	**29 h**

Les profils dans le fermenteur de 1000 L sont très semblables à ceux qui avaient été obtenus dans le fermenteur de 2 L. Les mêmes concentrations maximales de cellules ont été atteintes et les mêmes phases de croissance sont observées. Un simple décalage des phases est observé et ce dès le début de la fermentation. En fait la phase de latence est plus longue de 2,5 h dans le fermenteur de 1000L. Ceci peut facilement s'expliquer par la différence du processus d'inoculation entre les 2 fermenteurs. Dans ces essais préliminaires, sur la base des travaux de Dulmage (1990), un pourcentage d'inoculum de 0,5 % a été utilisé alors que dans les fermenteurs de 2 L le pourcentage de l'inoculum a été de 2 %.

Ce décalage sur la latence se retrouve par la suite dans toutes les phases. Il s'accentue légèrement par la suite, passant de 2,5 h à 6 h en fin de fermentation. Ceci peut certainement s'expliquer par les différences de transfert d'oxygène déjà évoquées. Le flux d'air le plus élevé testé (0,58 $L.L^{-1}min^{-1}$) ne permet certainement pas d'atteindre le K_La de 65,5 h^{-1} correspondant à un flux de 0,33 $L.L^{-1}min^{-1}$ dans le fermenteur 2 L.

Malgré une procédure d'inoculation non optimisée par rapport à l'âge et la quantité, les résultats obtenus dans le fermenteur de 1000 L sont très encourageants. Ils se rapprochent très fortement de ceux qui avaient été obtenus en fermenteur de 2 L. Les niveaux de productivités sont déjà très corrects et laissent à penser que quelques ajustements permettront de retrouver les niveaux atteints en fermenteur de 2 L.

VI.3. Processus de production de « Lip » dans le bioréacteur de 1000 L

L'optimisation du pourcentage de l'inoculum du bioréacteur de 1000 L est nécessaire vu qu'elle réduit les risques de contamination et peut permettre d'améliorer la productivité des protéines de toxines de « Lip ». Mais, les résultats de la production au niveau du laboratoire ainsi que des essais préliminaires de production dans le bioréacteur de 1000 L, nous permettent déjà de proposer un plan opérationnel de production de « Lip » à l'échelle industrielle :

1. Préparation de l'inoculum du fermenteur de 100 L

   1.1. Préparation du pré levain :

   - Inoculation d'un erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL d'un milieu LB par trois à quatre colonies prises stérilement à partir d'une boite de pétri (un milieu de conservation de « Lip »)
   - Incubation de l'erlenmeyer à 30 °C, 340 rpm jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle (aux alentours de 12 h).

   1.2.Préparation du levain :

   - Inoculation d'un fermenteur de 5 L contenant 1,47 L d'un milieu son de blé 6 % (m/v) par 30 mL du pré levain (pourcentage de l'inoculum 2 % v/v).
   - Ajustement des conditions d'aération de façon à avoir un K_La égal à 65,5 h^{-1}.
   - Fermentation jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle (aux alentours de 8 h)

2. Fermentation dans le bioréacteur de 100 L

   - Inoculation du fermenteur de 100 L contenant 58.8 L du milieu son de blé 6 % (m/v) par 1,2 L du levain correspondant à un pourcentage d'inoculum de 2 %.
   - Ajustement des conditions d'aération de façon à avoir un K_La égal à 65,5 h^{-1}.

3. Fermentation dans le bioréacteur de 1000 L
    - Après 8 à 10 h de fermentation (temps correspondant à la fin de la phase de croissance exponentielle) dans le bioréacteur de 100 L, transfert de 12 L de la culture (un pourcentage d'inoculum de 2 %) dans le fermenteur de 1000 L contenant 588 L du milieu son de blé 6 % (m/v)
    - Ajustement du flux d'air à 0,58 $L.L^{-1}min^{-1}$ et de la vitesse d'agitation à 500 rpm.

La fin de la fermentation est identifiée par la lyse de la majorité des cellules.

Le comptage sur cellule de Petroff Hausser permet de déterminer l'âge exact de l'inoculum dans chacune des étapes citées ci-dessus sachant que la concentration maximale des cellules qui peut être obtenue dans le milieu son 6 % est de l'ordre de 2.10^9 cellules/mL.

Le processus de production de « Lip » à l'échelle industrielle est schématisé dans la Figure VI.4.

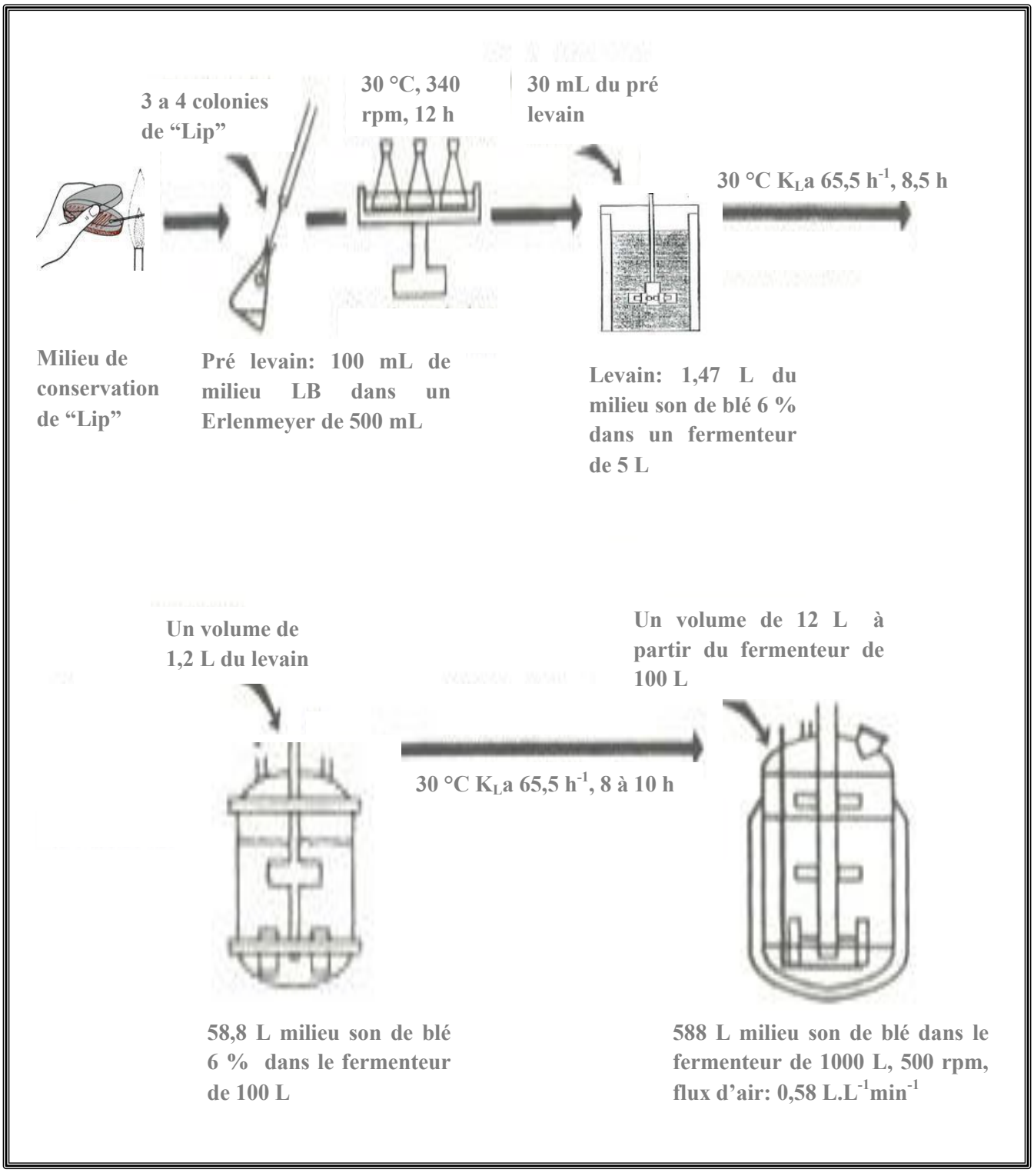


Figure VI.4. Processus de production de « Lip » à l’échelle industrielle

VI.4. Etude de la stabilité du produit et condition d'utilisation

Pour être efficace, le mélange de spores et cristaux produits doit rester stable jusqu'à son utilisation aux champs. Les essais de stabilité effectués ont eu pour but d'étudier la possibilité de dégradation des cristaux protéiques de « Lip », produits dans le milieu son de blé 6 %, pendant le stockage à différentes températures (par manque de temps, cette étude a été limitée à une durée de stockage d'un mois) et sous l'action des rayons UV.

VI.4.1. Effet de la température

Le produit liquide de fermentation de la souche « Lip » de *B.thuringiensis* dans le milieu son de blé 6 % a été placé à différentes températures (4, 18 et 35 °C). Des échantillons ont été prélevés tous les 10 jours durant un mois. Le tableau VI.3 regroupe les valeurs moyennes des concentrations des cristaux et de celles des protéines totales mesurées dans les différents échantillons.

Tableau VI.3. Effet du stockage du produit à différentes températures sur la concentration des cristaux bipyramidaux de « Lip » et sur celle des protéines totales

Température	Temps	Concentration des cristaux bipyramidaux ($.10^9$ cristal/mL)	Concentration des protéines ($g.L^{-1}$)
	initial	1,79	2.429
4 ºC	10 jours	1,79	2,429
18 ºC		1,77	2,403
35 ºC		1,76	2,403
4 ºC	20 jours	1,78	2,416
18 ºC		1,76	2,396
35 ºC		1,76	2,392
4 ºC	30 jours	1,77	2,400
18 ºC		1,76	2,385
35 ºC		1,74	2,376

Le stockage du produit *B.thuringiensis* à différentes températures (4, 18 ou 35 °C) en une durée allant jusqu'à un mois n'a montré aucun effet significatif sur la concentration des cristaux ni sur celle des protéines totales. Cette stabilité du produit suggère que son activité protéolytique endogène est réduite. En plus le pH du produit de 6,3 diminue le risque de dégradation des cristaux qui sont plutôt dégradés à pH alcalin.

D'autre part, il est important de noter qu'aucune contamination n'a été observée après un mois de stockage du produit à différentes températures.

VI.4.2. Effet des rayons UV

L'effet de l'exposition du produit *B.thuringiensis* à la lumière UV de longueur d'onde 365 nm sur la concentration des cristaux et celle des protéines totales a été étudié. La concentration des protéines totales n'a pas changé significativement alors que la concentration des cristaux a diminué avec le temps de soumission à la lumière UV comme il est montré sut la Figure VI.5. Presque la moitié des cristaux ont été dégradés après 8 h d'irradiation.

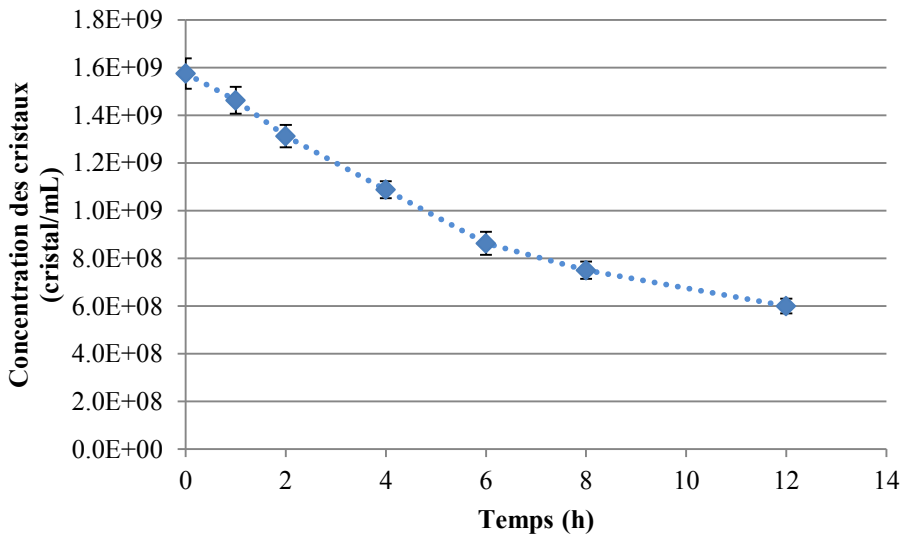


Figure VI.5. Variation de la concentration des cristaux en fonction du temps

Il est connu que la gamme UV-A/B (280-380 nm) de la lumière solaire qui atteint la surface de la Terre est considérée comme responsable de la photo-dégradation notable des cristaux de *B.thuringiensis* et de la perte de la toxicité (Pozgay *et al*., 1987 ; Puzstai *et al*., 1991). Les cristaux bipyramidaux de « Lip » ont montré une sensibilité élevée à la lumière UV d'où l'importance d'ajouter des agents de protection contre les irradiations UV lors du développement des formulations du produit « Lip ».

VI.5. Tests de l'efficacité du produit sur le champ

Des tests de terrain pour vérifier l'efficacité du produit ont été effectués par ***arcenciel.***

Ces tests ont été réalisés en adoptant le principe de la lutte intégrée qui consiste à l'utilisation d'une méthode de monitorage au niveau du champ se basant sur des pièges sexuels, station météo, pièges nutritifs, agitation physique, et /ou inspection visuelle en vue de déterminer la date critique d'intervention. Les autres paramètres pris en considération dans le choix de la date d'intervention sont la durée de vie du produit, le cycle de vie de l'insecte et les conditions climatiques.

A partir du produit liquide de la fermentation de « Lip » à une concentration des protéines de toxines de 1 $g.L^{-1}$, en se basant sur les recommandations d'utilisation d'un produit commercial « Foray » à base de *B.thuringiensis* présent sur le marché Libanais, les dilutions suivantes ont été testées : 1,4 L ; 2 L et 2,6 L/200 L.

L'application du produit *B.thuringiensis* a été menée dans l'après-midi (après 4 :00 pm) pour réduire le risque de dégradation des cristaux par les radiations solaires. Le nombre d'applications par an variait en fonction du cycle de vie de l'insecte et une répétition a été faite après 3 à 10 jours de l'application selon l'insecte et selon les besoins déterminés à partir des données récupérées du système de monitorage.

L'efficacité du produit *B.thuringiensis* pour le traitement des insectes lépidoptères tels que *Cydia pomonella* et *Tuta absoluta* a été prouvée.

Le tableau VI.4 montre la diminution du niveau d'infection des fruits récoltés (les pommes) par *Cydia pomonella* après application de ce produit.

Tableau VI.4. Niveau de l'infection par *Cydia pomonella* sur les fruits récoltés

Numéro de la parcelle	Dose du biopesticide/200 L d'eau	Concentration des protéines de toxines (µg/L)	Pourcentage d'infection
C_0 (contrôle)	0	0	44,44
C_1	1,4	7	33,33
C_2	2	10	18,18
C_3	2,6	13	9,09

Dans le traitement de *Tuta absoluta* le produit *B.thuringiensis* à une concentration de 2,6 L/200 L a été aussi efficace qu'un savon insecticide commercial « Biologico » connu pour la lutte contre ces ravageurs de tomates.

VI.6. Conclusions

Les bases d'une production industrielle et d'une utilisation de lots de biopesticides ont été présentées dans ce chapitre. Elles ont permis de montrer la faisabilité du projet et ont mis en évidence les pistes à développer. Les principaux points à mettre en exergue sont :

- **Les premiers essais réalisés, au niveau de l'unité de production construite à Taanail, ont permis de produire de façon satisfaisante des lots de biopesticides. L'unité de production construite fonctionne et est capable de reproduire les performances obtenues en fermenteur 2 L dans des réacteurs de 1000 L (600L utiles).**
- **La productivité des protéines de toxines atteinte légèrement inférieure à celle obtenue au niveau du laboratoire peut être certainement attribuée aux différences d'apport en oxygène (K_La non évalué en fermenteur de 1000L) et aux différences de protocole d'inoculation. L'ajustement de l'aération et l'amélioration de la préparation de l'inoculum devraient permettre de retomber sur les mêmes performances entre les 2 échelles.**
- **La stabilité du biopesticide produit s'est avérée insensible à la température dans une gamme de 4 à 35°C sur un mois. Par contre, les cristaux bipyramidaux de « Lip » ont été très sensibles aux rayons UV de longueur d'onde 365 nm. Une formulation**

avec des additifs protecteurs devra être obligatoirement envisagée pour assurer l'efficacité du produit.

- **Des premiers tests sur des cultures témoins du biopesticide produit ont été réalisés au cours d'une étude annexe à cette thèse et ces tests ont donné des résultats très encourageants.**

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

ET

PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce projet de recherche était de réaliser les étapes devant mener à la production industrielle d'une souche cible de *B.thuringiensis kurstaki*, pour en faire un biopesticide commercialisable au Liban. L'analyse bibliographique a soulevé trois éléments importants à développer pour atteindre ce but:

- Le milieu de culture :

La composition du milieu de culture est particulièrement importante pour obtenir un rendement maximal du produit *B.thuringiensis*. Son effet est dépendant de la souche utilisée : un milieu particulier qui peut soutenir une bonne croissance et la production de toxines par une souche peut-être moins satisfaisant pour une autre. De plus, le coût de production des pesticides biologiques est élevé à cause du prix des substrats de fermentation qui représente 35 à 59 % du coût total dans un procédé conventionnel de production.

- Les conditions de fermentation :

Les paramètres de la fermentation, surtout l'aération, jouent un rôle clé dans la production de *B.thuringiensis*. La détermination des conditions optimales de fermentation pour chaque souche mise en production commerciale est nécessaire car différentes souches peuvent avoir des réponses différentes aux conditions de culture.

- L'évaluation de l'efficacité du biopesticide produit :

Cette évaluation n'est pas simple avec les méthodes actuelles. Il est apparu un manque de méthodes analytiques permettant l'évaluation régulière du produit *B.thuringiensis* et de méthodes de séparation rapide des spores et des cristaux fournissant des cristaux purs nécessaires comme standards.

Nous avons donc travaillé selon ces 3 axes dans cette thèse avec des degrés d'avancements et des réussites diverses.

Pour évaluer le produit *B.thuringiensis* une méthode de dosage des cristaux dans le milieu de fermentation, plus fiable que le comptage microscopique sur une lame de Petroff Hausser, a été recherchée. Des cristaux et des spores purs étaient nécessaires pour être utilisés comme standards. Par suite, une méthode rapide et simple de séparation des spores et des cristaux a été

développée. Cette méthode est basée sur l'hydrophobicité des spores et n'affecte pas la toxicité des cristaux. Elle utilise l'hexane et la centrifugation à faible vitesse et ne nécessite aucun équipement cher. Elle a donné de très bons résultats avec l'obtention de cristaux purs à plus de 99 %.

Des essais de quantification des cristaux par une méthode physique, « la méthode speckle », ont pu alors être effectués. L'étude des « speckle » des échantillons de spores pures, cristaux purs et mélanges (50 % spores, 50 % cristaux) de la souche « Lip » a montré que les valeurs normalisées du degré de polarisation linéaire diminuent avec l'augmentation de la concentration des diffuseurs (spores ou cristaux), mais qu'il n'était pas possible de distinguer les spores des cristaux de « Lip ». Par contre, les premiers résultats obtenus semblent montrer que cette méthode pourrait être utilisée pour évaluer la taille des cristaux, paramètre qui pourrait se révéler important pour l'efficacité du biopesticide sur les insectes.
Pour la suite des études, le dosage des protéines totales et la détermination de la concentration des cristaux ont été systématiquement réalisés car on ne sait si l'efficacité du produit résulte de l'un, de l'autre ou d'une combinaison des deux.

La formulation d'un milieu de culture alternatif a fait l'objet du chapitre IV. Un milieu minimum contenant du son de blé a été mis au point. Ce résidu de l'industrie céréalière, disponible en quantité et à faible coût, s'est avéré efficace pour la production de biopesticide à base de *B.thuringiensis*, même sans aucun autre ajout de substrats carbonés ou azotés. En considérant les trois facteurs, rendement relatif, productivité et coût, le milieu mono-composant de son de blé 6 % (m/v) s'est montré meilleur, en comparaison avec des milieux de référence classiquement utilisés dans la bibliographie. Ces résultats obtenus en erlenmeyer pour une souche de *B.thuringiensis* ont été identiques pour la deuxième souche testée.
L'utilisation de ce sous-produit de l'agro-industrie simplifie la préparation du milieu de culture de *B.thuringiensis* à l'échelle industrielle et contribue à réduire considérablement les coûts de production.

Dans le chapitre V, l'influence des conditions d'aération, caractérisées par le coefficient volumétrique de transfert du dioxygène K_La, sur la cinétique de la fermentation a été étudiée en vue de déterminer les conditions optimales pour produire le biopesticide. Parmi les valeurs

testées de K_La, seulel celle de 7,2 h^{-1} a entrainé une inhibition de la croissance et la sporulation n'a pas eu lieu. Pour les K_La dans la gamme 13,3-106,2 h^{-1}, l'oxygène n'a pas été un facteur limitant de la croissance et des populations maximales du même ordre ont été obtenues. Un taux minimal de transfert d'oxygène de 3,2 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$ s'est avéré nécessaire pour la sporulation. Un effet notable du taux de transfert de l'oxygène sur la cinétique de la fermentation a été observé avec réduction du temps d'un cycle de 48 h pour K_La égal à 13,3 h^{-1} à 29 h pour K_La égal à 65,5 h^{-1}. Cette étude cinétique a aussi mis en évidence le rôle clé de l'oxygène dans la synthèse des protéines de toxines et a montré que les besoins en oxygène de la souche « Lip » de *B.thuringiensis* pour une synthèse optimale de protéines de toxines sont différents de ces besoins pour la croissance. Ce n'est qu'à partir de K_La égal à 65,5 h^{-1} que l'oxygène n'a plus été limitant pour la synthèse des toxines dans le milieu son 6 %. Ces conditions donnant une productivité de toxines de 85,7 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ se sont révélées optimales pour le passage à l'échelle industrielle car la meilleure productivité des protéines de toxines de 96,1 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ obtenue dans le milieu son 9 % pour un K_La de 102 h^{-1} (flux d'air de 1,34 $L.L^{-1}min^{-1}$) ne paraît pas atteignable à l'échelle industrielle.

Dans le chapitre VI, les essais préliminaires de production dans le fermenteur de 1000 L ont été présentés. Après la construction et la mise en route de l'unité de production, les premiers essais réalisés ont donné des résultats de productivité prometteurs, se rapprochant fortement de ceux qui avaient été obtenus à l'échelle du laboratoire. Les premiers essais de stockage du produit ont montré qu'il était stable au moins pendant 1 mois pour des températures comprises en 4 et 38°C. Par contre, il s'est montré très sensible au rayonnement UV.

L'ensemble de ces conclusions nous amène à formuler ici de nombreuses pistes pour la poursuite de ces travaux. En premier lieu, il s'agira de poursuivre les axes de recherches développés ici, notamment:

- La méthode d'évaluation de l'efficacité du biopesticide :

Des études pour relier la toxicité du produit (déterminée par des bioessais) à sa concentration en cristaux, à la taille des cristaux et à sa concentration en protéines permettraient de cibler le ou les facteurs déterminants lors de la production.

- D'un point de vue métabolique :

L'identification et le dosage de différents métabolites formés tout au long de la fermentation de « Lip » dans les différentes conditions d'aération permettraient de mieux comprendre le rôle de l'oxygène dans la synthèse des protéines cristallines. Le suivi des substrats azotés par exemple pourrait donner des renseignements.

- D'un point de vue procédé industriel :

L'optimisation et la standardisation des protocoles industriels apparaîssent nécessaire.

- D'un point de vue formulation :

Une formulation appropriée et stable du produit est à développer. Cela passe par la détermination et l'optimisation des concentrations des additifs anti-UV et anti microbiens, des additifs augmentant l'adhérence des biopesticides sur les feuilles, des phagostimulants donnant un goût plus attractif au produit formulé, tout en prenant en considération le synergisme entre les additifs ajoutés et notre milieu de culture. L'efficacité du produit formulé devra être testé au niveau du laboratoire ainsi que sur le champ.

Dans un second temps :

- Le travail réalisé sur une souche durant cette thèse devra être en partie reproduit pour d'autres souches isolées par le département de microbiologie de l'Université Saint Joseph, qui ont montré des toxicités envers différents ordres d'insectes. Les tests concerneront l'efficacité du milieu son de blé, l'effet de l'aération et la formulation.

- Les différentes souches pourront ainsi à terme produire différents lots de protéines et en les mélangeant proposer un produit présentant le plus large spectre de lutte. L'efficacité de ces mélanges dans des essais in vitro au niveau du laboratoire ainsi que sur le champ devra être testée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-hameed A., 2001. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modeling and scaling-up studies. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 857-861.

Abdel-Hameed A., Carlberg G., EL-Tayeb.O.M., 1991. Studies on the *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt- IV Characterization of fermentation conditions for δ endotoxin prodtucion. World Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 231-236.

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

Agustini L., Efiyanti L., Faulina S.A., Santoso E., 2012. Isolation and characterization of cellulase and xylanase producing microbes isolated from tropical forests in Java and Sumatra. International Journal of Environment and Bioenergy 3(3): 154-167.

Ahmad M., Sayyed A.H., Saleem M.A., 2008. Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Crop Protection 27(10): 1367–1372.

AlOtaibi S.A., 2012. Feeding rate and mortality impact of crystals and endospores versus crystals – producing recombinants of *Bacillus thuringiensis* against Cotton Leafworm. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries 1: 224-234.

Alves L.F.A., Alves S.B., Pereira R.M., Capalbo D.M.F., 1997. Production of *Bacillus thuringiensis Berliner* var. *kurstaki* grown in alternative media. Biocontrol Science and Technology 7: 377- 383.

Amaral I.C., Braga R.A. Ramos E.M., Ramos A.L.S., and Roxael E.A.R., 2013. Application of biospeckle laser technique for determining biological phenomena related to beef aging. Journal of Food Engineering 119 (1): 135–139.

Amicarelli A., Sciascio F. di, Toibero J. M. and Alvarez H., 2010. Including dissolved oxygen dynamics into the *Bt* δ-endotoxins production process model and its application to process control. Brazilian Journal of Chemical Engineering 27 (1):41-62.

Amin G, Alotaibi S., Narmen A. Youssef and Saleh W.D., 2008. Optimization of a fermentation process for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 2465–2471.

Amin G, Alotaibi S., Narmen A. Youssef and Saleh W.D., 2008. Bioinsecticide production by the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Pattern of cell growth, toxin production and by-product synthesis). Journal of Basic and Applied Sciences 4 (1): 27-31.

Anderson, T., 1990. Effects of carbon:nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal crystal protein. M.E.Sc Thesis, The University of Western Ontario, London, Canada.

Anderson R.K.I., Jayaraman K, 2003. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* for biopesticide production. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 17 (3): 225–231.

Anderson R.K.I, Jayaraman K., Voisard D., Marison Ian W., Stockar U. von., 2002. Heat flux as an on-line indicator of metabolic activity in pilot scale bioreactor during the production of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* based biopesticides. Thermochimica Acta 386: 127–138.

Andrews R.E., Faust R.M., Wabiko H., Raymond, K.C., and Bulla L.A., 1987. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology 6: 163-232.

Andrews R.E., Bechtel D.B., Campbell B.S., Davidson L.I., and Bulla L.A., 1981. Solubility of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* and the presence of toxic protein during sporulation, germination, and outgrowth, p. 174-177. In H. S. Levinson, A. L. Sonenshein, and D. J. Tipper (ed.), Spores VIII. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Andrews, R.E., Iandolo J.J., Campbell B.S., Davidson L.I., and Bulla L.A., 1980. Rocket immunoelectrophoresis of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Applied and Environmental Microbiology 40:897-900.

Ang Barbara J. and Nickerson Kenneth W., 1978. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by Zonal Gradient Centrifugation. Applied and Environmental Microbiology 36 (4): 625-626.

Angus T. A., 1959. Separation of bacterial spores and parasporal bodies with a fluorocarbon. Journal of Insect Pathology 1:97-98.

Anto H., Trivedi U., Patel K., 2006a. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. Food Technology and Biotechnology 44: 241–245.

Aoki K., Chigasaki Y., 1916. Ueber atoxogene Sotto-Bacillen, Bull. Imp. Ser. Exp. Stat. Nakano, Tokyo 1: 141.

Arcas J., Yantorno G., Ertola R., 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnology Letters 9 (2):105–110.

Arcas J., Yantomo O., Arraras B., Ertola R, 1984. A New Medium for Growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. Biotechnology letters 6 (8): 495-500.

Aronson A.I., 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. Molecular Microbiology 7(4): 489-496.

Aronson A.I., and Fitz-James P., 1976. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. Bacteriological Reviews 40: 360-402.

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.

Aubert J.P, Millet J., Castoriadis-May C., 1961. Relation between the rate of growth and sporulation in *Bacillus megaterium*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences 253:1731–1733.

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

Avignone-Rossa C., Arcas J., Mignone C., 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 301–304.

Bandelier S., Renaud R., Durand A., 1997. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. Process Biochemistry 32: 141-145.

Barboza-Corona J.E., Park H.W., Bideshi D.K., Federici B.A., 2012. The 60-kilodalton protein encoded by orf2 in the cry19A operon of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Jegathesan* functions like a C-terminal crystallization domain. Applied and Environmental Microbiology 78: 2005-2012.

Baum J.A., Chu Chi-Rei, Rupar M., Brown G.R., Donovan W.P., Huesing J.E., Ilagan O., Malvar T.M., Pleau M., Walters M., and Vaughn Ty., 2004. Binary Toxins from *Bacillus thuringiensis* Active against the Western Corn Rootworm, Diabrotica virgifera virgifera LeConte. Applied and Environmental Microbiology 70(8): 4889–4898.

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.

Bel Y., Granero F., Alberola T.M., Martinez-Sebastian M.J., Ferre J., 1997. Distribution frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. Systematic Applied Microbiology 20: 652-658.

Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sinai R., Manasherob R., Khamraev A., Troitskaya E.,Dubitsky A., Berezina N., and Margalith Y., 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 63: 4883-4890.

Ben Khedher S., Kamoun A., Jaoua S., Zouari N., 2011. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. New Biotechnology 28(6): 705-12.

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

Bechtel D.B., and Bulla L.A., 1976. Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. Journal of Bacteriology 127: 1472-1481.

Bhatnagar N., 1999. Inorganic phosphate regulates CryIVA protoxin expression in *Bacillus thuringiensis israelensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 262: 359–364.

Bhatnagar N., 1998. Modulation of CryIVA toxin protein expression by glucose in Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Biochemical and Biophysical Research Communications 252: 402-406.

Bihari V., Tripathi C.K.M., Sur B., Liu K.M., Bajpai R., 2002. Mass cultivation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* in fed-batch culture for high spore count and improved insecticidal activity. Indian Journal of Biotechnology 1: 205-208.

Boisvert J., Lacoursière J.O., 2004. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec, Québec, ministère de l'Environnement, Envirodoq no ENV/2004/0278, 101 p., document préparé par l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le ministère de l'Environnement du Québec

Boniolo F.S., Rodrigues R.C., Prata A.M.R., López Maria L., Jacinto T., da Silveira M.M., Berbert-Molina M.A., 2012. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ-endotoxin production Applied Microbiology and Biotechnology 94: 625–636.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.

Braga, R.A., I.M. Dal Fabbro, F.M. Borem, G. Rabelo, R. Arizaga, H. Rabal and M. Trivi, 2003. Assesment of seed viability by laser speckle techniques. Biosystems Engineering 86: 287-294.

Brar S.K., Venna M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., 2006. Efficient centrifugaI recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. Water Research 40: 1310-1320.

Braun S., 2000. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses. In: Navon A., and Ascher K.R.S. (eds), Bioassays of entomopathogenic Microbes and Nematodes, CAB International Publushing, UK, Pages 49-72.

Bravo A., Likitvivatanavong, S., Gill S.S., Soberón M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinseticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41: 1-9.

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.

Bruckner R. and Titgemeyer, F., 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization (Minireview). FEMS Microbiology Letters 209: 141-148.

Brussock S.M. and Currier T.C.,1990. Use of sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins. Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. Chapter 9: 78-87.

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.

Bulla L.A., Grants J.R., JULIAN T., and Rodhes R., 1971. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. III. Radiorespirometry of pyruvate, acetate, succinate, and glutamate oxidation. Canadian Journal of Microbiology 17(8): 1073-1079.

Bulla L.A., Julian G.S., Rodhes R.A., and Hesseltine C.W., 1969. Physiology of spore forrning bacteria associated with insects. I. Glucose catabolism in vegetative Cells. Canadian Joumal of Microbiology 16: 243-248.

CAB International. The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary. London: CPL Business Consultant, 2010. 40p.

Carlson C.R. and Kolstø A.B., 1993. A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome. Journal of Bacteriology 175:1053-1060.

Chee K.M., Kwang S.C., Bong D.H., Jin H.C., Mahn K.C., Hyung S. Lee In S. Shin and Kwang Y. Whang, 2005. Comparative Feeding Values of Soybean Hulls and Wheat Bran for Growing and Finishing Swine. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 18 (6): 861-867.

Cooksey, K. E., 1971. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biochemistry and mode of action. In H. D. Burges and N. W. Hussey (ed.): 247-274.

Couch, T.L., 2000. Industrial Fermentation and Formulation of Entomopathogenic Bacteria. In: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, J.F. Charles, A. Delécluse, C. Nielsen-Le Roux (Eds.), 297-314, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Lereclus D., Baum J., Van Rie J., and Dean D.H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63:807-813.

da Silva M., Furigo A., Furlan A.S., Souza O., 2011. Production of bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in semi continuous processes combined with batch processes for sporulation. Brazilian Archives of Biology and Technology 54 (1): 45–52.

Deng Chao, Peng Qi, Song Fuping and Lereclus Didier, 2014. Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. Toxins 6 (7): 2194-2209.

Devi P.S., Ravinder T., Jaidev C., 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. Journal of Invertebrate Pathology 88 (2): 163-168.

Devidas P.C., Pandit B.H., and Vitthalrao P.S., 2014. Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of Aedes aegypti. The Scientific World Journal Volume 2014 (2014), Article ID 273030, 6 pages http://dx.doi.org/10.1155/2014/273030.

Donavan W.P., Donavan J.C., Engleman J.T., 2001. Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward Agrotis ipsilon and Spodoptera exigua. Journal of Invertebrate Pathology 78: 45-51.

Doran P.M, 1995. Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, San Diego, California.

Doyle R.J., Nedjat-Haiem F., and Singh J.S., 1984. Hydrophobic Characteristics of *Bacillus* Spores. Current Microbiology 10: 329-332.

Dulmage H.T., Yousten A.A., Singer S., Lacey L.A., 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*, UNDP/WORLD BANMHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases p 42.

Dulmage H.T., 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis* perspective from 1989. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 84 (III): 113-122.

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.

Ejiofor A.O., 1991. Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of 'spent brewer's yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. Discovery Innovation 3: 85-88.

Ellar D.J., 1997. The structure and function of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin and prospects for biopesticide improvement. BCPC Symposium Proceedings: Novelty or necessity? No 6.8 : 83-100.

El Khoury M., Azzouz H., Chavanieu A., Abdelmalak N., Chopineau J., Awad k.M., 2014. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new cry 1 Aa gene highly toxic to Ephestia kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Archives of Microbiology DOI 10.1007/s00203-014-0981-3.

English L., Robbins H.L., Von T.M.A., Kulesza C.A., Ave D., Coyle D., Jany C.S., Slatin S.L., 1994. Mode of action of CrylIA: a *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin. Insect Biochem. Molec. Biol. 24 (10): 1025-1035.

Environmental Health Criteria 217, 1999. Microbial Pest Control Agent, *Bacillus thuringiensis*. World Health Organization, Geneva.

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

Eriksson H., Wiktelius S., 2011. Impact of chlorpyrifos used for desert locust control on non-target organisms in the vicinity of mangrove, an ecologically sensitive area. International Journal Pest Management 57(1): 23–34.

Estruch J.J., Warren G.W., Mullins M.A., Nye G.J., Craig J.A., Koziel M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc Natl Acad Sci USA. 93:5389–5394.

Faloci M.M., Yantorno O.M., Marino H.A., Arcas J.A., Ertola R.J., 1993. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki δ -endotoxin . World Journal of Microbiology and Biotechnology 6: 32-38.

Farrera F., Perez-Guevara F., De La Torre M., 1998. Carbon: Nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensls* HD-73. Applied Microbiology and Biotechnology 49:758-765.

Farzana K., Shah S.N.H., Butt F.B., Awan S.B., 2005. Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Pak. J. Pharm. Sci. 18: 55-57.

Fast P.G., 1981. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Microbial Control of Insects and Mites. (Eds.): Burges H. D. and Hussey H. Academic Press,London, New York. p. 223-244.

Fast P.G., 1972. The δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III. A rapid method for separating parasporal bodies from spores. Journal of Invertebrate Pathology 20:139-140.

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.

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).

Ferreira A., Ferreira J., Teixeira A., Rocha F., 2010. Temperature and solid properties effects on gas–liquid mass transfer. Chemical Engineering Journal 162: 743–752.

Foda M.S., Salama H.S., and Selim M., 1985. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. Applied Microbiology and Biotechnology 22:50-52.

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

Ghribi D., Zouari N., Trabelsi H., Jaoua S., 2006. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. Enzyme Microbiology and Technology 40: 614–622.

Ghribi D., Zouari N., and Jaoua S., 2004. Improvement of bioinsecticides production through mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* by u.v. and nitrous acid affecting metabolic pathways and/or delta-endotoxin synthesis. Journal of Applied Microbiology 97: 338–346.

Gincy M.M., Shu-Juan L., Jui-Jen C., and Chieh-Chen H., 2011. DGGE detection and screening of lignocellulolytic bacteria from the termite gut of Coptotermes formosanus. Malaysian Journal of Microbiology 7(4): 201-209.

Glare T.R., and O-Callaghan M., 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. Wiley, Chichester.

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

Goldberg L., Sneh B., Battat E., Klein D., 1980. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptianc otton leaf worm Spodopterali ttoralis Boisd. Biotechnology Letters 2: 419-426.

Gong Y., Mingshun L., Dong X., Hui W., Jin H., Dandan W., 2012. Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. Journal of Proteomics75: 1235–1246.

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.

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

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

Goodman N.S., Gotfried R.J., and Rogoff M.H., 1967. Biphasic System for Separation of Spores and Crystals of *Bacillus thuringiensis*. Journal of bacteriology 94 (2): 485.
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.

Gowda V. and Shivakumar S., 2014. Agrowaste-based polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. Brazilian Archives of Biology and Technology 57 (1): 55-61.

Gupta R., Beg Q.K., Chauham B., 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 381 -395.

Hannay C.L. and Fitz-James P.,1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis Berliner*. Canadian Journal of Microbiology 1: 694–710.

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

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.

Holmberg A., Sievanen R., Carlberg G., 1980. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. Biotechnology Bioengineering 22:1707–1724.

Hu X., Hansen B.M., Eilenberg J., Hendriksen B.N., Smidt L., Yuan Z., Jensen G.B., 2004. Conjugative transfer, stability and expression of plasmid encoding a cry1Ac gene in *Bacillus cereus* group strains 231: 45-52.

Icgen Y., Icgen B., Ozcengiz G., 2002a. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. Research in Mitobiology 153 (9): 599-604.

Icgen Y., Icgen B., Ozcengiz G., 2002b. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of Carbon and nitrogen sources. Research in Microbiology 153 (9): 605-609.

Imai Y., Takei H., Matsumura M., 1987. A simple Na_2SO_4 feeding method for K_La measurement in large-scale fermenters. Biotechnology and Bioengineering 2: 982-993.

Iriarte J., Porcar M., Lecadet M.M., Caballero P., 2000. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. Current Microbiology 40: 402-408.

Ito A., Sasaguri Y., kitada S., Kusaka Y., Kuwano K., Masutomi K., Mizuki E., Akao T., Ohba M., 2004. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. Journal of Biological Chemistry 279: 21282-21286.

Itoqou-Apoyolo C., Drift L.,Vassal J.M., DeBarjac H., Bossy J.P., Leclant F., and Frutos R.., 1995. Isolation multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, Homoesoma nebulella. Applied and Environmental Microbiolgy 61: 4343-434.

Jisha V.N., Smitha R.B. and Benjamin S., 2013. An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. Advances in Microbiology 3:462-472.

Juarez P., Orejas J., 2001. Oxygen transfer in a stined reactor in laboratory scale. Latin American Applied Research 31: 433-439.

Karimi A., Golbabaei F., Mehrnia M.R., Neghab M., Mohammad K., Nikpey A., and Pourmand M.R., 2013. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering 2013 10:6 doi:10.1186/1735-2746-10-6.

Kaur S., 2000. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. World Journal of Microbiology and Biotechnology 6: 781-793.

Keshavarzi M., Salimi H., and Mirzanamadi F., 2005. Biochemical and Physical Requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* For High Biomass Yield Production. Journal of Agricultural Science and Technology 7: 41-47.

Kosir J., 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for measurement of the bioinsecticide delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis* fermentations, M.E.Sc Thesis, the University of Western Ontario, London, Canada.

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.

Krishnan Kanakeswary, Er An Ker Jeremy, Mohammed Shar Mariam and Devi Nadarajah Vishna, 2010. Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. Journal of Biomedical Science 17:86 doi:10.1186/1423-0127-17-86.

Kristoff G., Guerrero N.R.V., Cochón A.C., 2010. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, Biomphalaria glabrata and Lumbriculus variegatus, by the carbamate pesticide carbaryl. Aquatic Toxicology 96(2): 115–123.

Kubota Y., Ohgushi A., Uemori A., Mizuki E., Ohba M., 2006. Identification of two haemolysins in larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the bean bug, Riptortus clavatus. Applied Entomology 130 (3): 183-189.

Kuppusamy M. and Balaraman K., 1990. Extra cellular hydrolytic enzyme secretion in *Bacillus thuringiensis* H14 *& B. sphaericus* and their significance in media design. Indian Journal of Medical Research 91:149-50.

Kurt A., Ozkan M., Sezen K., Demirbag Z. and Ozcengiz, G., 2005. Cry3Aa11: A new Cry3Aa δ-endotoxin from a local isolate of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology Letters 27: 1117–1121.

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

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.

Lecadet M.M., 1970. *Bacillus thuringiensis* toxins-the proteinaceous crystal. Microbial toxins 3: 437-471.

Liu M., Cai Q.X., Liu H.Z., Zhang B.H., Yan J.P. and Yuan Z.M., 2002. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. Journal of Applied Microbiology 93: 374–379.

Liu Y., Tabashnik B.E., Moar W.J., and Smith R.A., 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamond back moths (Plutella xylostella). Applied and Environmental Microbiology 64:1385-1389.

Liu CM, Tzeng YM., 2001. Quantitative Analysis of Parasporal Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* by Capillary Electrophoresis. Journal of Food and Drug Analysis 9 (2): 79-83.

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

Lisansky S.G., Quinlan R.J., Tassoni G., 1993. The *Bacilus thuringiensis* Production Handbook, CPL Press, Newbury, UK, 124 pages.

Lopez-Meza J.E., Ibarra J.E., 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 62: 1306-1310.

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

Luthy P., Cordier J.L., Fischer H.M., 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application, in Microbial and Viral Pesticides, E.Kurstak, Ed., Marcel Dekker Inc, New York, NY, pp. 35-74.

Maeda M., Mizuki E., Nakamura Y., Hatano T., Ohba M., 2000. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. Current Microbiology 40: 413-422.

Maldonado-Blanco M.G., Solis-Romero G, Galan-Wong L.J., 2003. The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin active against Aedes aegypti larvae. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19 (17): 671–674.

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.

Margaritis A., Kosir J., Bokkel D., 1993. Development of a new ELISA Method to measure the concentration of delta-Endotoxin produced by *Bacillus thuringienis*. In Ref. Proceedings, International Workshop on Biopesticides, NRCCairo, Egypt, IDRC/Agriculture Canada, Cairo, Egypt, pp. 73-92.

Martin P.A.W. and Travers R.S., 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Applied and environmental Microbiology 55: 2437-2442.

Mazmira M.M., Ramlah S.A.A., Rosfarizan M., Ling T.C. and Ariff A.B., 2012. Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ-endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. African Journal of Biotechnology 11(40): 9654-9663.

Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarret P., and Burges H.D., 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. Applied and Environmental Microbiology 58: 1344-1350.

Mignone C.F., and Avignone-Rossa C., 1996. Analysis of Glucose Carbon Fluxes in Continuous Cultures of *Bacillus thuringiensis*. Applied Microbiology and Biotechnology 46: 78-84.

Mizuki E., Maeda M., Tanaka R., Lee D.W., Hara M., Akao T., Yamashita S., Kim H.S., Ichimatsu T., and Ohba M., 2001. Bacillus thuringiensis: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant. Curr. Microbiol. 42: 422-425.

Mizuki E., Ohba M., Akao T., Yamashita S., Saitoh H. and Park Y.S., 1999. Unique activity associated with noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. Journal of Applied Microbiology 86: 477-486.

Mohammedi S., Bala Subramanian S., Yan S., Tyagi R.D., and Valéro J.R.., 2006. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process Biochemistry 41: 829-835.

Molina M.A., Prata A.M.R., Pessanha L.G., Silveira M.M., 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 1397–1404.

Monro R.E., 1961, Protein Turnover and the Formation of Protein Inclusions During Sporulation of *Bacillus thuringiensis*. Biochemistry Journal 81: 225-232.

Montiel M.L.T., Tyagi R.D., Valero J.R., 2001. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Research 35: 3807-3816.

Morgan S., and Ridgway M., 2000. Polarization properties of light backscattered from a two layer scattering medium. Optics Express 7: 395–402.

Morris O.N, Converse V., Kanagaratnam P., Davies J.S., 1996. Effect of cultural conditions on spore–crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD133). Journal of Invertebrate Pathology 67: 129-136.

Murray E.D. and Spencer E.Y. 1966. A simplified purification technique for parasporal inclusions from certain varieties of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 8: 418-420.

Murty M.G., Srinivas G., Bora R.S., Sekar V., 1994. A simple method for separation of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* using carboxymethyl cellulose column chromatography. Journal of microbiological Methods 19 (2): 103-110.

Naimov S., Boncheva R., Karlova R., Dukianjiev S., Minkov I., and de Maagd Ruud A., 2008. Solubilization, activation, and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Serovar *thompsoni* HD542 crystal proteins. Applied and Environmental Microbiology 74(23): 7145–7151.

Nassif R., Pellen F., Magne C., Le Jeune B., Le Brun G., and Abboud M., 2012. Scattering through fruits during ripening: laser speckle technique correlated to biochemical and fluorescence measurements. Optics Express 20 (21): 23887-97.

Navarro A.K., Farrera R.R., Lopez R., Perez-Guevara F., 2006. Relationship between poly-b-hydroxybutyrate production and δ-endotoxin for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biotechnology Letters 28: 641–644.

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

Nickenon K.W., Julian G., and Bulla L.E., 1974. Physiology of spore forming bacteria associated with Insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Applied Microbiology 28 (1): 129-132.

Nickerson, K.W. and Bulla L.A., 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. Applied Microbiology 28: 124-128.

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

Ozbek B., Gayik S., 2001. The studies on the oxygen mass transfer coefftcient in a bioreactor. Process Biochemistry 36:729-741.

Ozkan M., Dilek F.B., Yetis U., Ozcengiz G., 2003. Nutritional and cultural parameters Influencing antidipteran delta-endotoxin production. Research in Microbiology l54: 49-53.

Pal A., Prabhu A., Kumar A.A., Rajgopal B., Dadhe K., Ponamma V., and Shivakumar S., 2009. Optimization of process parameters for maximum Poly (-β-)hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM12077. Polish Journal of Microbiology 58: 149-154.

Palmarola-Adrados B., Borska P.C., Galbe M., Zacch G., 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. Bioresource Technology 96: 843–850.

Parakulsuksatid P., 2000. Utilization of microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot scale baker's yeast fermentation unit, Master Science, Faculty of the Verginia, USA.

Paramatha R.B., 2000. Hyper-production of insecticidal crystal protein (delta endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is not related to sporulation specific biochemical functions. Current Microbiology 41: 187-191.

Pearson D., Ward O.P., 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnology Letters 10 (7): 451-456.

Pendleton I.R., and Morrison R.B., 1966. Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. Nature (London) 212: 728-729.

Perani M., Bishop A., 2000. Effects of media composition on ô-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. Microbios. 101: 47 -66.

Pfannenstiel M.A., Couche G., Muthukumar G., and Nickerson K.W., 1985. Stability of the Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: Amino acid modification and denaturants. Applied and Environmental Microbiology 50 (5): 1196-1199.

Piggot P.J., Bylund J.E., Higgins M.L., 1994. Morphogenesis and gene expression during sporulation. In: Piggot P.J., Moran C.P. and Youngman P., eds. Regulation of Bacterial Differentiation. Washington, DC: American Society for Microbiology: 113–137.

Poopathi S. and Archana B., 2012. A novel cost-effective medium for the production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for mosquito control. Tropical Biomedicine 29(1): 81–91.

Poopathi S., Abidha S., 2009. A medium for the production of biopesticides (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) in mosquito control. Journal of Economical Entomology 102 (4): 1423-1430.

Pozsgay, M.. Fast, R., Kaplan, H., Carey, P.R., 1987. The Effect of Sunlight on the Protein crystals from *Bacilluss thuringienris* var. *kurstaki* HDl and NRDIZ: A Raman Spectroscopic Study. Journal of lnvertebrate Pathologv 50: 246-253-

Prabakaran G., Hoti S.L., Manonmani A.M., Balaraman K., 2008. Coconut water as a cheap source for the production of δ endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* - a mosquito control agent. Acta Tropica 105: 35–38.

Prabakaran G. and Balaraman K., 2006. Development of a cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Biological Control 36: 288–292.

Putzai. M.. Fast, P., Gringorten. L.. Kaplan, H.. Lessard, T., 1991. The mechanism of sunlight mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochemical Journal 273: 43-47.

Rao C.D., and Shethna Y.I., 1980. A simple technique for purification of the parasporal crystal (δ-endotoxm) of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. Journal of the Indian Institute of Science 62: 1-11.

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.

Rizzi M., Klein, C., Schulze C., Bui-Tanh N. and Dellweg H., 1989. Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling O_2 limited growth and fermentation of yeast *Pichia Stipitis* with xylose as carbon source. Biotechnology and Bioengineering 34, 509-514.

Rodriguez-Monroy M., de la Torre M., 1996. Effect of the Dilution Rate on the Biomass Yield of *Bacillus thuringiensis* and Determination of its Rate Coefficients under Steady-state Conditions. Applied Microbiology and Biotechnology 546-550.

Rolle R.L., 2013. An extensive characterization study of different *Bacillus thuringiensis* strains collected from the Nashville Tennessee area. African Journal of Biotechnology 12 (30): 4827-4835.

Rowe G.E., Margaritis A., Wei N., 2003. Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1. Biotechnology Progress 19(5):1439–1443.

Rowe G.E., Margaritis A., 1994. Endocellular fatty acid composition during batch growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. Journal of Fermentation Bioengineering 77: 503-507.

Rutberg B., and Hoch J.A., 1970. Citric acid cycle: gene-enzyme relationships in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 104:826-833.

Sachdeva V., Tyagi R. D. and Valéro J. R., 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. Water Science and Technology 42(9): 211-216.

Sachidanandham, R, Jenny, K, Fiechter, A, Jayaraman, K, 1997. Stabilization and increased production of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* in steady-and transient-state continuous cultures., Applied Microbiology and Biotechnology 47: 12-17.

Sakharova Z.V., Ignatenko W.N., Shchul'ts F., Khovrychev M.P., and Rabotnova I.L., 1985. Kinetics of the growth and development of *Bacillus thuringiensis* during batch culturing. Mikrobiologiya, (Engl. transi.) 54:483-488.

Salama H.S., Foda M.S., Dulmage H.T., El-Sharaby, 1983. Novel fermentation media for production of ô-endotoxin fiom *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology 41: 8-19.

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

Sarrafzadeh M.H., Guiraud J.P, Lagneau C. Gaven B., Carron A., Navarro J.M., 2005. Growth, sporulation, delta -endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14. CurrentMicrobiology 51(2): 75-81.

Sarrafzadeh M.H., Navarro J.M., 2006.The effect of oxygen on the sporulation, δ-endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22:305–310.

Schaeffer P., Millet J. and Aubert J.P., 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. Proceedings of National Academy of Sciences USA 54(3): 704–711.

Scherrer P., Luthy P., and Trumpi P., 1973. Production of δ-Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a Function of Glucose Concentrations. Applied Microbiology, 25: 644-646.

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.

Schnepf, H. E. 1995. *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. Current Opinion in Biotechnology 6:305-312.

Schnepf H.E., Wong H.C., Whiteley H.R., 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis*: deduced from the DNA base sequence. Journal of Biological Chemistry 260: 6264–6272.

Sekhon A, Dahia N, Tewari RP, Hoondal GS (2004). Production of lipase from *Bacillus megaterium* AKG-1 using wheat bran in soild substrate fermentation. Indian Journal of Microbiology 44: 219-220.

Shah M.D, Iqbal M., 2010. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. Food and Chemical Toxicology 48(12):3345–3353.

Sharpe E. S., Nickerson K.W., Bulla L.A., and Aronson J.N., 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. Applied Microbiology 30:1052-1053.

Sharpe E.S., Herman A.I.,Toolan S.C., 1978. Separation of Spores and Parasporal Crystals of *Bacillus thuringiensis* by Flotation. Journal of Invertebrate Pathology 34: 315-316.

Shenoy H.Archana and Prakash Jamuna (2002). Wheat bran (Tritzcum Aestwum): composition, functionality and incorporation in unleaved bread. Journal of Food Quality 25:197-21 1.

Shewry P., D'Ovidio R., Lafiandra D., Jenkins J., Mills E.N. and Békés F., 2009. In. Khan, K. and Shewry P. (Eds.) Wheat Chemistry and Technology. 4th edition. St. Paul, Minnesota, USA: AACC International, Inc.

Shojaaddini M., Moharramipour S., Khodabandeh M., and Talebi A., 2010. Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. Journal of Plant Protection Research 50 (1): 9–14.

Sikdar D.P., Majumdar M.K. and Makumdar S.K., 1991. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp.*israelensis*. Biotechnology Letters, Dordrecht 13: 511-514.

Silveira M.M. and Molina M.A.B., 2005. Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. Brazilian Journal of Chemical Engineering 22 (4): 495-500.

Soberón M., Gill S.S., Bravo A., 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? Cellular and Molecular Life Sciences 66(8):1337–1349

Soccol C. R., Pollom T.E.V., Fendrich R.C., Prochmann F.A., Mohan R., Blaskowski M.M. M., Melo A.L., de Carvalho C.J.B., and Thomaz-Soccol V. Development of a Low Cost Bioprocess for Endotoxin Production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Intended for Biological Control of Aedes aegypti. Brazilian Archives of Biology and Technology 52: 121-130.

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.

Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J., 1995. Principles of Fermentation Technology. Second edition. New York: Elsevier Science Ltd.

Stevens M.M., Burdett A.S., Mudford E.M., Helliwell S., Doran G., 2011. The acute toxicity of fipronil to two non-target invertebrates associated with mosquito breeding sites in Australia. Acta Tropica 117(2): 125–130.

Stragier P, Losick R, 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. Annual Review of Genetics 30: 297–341.

Sundaram Kanth M.S, Sundaram Alam, Gee Shirley J, Harrison Robert O., Hammock Bruce D.,1995. Enzyme-linked immunosorbent assay quantification of *Bacillus thuringiensis* var.*kurstaki* crystalline protein in some commercial formulations. Pesticide formulations and application systems vol 14.

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

Theunis, W., Aguda, R.M., Cruz, W.T., Decock, C., Peferoen, M., Lambert, B., Bottrell, D.G., Gould, F.L., Litsinger, J.A., Cohen, M.B., 1998. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, δ-endotoxin diversity and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). Bulletin of Entomological Research 88: 335-342.

Tsuchiya, S., Kasaishi, Y., Harada, H., Ichimatsu, T., Saitoh, H., Mizuki, E. and Ohbac M., 2002. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, Lasioderma serricorne (Coleoptera: Anobiidae). Journal of Invertebrate Pathology 81: 122–126.

Valdez M, Sánchez J, Lina L, Güereca L and Bravo A., 2001. Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ-endotoxin. Biochimica et Biophysica Acta 1546: 122–131.

Valicente F.H., Edgard A.T.P., Maria J.V.V., Newton P.C., Andréia A.C., Cláudia T.G., Ubiraci G.L., 2010 Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cry1* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Biological Control 53:360–366.

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.

Vidyarthi A.S. Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y., 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water Research 36 : 4850–4860.

Vora D, Shethna Y I., 1999. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in soil seed meal extract media containing cysteine.World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 747-749.

Vu K.D., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Valéro J.R., 2012. Mathematical relationships between spore concentrations, delta-endotoxin levels, and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations produced in different fermentation media. Bioresources Technology 123: 303-311.

Wakisaka Y., Masaki E., Nishimoto Y., 1982. Formation of crystalline ô-endotoxin or poly-B-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 43: 1473 -l480.

Widner WR, Whiteley HR., 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. Journal of Bacteriology 171:965–974.

Yamamoto Takashi, 1983. Identification of Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis* by High Performance Liquid Chromatography. Journal of General Microbiology 129: 2595-2603.

Yang X..M., Wang S.S., 2000. Phase-specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology and Applied Biochemistry 3l: 7 I-7 6.

Yang Xiao-Ming and Wang Shaw S., 1998. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. Biotechnology and Applied Biochemistry 28: 95–98. MINIREVIEW.

Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., 2006b. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown is wastewater sludge. Process biochemistry 41: 794-800.

Yezza A, Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y., 2005. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides by batch and fed-batch culture using wastewater sludge as a raw material. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80:502–510.

Yousten, A. A., and Rogoff, M.H., 1969. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in Relation to spore and crystaI Formation, Journal of Bacteriology 100 (3): 1229- 1236.
Zhu Sheng Zhu, Brookes Allan, Carlson Ken and Filner Philip, 1989. Separation of Protein Crystals from Spores of *Bacillus thuringiensis* by Ludox Gradient Centrifugation. Applied and Environmental Microbiology 55 (5) : 1279-1281.

Zouari N., Achour O., Jaoua S., 2002. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal medium in 2 and 20 dm3 fermentors. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 77: 877 -882.

Zouari, N. and Jaoua, S., 1999b. The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 23, 497–502.

Zouari N, Dhouib A, Ellouz R, Jaoua S., 1998. Nutritional requirements of a *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* strain and use of gruel hydrolysate for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. Appl Biochem Biotechnol. 1998, 69:41–52.

ANNEXES

(PUBLICATIONS)



European Journal of Biotechnology and Bioscience

Available online at www.biotechjournal.info

E J B B

European Journal of Biotechnology and Bioscience

ISSN 2321-9122
EJBB 2014; 1 (6): 10-16
Received: 29-05-2014
Accepted: 11-06-2014

Jihane Rahbani Mounsef
Université de Toulouse ; INPT, UPS; Laboratoire de Génie Chimique; 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France.

CNRS ; Laboratoire de Génie Chimique ; F-31030 Toulouse, France

Université Saint Joseph de Beyrouth B.P. 11-514 Riad El Solh Beyrouth 1107 2050 Liban

Dominique Salameh
Université Saint Joseph de Beyrouth B.P. 11-514 Riad El Solh Beyrouth 1107 2050 Liban

Mireille kallassy Awad
Université Saint Joseph de Beyrouth B.P. 11-514 Riad El Solh Beyrouth 1107 2050 Liban

Cedric Brandam
Université de Toulouse ; INPT, UPS; Laboratoire de Génie Chimique; 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France.

CNRS ; Laboratoire de Génie Chimique ; F-31030 Toulouse, France

Roger Lteif
Université Saint Joseph de Beyrouth B.P. 11-514 Riad El Solh Beyrouth 1107 2050 Liban

Correspondence:
Jihane Rahbani Mounsef
Université de Toulouse ; INPT, UPS; Laboratoire de Génie Chimique; 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France.

CNRS ; Laboratoire de Génie Chimique ; F-31030 Toulouse, France

Université Saint Joseph de Beyrouth B.P. 11-514 Riad El Solh Beyrouth 1107 2050 Liban

Evaluation of a cereal milling by-product for the low cost production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* in submerged fermentation

Jihane Rahbani Mounsef, Dominique Salameh, Mireille kallassy Awad, Cedric Brandam, Roger Lteif

ABSTRACT
With the idea of finding a cheap medium for the mass production of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a cereal milling by product (CMB) was evaluated and was shown efficient to be used as a source of carbohydrates, proteins and minerals for the production of δ-endotoxins in submerged fermentation of a new strain of *Bacillus thuringiensis kurstaki* "Lip". The results obtained in 1000 mL shake flasks experiments showed that the toxin proteins concentration produced in the 6% (w/v) CMB medium was 2.4 fold and 1.54 fold greater than the values reached in the Anderson medium and in a standard semi synthetic medium respectively, while there was no significant difference between the cell, spore and crystal counts or between the protein profiles of the "Lip" spore/crystal complex obtained in the three mediums. Considering all three factors, relative yield, productivity and cost, the use of the CMB mono-component medium was proved much more economical for an industrial production of "Lip" than the references mediums. Moreover, the suitability of the medium for large scale production of *Bt* based bio insecticide was evidenced in a 5 L lab bioreactor.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Cereal milling byproduct, δ-endotoxins, Industrial production, Productivity

1. Introduction

Bacillus thuringiensis (*Bt*) based bio insecticides are the most broadly used microbial biological agents in the control of harmful insects [1, 2]. They represent natural, biodegradable and safe pest control means. *Bacillus thuringiensis* is a ubiquitous, gram positive, spore forming bacterium. Its insecticidal activity resides in the production of a proteinaceous parasporal crystal called δ-endotoxin, which is formed during sporulation. Despite the increasing need for environment friendly, chemical residue free and safe control agents such as *Bt* based biopesticides, the biopesticides market was valued in 2011 at $1.3 billion for $37.5 billion for the global pesticide market [3]. The use of bio-insecticides remains very limited compared to chemical insecticides for two main reasons: the production cost and the low stability of the product over time forcing applications more frequent. *Bacillus thuringiensis* requires, for its growth, sporulation and crystal synthesis, a carbon and energy source like glucose, nitrogen sources such as peptone or yeast extract and ammonium sulfate, and mineral salts [4, 5]. Metal ions such as Ca^{2+}, Mg^{2+} and Mn^{2+} were found essential for *Bt* growth and potassium ions were showed necessary for the production of *Bt* crystals [6, 7]. In lab experiments, synthetic mediums with all these elements are generally used. However, at industrial scale, the synthetic and expensive substrates are usually replaced by agro-industrial by-products to reduce the cost of mass production of *Bt*. This approach allows also to process waste into valuable products and help dispose of these byproducts in an ecologically sound manner. Different agro-industrial residues and byproducts were used in *Bacillus thuringiensis* production. Soybean meal, corn steep liquor, groundnut seed meal extract, fish meal, gruel fish, cheese whey, *Bombyx mori* pupae, powders of edible leguminous seeds and fodder yeast were used as sources of proteins [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15] but carbohydrates (glucose, starch or molasses) and/or mineral sources were added. Cereal milling by products are available in many countries at low prices. They are used as sources of proteins, minerals, energy, carbohydrates, fat and fibers for commercial livestock feed [16].

In this work, we studied the efficiency of using a cereal milling byproduct (CMB) as a complete substrate for *Bt* production which could substantially reduce the culture medium cost. The cereal milling by-product (CMB) mono-component medium was investigated and compared to synthetic mediums in terms of δ-endotoxin yield and productivity. Production of the bio-insecticide in lab-bioreactor in controlled conditions was equally performed to give basic elements for extrapolation in industrial conditions.

2. Materials and Methods:

2.1 Microorganism

A bacterial strain *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki*, registered as Lep^{MK} 101, designated by 'Lip', isolated from the Lebanese soil and genetically characterized [17], was used. The strain was provided by the biotechnology laboratory of Saint Joseph University, Campus of Science and Technology, Lebanon.

2.2 Media composition

A "CMB" based medium

It contained a cereal milling byproduct (particles size < 200 mesh) as a mono component medium in distilled water. In the results section we indicate the ratio of the CMB (w/v) used in each experiment. The CMB was provided by *arcenciel* NGO; a sustainable agricultural lead developer in Lebanon.
Two mediums of literature were used as references:

2.2.1 A complete rich medium proposed by Anderson [18]

The medium contained: Glucose 9.77 $g.L^{-1}$; Yeast extract 4.62 $g.L^{-1}$; Bacto peptone 4.62 $g.L^{-1}$; $(NH_4)_2SO_4$ 1 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4 3.4 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4 4.15 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H2O$ 0.3 $g.L^{-1}$; $CaCl_2$. 2 H_2O 0.106 $g.L^{-1}$; Fe-Citrate 0.075 $g.L^{-1}$; $ZnSO4.7H_2O$ 0.0075 $g.L^{-1}$; $CuSO_4$ 0.0045 $g.L^{-1}$; $MnSO_4.7H_2O$ 0.05 $g.L^{-1}$.

2.2.2 A semi synthetic medium [19]

The medium contained: soybean flour 15.0 $g.L^{-1}$; glucose 5.0 $g.L^{-1}$; starch 5.0 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4 1.0 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4 1.0 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$ 0.02 $g.L^{-1}$; $ZnSO_4.7H_2O$ 0.02 $g.L^{-1}$; $CaCO_3$ 1.0 $g.L^{-1}$.

2.3 Preparation of seed culture

The first seed culture was prepared by inoculation of a 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL Luria Bertani broth by a loopful of bacteria from the slant. The flask was incubated on a rotary shaker at 30 °C and 340 rpm for 8 h. At this time 2% (v/v) of the first passage seed was used to inoculate a 500 mL flask containing 98 mL of tryptose phosphate broth, which was incubated at the same conditions as the first passage seed for 12 h.

2.4 Fermentation procedure

2.4.1 Shake flasks experiments

2% (v/v) of the second-passage seed was used to inoculate 1000 ml flasks containing 50 mL of the Anderson medium, semi synthetic medium or CMB based medium. These flasks were incubated for 48 h at 30 °C in a rotary shaker set at 340 rpm.

2.4.2 Bioreactor experiments

The bioreactor used in this study was a 5 L Sartorius BIOSTAT B fermenter. The volume of the culture medium was 2.9 L and the bioreactor was inoculated by 100 mL of a second stage seed. Foaming was controlled by adding a natural foaming agent. The air flow was adjusted to 0.033 L/L of medium/min and the stirrer speed to 500 rpm. The temperature was set at 30 °C and the pH was monitored but not controlled.

2.5 Analytical methods

2.5.1Cell and crystal count

Cell and crystal counts were microscopically determined with a Petroff Hausser chamber (cell depth: 0.02 mm, ruling pattern: Improved Neubauer, 1/400 square mm) using high power, oil immersion objective of an Olympus microscope. Serial dilutions with thorough sonication were used to avoid cells or spores crystals clumping. The result is expressed in number of cells or number of crystals per ml.

2.5.2 Viable spores count

Samples taken from each culture were heat treated at 80 °C for 15 min, serially diluted with physiological solution (0.9% NaCl), and plated onto T3 plates. Plates were then incubated at 30 °C for 24 h and the developed *B. thuringiensis* colonies were counted and expressed in CFU (colony forming units) per mL. The samples were plated in duplicate.

2.5.3 Estimation of toxin proteins

A 1 mL sample of lysed cell suspension was centrifuged at 13000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the pellet was washed two times with NaCl 0.14 M - 0.01% Triton X-100 solution and four times with cold water. The crystal protein in the pellet was dissolved with 0.05 N NaOH for three hours with stirring. The suspension was centrifuged at 13000 rpm for 5 min and the pellet, containing spores and cell debris was discarded. The concentration of the crystal protein in the supernatant was determined by the Bradford method [20] using the bovine serum albumin as a standard. Some of the supernatant was kept for SDS-PAGE analysis.

2.6 SDS-PAGE

Samples of the supernatants, obtained after alkaline dissolution of the crystal protein from the different culture mediums, were mixed to the Laemmli buffer (18.7% (v/v) Tris HCl 1 M, 30% (v/v) SDS 2 $g.L^{-1}$, 30% (v/v) glycerol, 15% (v/v) ß-mercaptoethanol, 5% (v/v) bromophenol blue) at a ratio of 5:1 and then boiled for 5 min and chilled in ice bath. Toxin proteins were separated by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel (SDS-PAGE) [21]. The proteins profiles were visualized by staining in 0.1% Coomassie blue/ 7.5% (v/v) ethanol/5% glacial acetic acid and then destaining in 7.5% ethanol/ 5% acetic acid.

2.7 Sugars determination

2.7.1Carbohydrates extraction and hydrolysis

In order to extract and hydrolyze the CMB carbohydrates into simple sugars 1.5 ml of 72% H_2SO_4 was added to 0.122 g of CMB or to 5 mL of the culture medium and incubated for 60 Minutes at 30 °C. After dilution with distilled water (42 ml), samples were autoclaved at 120 °C for 20 minutes.

2.7.2 HPLC analysis

The filtered liquid obtained after acid hydrolysis was analyzed on an HPLC column (Bio-Rad Aminex HPX-87H). For HPLC analysis, 20 µl samples were injected at a temperature of 63 °C and flow rate of 0.6 ml/min (eluent 4 mM H_2SO_4). Glucose, xylose and arabinose were detected by a refractive index (RI)

detector. The calibration concentration was in the range between 0.1 to 0.8 $g.L^{-1}$ for each sugar. The linearity r2 for all sugars was greater than 0.99.

2.8 Statistical analysis of results

All the results related to determination of cells and crystals counts, CFU counts and toxin proteins concentration were the average of two replicates of two separate experiments for each cultural condition. Mean values were compared by a student's t test at the 0.05 level.

3. Results and discussions

3.1 Formulation of a CMB based medium

The Anderson medium was used in literature for the production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* [18, 22, 23]. It has all the nutrients required for *Bt* growth and sporulation and for δ-endotoxin production. A series of experiments was carried out in order to study the influence of substituting each of nutrients sources in this medium by 3% (w/v) cereal milling byproduct (CMB), on the toxin protein concentration obtained at the end of fermentation typified by 90% free spores (table 1).

When the carbon and nitrogen sources in the Anderson medium were replaced by CMB 3% (w/v), the toxin proteins concentration achieved, increased from 1 to 1.3 $g.L^{-1}$ (medium 2 compared to medium 1). No significant difference was observed between the mean values of the toxin proteins concentrations obtained in mediums 3, 4, 5 and 6 compared to that obtained in medium 2 by a student's t test at the 0.05 level. These results show that the CMB at a ratio of 3% (w/v) can replace the sources of carbohydrates, proteins, minerals and oligoelements of the Anderson medium and the toxin proteins production is improved.

Table 1: Effect of substituting the nutrients of Anderson medium by CMB 3% (w/v) on toxin proteins production

Culture medium	Toxin proteins concentration ($g.L^{-1}$)
Medium 1 : Anderson, 1990	1 ± 0.04
Medium 2 : Anderson medium where glucose, yeast extract, bactopeptone and $(NH4)_2SO_4$ (carbohydrate and nitrogen sources) were substituted by CMB 3% (w/v)	1.3 ± 0.04
Medium 3 : Medium 2 without minerals: ($MgSO_4.7H2O$; $ZnSO_4$. $7H_2O$ $CuSO_4$; $MnSO_4.7H_2O$)	1.27 ± 0.02
Medium 4: Medium 3 without iron, citrate and calcium ($CaCl_2$. $2\ H_2O$; Fe-Citrate)	1.22 ± 0.04
Medium 5: Medium 3 without phosphate and potassium (KH_2PO_4; K_2HPO_4)	1.26 ± 0.02
Medium 6: Only CMB 3% (w/v)	1.25 ± 0.03

3.2 Determination of the optimal amount of CMB

With the idea of enhancing the effectiveness of the CMB medium, different ratios of the CMB were tested in shake flasks experiments. As it is shown in figure (1 a), a proportional increase of the protein concentration with the CMB ratio in the culture medium was observed from 1 to 6% (w/v) CMB. The crystal count, determined by microscopic observation and the toxin proteins concentration were perfectly correlated in this range of CMB w/v ratio. A further increase in the CMB ratio led to a proportional increase in the crystal count but not in the toxin proteins concentration (figure 1 b). The toxin yield, defined as the ratio between the toxin proteins concentration achieved (mg/L) and the CMB ratio in the culture medium, remained constant at 40 mg/g for 3, 4.5 and 6% CMB but decreased to 29.44 mg/g when using 9% CMB (figure 1 a).

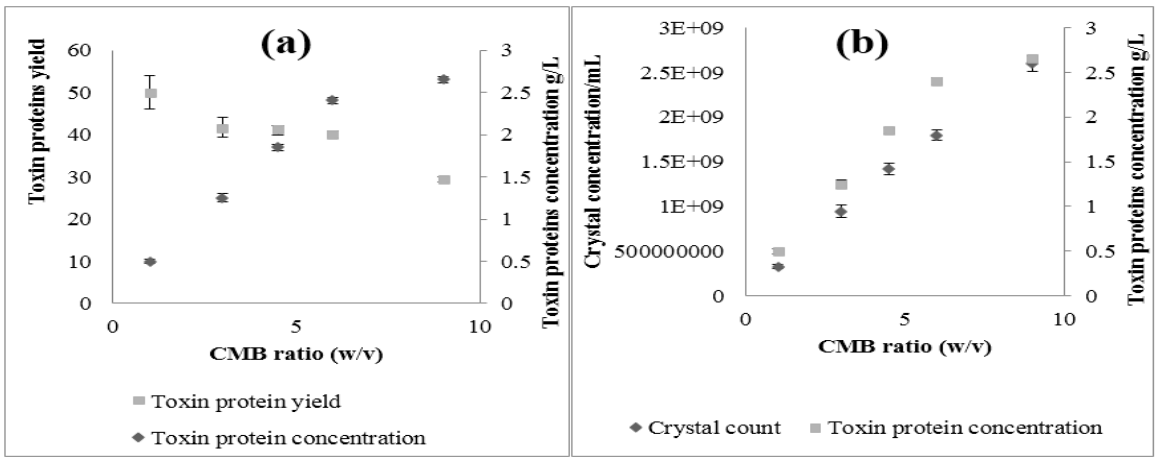


Fig 1: (a) Variation of toxin proteins concentration and toxin proteins yield with CMB ratio; (b) Variation of crystal count and toxin proteins concentration with CMB ratio

3.3 Testing the CMB liquid extract for the production of "Lip"

In order to test the suitability of the CMB liquid extract for the "Lip" production, the 6% CMB medium was autoclaved for 20 minutes at 120 ºC then filtered through a strainer. The filtrate was used as a culture medium for the local strain of *Btk* in shake flasks experiments. The toxin concentration obtained was only 0.6 $g.L^{-1}$ for 2.4 $g.L^{-1}$ when the liquid-solid medium was used.

3.4 Analysis of the CMB sugars consumption by "Lip"

The CMB contains essential carbohydrates in the form of polymers: cellulose, hemicellulose and starch. Samples of solid CMB recuperated from the 6% CMB culture medium at the end of the fermentation and samples of fresh CMB were submitted to acid hydrolysis in order to extract and hydrolyze the carbohydrates. The obtained sugars were then analyzed by HPLC. In the same way the concentrations of sugars remaining in the liquid phase of the culture medium were determined. The mass of the recuperated CMB was found to be 1/3 of the initial mass. All these data were used to calculate the consumed mass of each of the sugars during *Bt* fermentation in the 50 mL CMB 6% culture medium in shake flasks experiments.

The obtained results, grouped in table 2, show that 0.972 g of glucose was consumed during the fermentation, which represents 66.48% of the mass of glucose in the fresh CMB. All xylose and arabinose measured in the fresh CMB were found at the end of fermentation in liquid or solid phase of the culture medium. Thus, the bacteria did not use the pentose (xylose and arabinose) that derive from the hydrolysis of the CMB hemicellulose.

Table 2: Sugar consumption during *Bt* fermentation in the 50 mL CMB 6% culture medium in shake flasks experiments.

	Fresh CMB (a)	**Used CMB (b)**	**Liquid medium at T_f (c)**	**Sugars consumed (a-(b+c))**
Glucose mass (g)	1.462 ± 0.047	0.221 ± 0.019	0.269 ± 0.025	0.972 ± 0.002
Xylose mass (g)	0.503 ± 0.035	0.295 ± 0.016	0.205 ± 0.019	0.003 ± 0.0008
Arabinose mass (g)	0.287 ± 0.029	0.178 ± 0.023	0.105 ± 0.005	0.004 ± 0.0002

T_f: the time corresponding to the end of the fermentation

3.5 Comparison of the CMB medium, to the Anderson medium and to the standard semi-synthetic medium for the production of "Lip"

Cultures in shake flasks were performed to compare the formulated mono component 6% CMB medium to the Anderson, medium and to the semi synthetic medium in terms of cells, spores and crystals counts. The obtained toxin proteins and the consumed glucose concentrations as well as the relative yield, the toxin proteins yield based on glucose, the productivity and the cost of preparing 1 L of each of the three mediums were also compared (table 3).

Table 3: Comparison of the CMB medium, to the Anderson medium and to the semi-synthetic medium for the production of "Lip"

	Anderson, 1990	**Standard semi synthetic**	**6% CMB medium**
Cells ($x10^9$ cell.mL^{-1})	2.05 [(a)]	1.98 [(a)]	1.96 [(a)]
Spores ($x10^9$ CFU.mL^{-1})	1.7 [(a)]	1.68 [(a)]	1.66 [(a)]
Crystals ($x10^9$crystal.mL^{-1})	1.79 [(a)]	1.78 [(a)]	1.80 [(a)]
Toxin proteins $g.L^{-1}$	1 [(a)]	1.56 [(b)]	2.4 [(c)]
Relative yield			
(mg of toxin proteins /10^9 CFU)	589.35 [(a)]	932.56 [(b)]	1447.42 [(c)]
Consumed glucose $g.L^{-1}$ mg of toxin proteins/g of	9.91 [(b)]	8.95 [(a)]	19.44 [(c)]
consumed glucose	100.77 [(a)]	174.46 [(c)]	123.50 [(b)]
mg of toxin proteins/L/h	30.27 [(a)]	43.35 [(b)]	50.03 [(c)]
Cost of 1 L of each medium	1.8 $	3.9 $	0.006 $

Values in the same row that are preceded by the same upper case letter are not significantly different

Similar growth was observed in the three mediums. Spores and crystals counts were also of the same order in the three mediums. Spore counts were slightly lower than the crystal counts. This could be attributed to the difference in the count methods used. The value of toxin proteins concentration obtained in the 6% (w/v) CMB medium was 2.4 fold and 1.54 fold greater than the values reached in the Anderson medium and in the semi synthetic medium respectively. The proteins profiles of the "Lip" spore/crystal complex obtained from different culture media, determined by gel electrophoresis,

were similar as it is shown in figure 2, 130 and 65 kDa bands were mainly obtained. The greatest yield of toxin proteins based on glucose was obtained in the semi synthetic medium. Higher productivity and higher relative yield were achieved in the CMB medium.

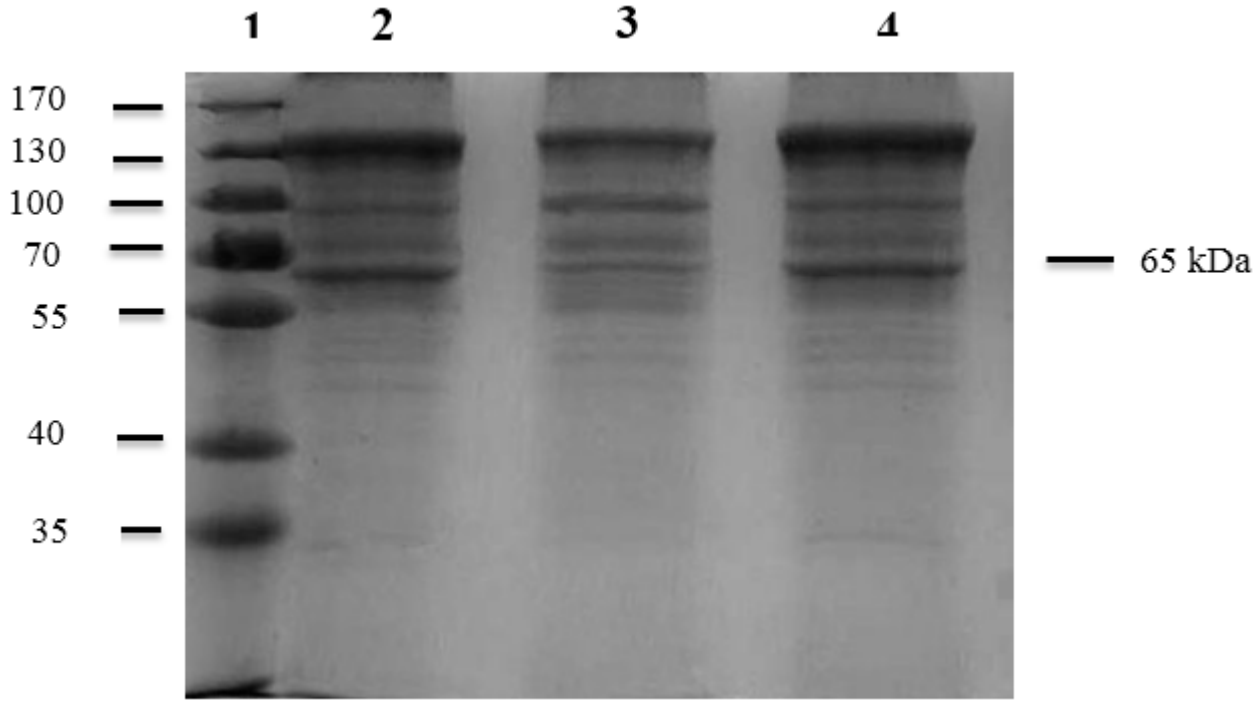


Fig 2: Comparative analysis by SDS PAGE of the protein profiles of the "Lip" spore/crystal complex obtained from different culture media: lane 1: protein marker; 2: standard semi synthetic medium; lane 3: Anderson, 1990 medium; lane 4: CMB medium

3.6 Bioreactor experiment

The strain of *Bacillus thuringiensis* was cultured in a 5 L bioreactor in the CMB 6% medium. The aeration conditions (flow rate 0.033L/L/min; stirrer speed 500 rpm) were selected so as to simulate the limited aeration conditions in the shake flasks experiments. A toxin proteins concentration of 2.19 g.L^{-1} was obtained in 48 hours. The cell and the free crystal count variation throughout the fermentation are presented in figure 3. A slight variation of pH is noticed during the fermentation. The initial pH value was 6.22. The minimum and maximum values reached by the pH during the fermentation were respectively 5.63 and 6.63.

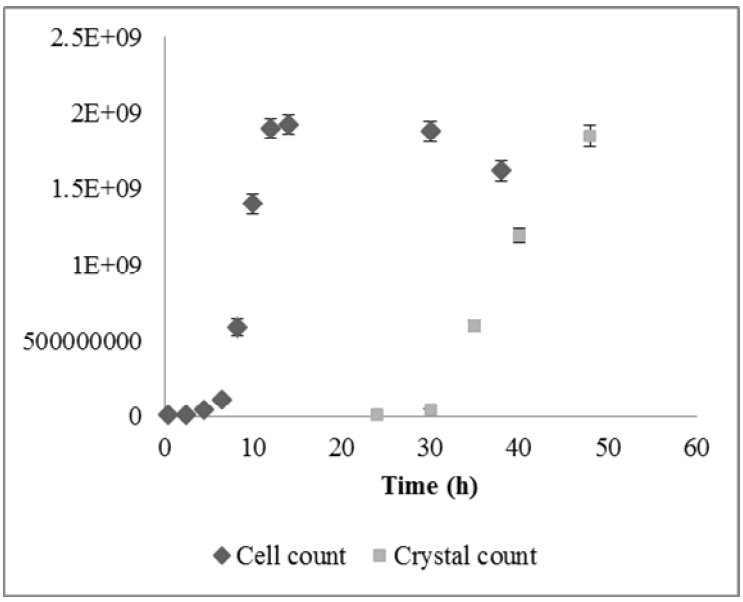


Fig 3: Cell and crystal count variation throughout the fermentation of "Lip" in a 5 L bioreactor

4. Discussions

In the present study the CMB was proved efficient to be used as source of carbon, nitrogen and minerals for the δ-endotoxin production in a submerged fermentation of a *Bacillus thuringinesis kurstaki*. The optimal CMB ratio (w/v) in the shake flasks cultures was 6%. Although we could predict the δ-endotoxin concentration achieved based on a crystal count in the CMB medium at different ratios of the substrate up to 6%, the prediction was not possible when the CMB ratio in the culture medium increased to 9%. The ratio, between the toxin proteins concentration and the crystals concentration, decreased revealing that the crystalline inclusions synthetized in the 9% CMB medium had a lower content of proteins. The low toxin yield obtained at 9% (w/v) CMB may be due to poorer oxygen availability in the thick culture medium or to a carbon catabolic repression of the δ-endotoxin synthesis as a result of growing cells at a high concentration of substrate. The suitability of the CMB 6% liquid extract for the production of "Lip" was tested. The low concentration of toxin produced suggests that the nutrients needed for the δ-endotoxin production by the bacteria, are not all extracted from the cereal milling byproduct and dissolved in the culture medium after autoclave. And that an enzymatic activity of the bacteria is needed to break down the present nutrient sources in the CMB to be available. Analysis of CMB sugars consumption by "Lip" showed that the bacteria used only the glucose. The amylase activity of *Bt* was proved by many authors [24, 25, 26]. Further study is needed to determine the capacity of the local strain of *Bt* for cellulose degradation and xylan hydrolysis. Therefore, we suggest that the consumed glucose derives mainly from the CMB starch hydrolysis by *Bt* amylases. The 6% (w/v) CMB medium was compared to the Anderson and to standard semi-synthetic mediums. It is reported that the size, shape and toxin content of the crystals can be affected by the composition of the medium [27, 28]. Different sources of proteins and carbohydrates at different concentrations were used in the three compared mediums which may explain the difference in the δ-endotoxin concentration in the synthetized crystals. Keshavarsil *et al.* [29] studied the relationship between δ-endotoxin production and the biochemical constituents, including carbohydrate and protein, of the culture media and found that the optimal media, in terms of protein composition, contained high levels of glutamic acid, the most abundant amino acid constituent of the crystal protein [30]. On the other hand, more glucose was consumed in the CMB medium, while the cell concentrations value obtained in the three mediums were similar. The nature and characteristics of the carbon/energy and nitrogen sources have a predominant role to play in the metabolism of microorganisms [31]. The glucose in the Anderson and semi synthetic mediums may be used by the local strain of *Bt* as energy source only and the carbon source could be the yeast extract in the Anderson medium and the soybean flour in the semi synthetic medium while the greater consumption of glucose in the CMB medium could be explained by the use of glucose (deriving from starch) as carbon and energy source. Another explanation could be that part of the glucose in the CMB medium was used for the formation of other metabolic products. Anyway, the toxin proteins yield based on consumed glucose, achieved in the CMB medium was not low in comparison with those obtained in the Anderson and the standard semi synthetic medium. Since the toxin proteins play the ultimate role in bio-control [32] high protein productivity is the goal for optimization of *Bt* fermentation. The present work showed that, in comparison with the references mediums, the 6% CMB medium gave the highest toxin proteins productivity. On the other hand, as the CMB is an agro industrial byproduct, the cost of the preparation of 1 L of the 6% CMB mono component medium is negligible, while the preparation of the Anderson medium and the semi-synthetic medium involves 1.8 $ and 3.9 $ respectively. Considering all three factors, relative yield, productivity and cost, the use of the CMB mono-component medium is much more economical for the large scale industrial production of the local strain of *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) "Lip" than the references mediums. Considerable savings could be achieved using this mono component medium where there is no need to add carbohydrates or salts and *Btk* could then be cheaply produced. In a 5 L laboratory bioreactor experiment, the CMB mono component medium was evidenced suitable for a large scale production of 'Lip' in submerged fermentation. The slight variation of pH throughout the fermentation reveals the balance between the carbon and nitrogen sources in the CMB medium and show that fermentations could be performed with no need to control the pH. Optimization of operating parameters (e.g. agitation, aeration) in bioreactor fermentation deserves further investigations to produce the toxin at industrial scale.

5. References

1. Lord JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology 2005; 89:19-29.
2. Brar SK, Tyagi VRD, Valéro JR. Recent advances in downstream processes and formulations of Bacillus thuringiensis based biopectides. Process Biochemestry 2006; 41:323-342.
3. Kumar S, Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. J Biofertil Biopestici, 2012, 3:4.
4. Dulmage HT. Production of the spore-d-endotoxin complex variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 1970; 16:385-389.
5. Nickerson KW, Bulla LA. Physiology of Spore-Forming Bacteria Associated With Insects, Minimal Nutrition Requirements for Growth, Sporulation and Parasporal Crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol 1974; 28:124-128.
6. Wakisaka Y, Masaki E, Nishimoto Y. Formation of Crystalline 8-Endotoxin or Poly-3-Hydroxybutyric Acid Granules by Asporogenous Mutants of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 1982; 43(6):1473-1480.
7. Foda MS, Salama HS, Selim M. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis.* Appl Microbiol Biotechnol 1985; 22:50-52.
8. Salama HS, F oda MS, Selim MH El –Sharaby A. Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Zentralblatt fur Mikrobiologie 1983; 83:553-563.
9. Arcas J, Yantorno O, Arraraas E, Ertola R. A new medium for growth and d-endotoxin production by

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*. Biotechnology Letters 1984; 6:495-500.
10. Mummigatti SG, Raghunathan AN. Influence of media composition on the production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* J Invertebr Pathol 1990; 55:147-151.
11. Zouari N, Dhouib A, Ellouz R, Jaoua S. Nutritional requirements of a *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* strain and use of gruel hydrolysate for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. Appl Biochem Biotechnol 1998; 69:41-52.
12. Vora D, Shethna YI. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in soil seed meal extract media containing cysteine World J Microb Biot 1999; 15:747-749.
13. Kumar A, Sra K, Sangodkar UMX, Sharma VP. Advances in the bio-control of mosquito vectors utilizing *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Proc Natl Acad Sci India LXX 2000, 1-20.
14. Dregval OA, Cherevach NV, Vinnikov AI. Influence of composition of the nutrient medium on growth and development of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. Mikrobiol Z 2002; 64:44-48.
15. Luna CL, Silva GR, Rios E.M. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant. Biotechnol Lett 2004; 26:143-145.
16. Klopfenstein TJ. By-products feeds: plant origin. In encyclopedia of animal science edited by Wilson G pond 2004, 84-186.
17. El Khoury M, Azzouz H, Chavanieu A, Abdelmalak N, Chopineau J, Awad kM. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new cry 1 Aa gene highly toxic to *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: *Pyralidae*) larvae. Archives of Microbiology 2014, DOI 10.1007/s00203-014-0981-3.
18. Anderson T. Effects of carbon: nitrogen ratio and oxygen on the growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal crystal protein, M.Sc Thesis, The University of Western Ontario, London, Canada, 1990.
19. Montiel MLT, Tyagi RD, Valero JR. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of Bacillus thuringiensis based biopesticides. Water Res. 2001; 35:3807-16.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72:248-254.
21. Lammeli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
22. Rivera D, Margariris A, De Lasa H. A sporulation kinetic model for batch growth of *Bacillus thuringiensis*. The Canadian Journal of Chemical Engineering 1999; 77:903-910.
23. Amin G, Alotaibi S, Narmen A. Youssef and Saleh W.D. Bioinsecticide production by the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Pattern of cell growth, toxin production and by-product synthesis). Journal of Basic and Applied Sciences 2008; 4(1):27-31.
24. Baumann I, Okamoto1 K, Unterman MB, Lynch JM, Baumann P. Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. Journal of Invertebrate Pathology 1984; 44:329-341.
25. Kuppusamy M, Balaraman K. Extra cellular hydrolytic enzyme secretion in *Bacillus thuringiensis* H14 & *B. sphaericus* and their significance in media design. Indian J Med Res 1990; 91:149-50.
26. Avignone-Rossa C, Mignone CF. *Bacillus thuringiensis* growth and Toxicity. Basic and Applied Considerations, Molecular Biotechnology 1995; 4 (1):55-71.
27. Scherrer P, Luethy P, Trumpi B. Production of d -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. Applied Microbiology 1973; 25:644-646.
28. Faloci MM, Yantorno OM, Marino HA, Arcas JA, Ertola RJ. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki d -endotoxin. World Journal of Microbiology and Biotechnology 1993; 6:32-38.
29. Keshavarzi1 M, Salimi H, Mirzanamadi F. Biochemical and Physical Requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* For High Biomass Yield Production J Agric Sci Technol 2005; 7:41-47.
30. Fast PG. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Microbial Control of Insects and Mites. (Eds.): Burges H. D. and Hussey H. Academic Press, London, New York, 1981, 223-244
31. Anderson RKI, Jayaraman K. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for Biopesticide Production Chem Biochem Eng Q 2003; 17(3):225-231.
32. Yang XM, Wang SS. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. Biotechnol Appl Biochem 1998; 28:95-98.

Journal of Microbiological Methods 107 (2014) 147–149

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals

Jihane Rahbani Mounsef [a,b,c,*], Dominique Salameh [c], Mireille kallassy Awad [c], Laure Chamy [c], Cedric Brandam [a,b], Roger Lteif [c]

[a] Université de Toulouse, INPT, UPS, Laboratoire de Génie Chimique, 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France
[b] CNRS, Laboratoire de Génie Chimique, F-31030 Toulouse, France
[c] Université Saint Joseph de Beyrouth, B.P. 11-514 Riad El Solh, Beyrouth 1107 2050, Liban

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 August 2014
Received in revised form 26 September 2014
Accepted 4 October 2014
Available online 12 October 2014

Keywords:
Bacillus thuringiensis
Crystals
Hexane
Purification
Spores

ABSTRACT

A simple new method, for separating *Bacillus thuringiensis* crystals from spores and cell debris, is described. The developed purification method uses hexane and low speed centrifugation and does not require any expensive material or reagents.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a Gram-positive spore forming bacterium that is able to produce parasporal crystals made of proteins (Cry) during sporulation. The parasporal crystals of studied subspecies showed a wide range of toxicity against different insect orders (Diptera, Lepidoptera and Coleoptera) and other invertebrates (Feitelson, 1993; Schnepf et al., 1998). Assays of Cry proteins and the studying of the crystal biochemistry require pure crystals as standards. Moreover, assays of expression of the Cry transferred genes in *Bt* transgenic plants are based on a specific antibody reaction and they require pure biologically active crystals as antigens. A variety of techniques have been developed for the extraction of *B. thuringiensis* crystals. However, proper separation of crystals from bacterial spores' remains hampered by the proximity of their respective buoyant densities 1.25 and 1.30 $g \cdot cm^{-3}$, and by the tendency of spores to clump and entrap crystals. Reported techniques of *Bt* crystal purification include isopycnic centrifugation in caesium chloride (CsCl) (Fast, 1972), gradient centrifugation in Sodium bromide (NaBr) (Ang and Nickerson, 1978), density gradient centrifugation in Renografin (Sharpe et al., 1975), and centrifugation through step gradients of Ludox (Zhu et al., 1989). The most commonly adopted strategy is that described by Thomas and Ellar (1983) in which *Bt* spores and crystals are separated using discontinuous sucrose density gradients (67 to 72 to 79% [wt/vol] sucrose) with ultracentrifugation (Ito et al., 2004; Rolle, 2013). Foam flotation based extraction strategies (Sharpe et al., 1978) and methods using carboxymethyl cellulose column chromatography (Murty et al., 1994) have also been described. All the above-mentioned methods are partially successful and are time demanding or they require expensive equipment and reagents. Crystals of different strains differ by their shape, size and surface antigens whereas *Bt* spores are commonly hydrophobic (Doyle et al., 1984). We have taken the advantage of the latter characteristic to develop a simple and rapid method for preparation of highly pure crystals from crystal-spore mixtures of *Bt*. Protein crystals were purified from two subspecies of *B. thuringiensis* registered as H_3^{MKA} and Lip^{MKA}, designated by "H_3" and "Lip", isolated from the Lebanese soil (El Khoury et al., 2014). Bacterial cultures were made in 3 L of Anderson medium (Anderson, 1990) at 30 °C in a 5 L bioreactor with a volumetric gas transfer coefficient (kla) of 13.32 h^{-1}. Cells were grown for about 48 h or until approximately complete autolysis had occurred releasing the spores and the toxin crystals in the culture medium. The developed purification procedure was first used in an attempt to isolate the spherical crystals of H_3. The liquid culture medium was centrifuged at 6000 rpm, 4 °C for 10 min and the obtained pellet was washed twice by suspending in 1 M NaCl containing 0.01% triton X-100. The pellet was then suspended in a 50 mL centrifuge tube with a saline solution, in order to enhance the hydrophobic interactions. An organic solvent

* Corresponding author at: Université de Toulouse, INPT, UPS, Laboratoire de Génie Chimique, 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France. Tel.: +33 00961 70 265 746.
E-mail addresses: gihane.rahbany@usj.edu.lb (J.R. Mounsef), dominique.salameh@usj.edu.lb (D. Salameh), mireille.kallassy@usj.edu.lb (M. Awad), laure.chamy@usj.edu.lb (L. Chamy), cedric.brandam@ensiacet.fr (C. Brandam), roger.lteif@usj.edu.lb (R. Lteif).

http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.003
0167-7012/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

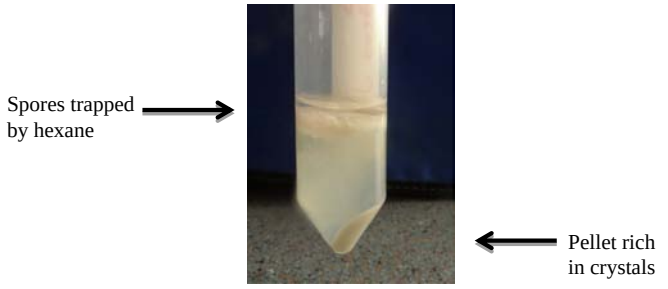


Fig. 1. Separation of spores, crystals and cell debris upon centrifugation (intended for color reproduction on the Web and in print).

(diethyl ether, dichloromethane or hexane) was added to a ratio less or equal to 10% (50, 75, or 100 μL/mL of aqueous suspension) to minimize the risk of altering crystals. The suspension was sonicated at 100 W for 10 min to dispel clumping then centrifuged at 6000 rpm for 10 min. The obtained pellet was resuspended in a saline solution, the organic solvent was added again and the same procedure was repeated three to four times. Finally the pellet was washed twice with cold distilled water. Among the hydrophobic organic solvents tested (diethylether, dichloromethane and hexane), only the hexane could trap the spores under the conditions described. The compositions of the different phases of the centrifuged solution were verified by observation at 100× using a light microscope after staining with Coomassie blue solution (0.13% (w/v) Coomassie blue reagent; 50% (v/v) acetic acid). Spores were trapped by the hexane on the top layer; cell debris remained in the aqueous phase while the crystals accumulated to form the pellet (Fig. 1).

The highest crystal purity was attained when the hexane was added at a concentration of 10% which is the closest to the ratio found by Doyle et al. (1984) (approximately 133 μL hydrocarbon/mL cell suspension) for maximal adherence of spores to hydrocarbons. The purified crystals were air dried (away from light) and weighed. About 10 mg of 99% pure crystals was obtained from 35 mL of culture. After alkaline dissolution of the toxin proteins obtained in the culture medium (Rivera, 1998), the toxin protein concentration was estimated by the Bradford method, using the bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). The crystal's recovery yield was calculated according to the following equation:

$$\text{Recovery yield} = \frac{\text{Crystals dry weight} \times 100}{\text{Mass of toxin proteins in the culture}}.$$

The recovery yield of H_3 crystals was 44%. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 2) indicated that the proteins

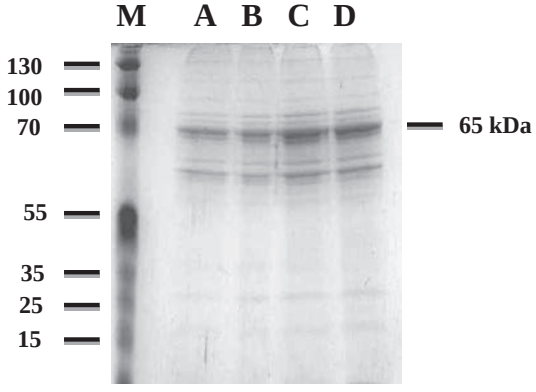


Fig. 2. Stained sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel after electrophoresis of H_3 crystals before (lanes A, B) and after purification (lanes C, D), lane M, molecular weight standards.

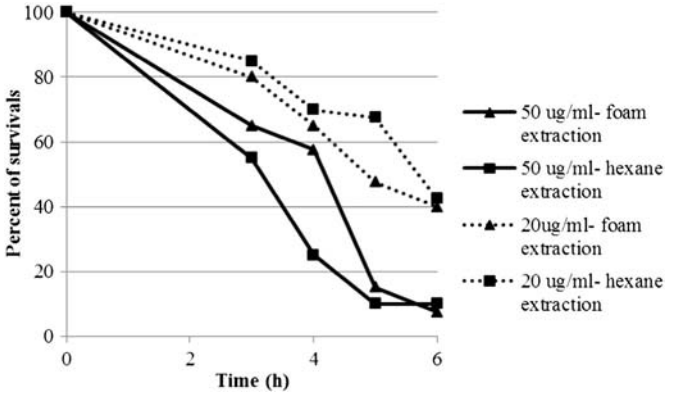


Fig. 3. Survival of *Anopheles gambiae* four instar larvae infected with H_3 purified toxins. This result is representative of two independent experiments. Same results have been obtained on third instar Larvae.

composing the crystals of H_3 were unaffected and that proteolysis did not occur during the purification.

The toxicity of the purified H_3 crystals was compared to that of traditionally extracted crystals using the foam separation technique (Sharpe et al., 1978). As shown in Fig. 3 the new extraction protocol does not affect the efficiency of crystal toxicity against *Anopheles gambiae* larvae.

The purification method was also used to separate the crystals of another *B. thuringiensis* strain "Lip" which produces bipyramidal crystals and few cuboidal crystals. About 67 mg of 99% pure crystals was obtained from 35 mL of culture medium which corresponds to a recovery yield of 92%. The toxin protein concentration determined in "Lip" culture medium was 3-fold greater than that obtained in H_3 culture medium. Lip crystals are bigger and have higher content of proteins than H_3 crystals which could explain the higher recovery yield of these crystals.

The purification procedure described herein was shown efficient at separating spores and crystals of two different *B. thuringiensis* strains having different crystals shapes. It is an easy and fast separation method that does not require ultracentrifugation or any expensive material. Moreover larger quantities of purified crystals could be prepared using this method than are conveniently available from density gradient centrifugation.

We would like to thank the research council of Saint Joseph University and Arcenciel for financing and supporting this work.

References

Anderson, T., 1990. Effects of Carbon:Nitrogen Ratio and Oxygen on the Growth Kinetics of *Bacillus thuringiensis* and Yield of Bioinsecticidal Crystal Protein(M.Sc Thesis) The University of Western Ontario, London, Canada.

Ang, Barbara J., Nickerson, Kenneth W., 1978. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. Appl. Environ. Microbiol. 36 (4), 625–626.

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

Doyle, Ronald J., Fariborz, Nedjat-Haiem, Singh, Jyoti S., 1984. Hydrophobic characteristics of bacillus spores. Curr. Microbiol. 10, 329–332.

El Khoury, M., Azzouz, H., Chavanieu, A., Abdelmalak, N., Chopineau, J., Awad, k.M, 2014. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new cry 1 Aa gene highly toxic to *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Arch. Microbiol. http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-0981-3.

Fast, P.G., 1972. The 6-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III. A rapid method for separating parasporal bodies from spores. J. Invertebr. Pathol. 20, 139–140.

Feitelson, J., 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In: Kim, L. (Ed.), Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 63–72.

Ito, Akio, Yasuyuki, Sasaguri, Sakae, kitada, Yoshitomo, Kusaka, kyoko, Kuwano, Kenjiro, Masutomi, Eiichi, Mizuki, Tetsuyuki, Akao, Michio, Ohba, 2004. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. J. Biol. Chem 279, 21282–21286.

Murty, M.G., Srinivas, G., Bora, R.S., Sekar, V., 1994. A simple method for separation of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* using carboxymethyl cellulose column chromatography. J. Microbiol. Methods 19 (2), 103–110.

Rivera, D., 1998. Growth Kinetics of *Bacillus thuringiensis* Batch, Fed Batch and Continuous Bioreactor Cultures(M.Sc Thesis) The University of Western Ontario, London, Canada.

Rolle, Roderick L., 2013. An extensive characterization study of different *Bacillus thuringiensis* strains collected from the Nashville Tennessee area. Afr. J. Biotechnol. 12 (30), 4827–4835.

Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J., Lereculus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D., Dean, D., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 775–806.

Sharpe, E.S., Nickerson, K.W., Bulla, L.A., Aronson, J.N., 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. Appl. Microbiol. 30, 1052–1053.

Sharpe, E.S., Herman, A.I., Toolan, S.C., 1978. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* by flotation. J. Invertebr. Pathol. 34, 315–316.

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

Zhu, Zhu Sheng, Allan, Brookes, Ken, Carlson, Philip, Filner, 1989. Separation of protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* by Ludox gradient centrifugation. Appl. Environ. Microbiol. 55 (5), 1279–1281.