



HAL
open science

Recents developpements de la recherche sur la genetique de *Bacillus thuringiensis* Berliner

Didier D. Lereclus

► **To cite this version:**

Didier D. Lereclus. Recents developpements de la recherche sur la genetique de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Agronomie*, 1984, 4 (3), pp.269-278. hal-02717551

HAL Id: hal-02717551

<https://hal.inrae.fr/hal-02717551v1>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Récents développements de la recherche sur la génétique de *Bacillus thuringiensis* Berliner

Didier LERECLUS

Institut Pasteur, Laboratoire de Biochimie microbienne, 28, rue du Docteur-Roux, F 75724 Paris
I.N.R.A., Station de Recherches de Lutte biologique, La Minière, F 78280 Guyancourt

RÉSUMÉ

Bacillus thuringiensis est une bactérie gram-positive ayant la particularité de synthétiser un cristal protéique entomopathogène lors du processus de sporulation.

Les aspects génétiques de cet organisme procaryote ont été abordés par différentes voies : étude de l'ADN extrachromosomique, clonage du gène codant pour le cristal protéique, élaboration d'un système de transfert d'ADN.

La plupart des souches de *B. thuringiensis* examinées possèdent des plasmides dont les masses moléculaires sont comprises entre 1,5 et 180 mégadaltons (Md). Certains plasmides sont conservés au travers des différents sérotypes de *B. thuringiensis* et peuvent être répartis en 2 catégories de taille (inférieure et supérieure à 15 Md) n'ayant pas d'homologie entre elles. Le gène codant pour le cristal protéique est généralement porté par un plasmide de masse moléculaire supérieure ou égale à 30 Md. Néanmoins, il existe dans certaines souches d'autres situations concernant la localisation de ce gène. Le gène du cristal peut s'exprimer chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* où la quantité de protéines toxiques produites représente 10 p. 100 de ce qui est obtenu chez *B. thuringiensis*.

Trois systèmes de transfert d'ADN ont été mis en évidence chez *B. thuringiensis* : la transduction, la transformation et un mécanisme assimilable à la conjugaison. Ce dernier système s'est révélé particulièrement efficace pour transférer des plasmides et donc pour étudier leur fonction dans la cellule.

Mots clés additionnels : Protéine entomopathogène, plasmides, recombinaison génétique in vitro, transfert d'ADN, transduction.

SUMMARY

Recent advances in the genetics of Bacillus thuringiensis Berliner.

The gram-positive bacterium, *Bacillus thuringiensis*, produces an insecticidal proteinaceous crystal which is synthesized during the sporulation process.

The genetics of this prokaryotic organism was approached through different lines of research, namely : characterization of the extrachromosomal DNA, cloning of the crystal protein gene and elaboration of a DNA transfer system.

Most *B. thuringiensis* strains examined possessed plasmids with molecular weights ranging from 1.5 to 180 megadaltons (Md). Some plasmids were conserved among different serotypes of *B. thuringiensis* and could be distributed into 2 size classes (inferior and superior to 15 Md) having no homology between them. Generally, the gene coding for the crystal protein was carried by a plasmid with a molecular weight superior or equal to 30 Md. Nevertheless, various combinations were found regarding the localisation of this gene. The crystal gene was expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, in these cases the amount of insecticidal proteins produced represented 10 % of that produced by *B. thuringiensis*.

Three DNA transfer systems proved to be effective in *B. thuringiensis*, they were : transduction, transformation and a conjugation-like mechanism. This last system was highly efficient in transferring plasmids and could thus be used to study their function in the cell.

Additional key words : Insecticidal protein, plasmids, genetic manipulation, DNA transfer, transduction.

I. INTRODUCTION

Depuis une quinzaine d'années l'activité entomopathogène de *Bacillus thuringiensis* Berliner est bien connue (ANGUS & NORRIS, 1968 ; LECADÉ, 1970) et permet déjà de combattre sélectivement un nombre limité de lépidoptères défoliateurs dont la nocuité se manifeste, par

exemple (MARTOURET, 1978) :

- en grandes cultures (pyrale du maïs, pyrale du riz...),
- en cultures maraîchères (piérides du chou, teigne des crucifères...),
- en viticulture (tordeuse de la grappe, *Arctia caja* L...),
- en arboriculture fruitière (cheimatobie, teigne de l'olivier, écaille fileuse, bombyx cul brun, bombyx livrée...),

— ou encore en forêt (tordeuse verte, bombyx dispar, chenilles processionnaires du chêne et du pin, tordeuse du mélèze).

Cette potentialité reste toutefois peu utilisée en agriculture, en comparaison des insecticides chimiques. Aujourd'hui, alors que des phénomènes de résistance aux insecticides chimiques sont souvent observés, les possibilités, anciennes et nouvelles, offertes par *B. thuringiensis* suscitent un regain d'intérêt. La protéine toxique δ -endotoxine, produite par cette bactérie lors du processus de sporulation, ne semble pas, en effet, induire de phénomènes de résistance chez les insectes et, par ailleurs, il a été récemment montré que le spectre d'action de cette toxine n'est pas seulement limité aux lépidoptères mais qu'il s'étend aussi à certains diptères (de BARJAC, 1978). De plus, les techniques de recombinaison génétique *in vitro* et de mutagenèse dirigée permettent maintenant d'envisager l'élargissement de son spectre d'activité insecticide à d'autres espèces d'insectes nuisibles, qu'elles soient hématophages et vectrices de maladies parasitaires ou bien phytophages et déprédatrices de certaines de nos productions agricoles.

La synthèse du cristal, qui apparaît dès le stade II de la sporogénèse, s'effectue à partir d'un ARN messager relativement stable (GLATRON & RAPOPORT, 1972) transcrit préférentiellement par l'une des ARN polymérases spécifiques de la sporulation (KLIER *et al.*, 1978). La structure cristalline de l'inclusion résulte de l'assemblage de sous-unités protéiques identiques ou protoxines de 130 000 daltons (GLATRON *et al.*, 1972; BULLA *et al.*, 1977). Le cristal protéique digéré à pH alcalin par les protéases de l'insecte est transformé en toxines polypeptidiques actives de 68 000 daltons (LECADET & MARTOURET, 1962, 1967; BULLA *et al.*, 1979; LUTHY & EBERSOLD, 1981). Ces résultats ont été démontrés pour la plupart des souches de *B. thuringiensis*; cependant, chez la souche *israelensis*, sérotype 14, qui est active contre certains diptères, la protoxine serait de taille inférieure; un composant majoritaire de 26 000 daltons a en effet été trouvé chez cette souche (TYRELL *et al.*, 1981).

Il existe aussi une importante documentation sur les propriétés biochimiques d'une autre toxine de *B. thuringiensis*: la β -exotoxine ou thuringiensine (LECADET & DE BARJAC, 1981). Cette toxine thermostable est de nature nucléotidique; sa structure moléculaire ainsi que son mécanisme d'action sur l'ARN polymérase des eucaryotes ont été clairement démontrés (FARKAS *et al.*, 1969; SEBESTA & HORSKA, 1970). Compte tenu de son effet inhibiteur sur la synthèse des ARN, le spectre d'action de la β -exotoxine est moins spécifique que celui du cristal protéique; il touche en effet de nombreux insectes appartenant à plusieurs ordres. De ce fait, son application agronomique, plus difficilement contrôlable, n'est pas autorisée à l'heure actuelle.

Ces connaissances biochimiques sur les différentes toxines de *B. thuringiensis* ont largement devancé les recherches sur la génétique et, en particulier, celles concernant les gènes impliqués dans la synthèse de ces toxines. Ce retard est principalement dû au fait que les 3 principaux systèmes d'investigation génétique: la transduction, la transformation et la conjugaison n'ont commencé à être étudiés que depuis 5 ans chez *B. thuringiensis* (LECADET *et al.*, 1980; MARTIN *et al.*, 1981; GONZALEZ & CARLTON, 1982).

Parmi les différentes voies qui ont donc permis l'approche génétique de cette bactérie, nous présentons ici certains des résultats significatifs de l'évolution de nos connaissances sur les aspects génétiques de *B. thuringiensis*.

II. CARACTÉRISATION PHYSIQUE DES PLASMIDES DE *B. THURINGIENSIS*

Les travaux concernant l'ADN extrachromosomique de *B. thuringiensis* ont constitué la première approche d'une étude génétique chez cet organisme, d'une part parce qu'ils ne nécessitaient pas d'autres connaissances d'ordre génétique, et d'autre part en raison du caractère non essentiel, pour la bactérie, des toxines entomopathogènes produites lors de la sporulation, ce dernier point dénotant la possibilité d'une localisation plasmidique des gènes responsables de la synthèse de ces toxines.

Les premiers résultats qui ont indiqué la présence d'ADN extrachromosomique dans plusieurs souches de *B. thuringiensis* (DEBABOV *et al.*, 1977; STAHLY *et al.*, 1978) ont aussi montré qu'il existait une relation entre la δ -endotoxine et les plasmides. Les auteurs remarquaient en effet que la disparition du cristal protéique coïncidait avec la perte de la totalité de l'ADN extrachromosomique dans ces bactéries.

La présence de molécules d'ADN extrachromosomique a, par la suite, été révélée dans la plupart des souches de *B. thuringiensis* (GONZALEZ & CARLTON, 1980; LECADET *et al.*, 1981); leur structure hélicoïdale, caractéristique des plasmides, a aussi pu être observée en microscopie électronique par J. RIBIER (LERECLUS, 1981).

Des examens plus systématiques des contenus plasmidiques de plusieurs souches, appartenant à des sérotypes différents, ont conduit à faire une caractérisation physique des plasmides en fonction de leur masse moléculaire (GONZALEZ *et al.*, 1981; LERECLUS *et al.*, 1982). Le tableau 1 présente une grande partie des résultats obtenus et fait apparaître la complexité et la diversité des schémas plasmidiques mis en évidence par électrophorèse en gel d'agarose ou par microscopie électronique. Il ressort en effet que presque toutes les souches possèdent des plasmides dont les masses moléculaires sont comprises entre 1,5 et 180 Md. On peut remarquer que toutes ces souches, dont la caractéristique commune est la synthèse d'un cristal toxique, ont des constituants extrachromosomiques de taille élevée (supérieure à 30 Md). Seule la souche *entomocidus* du sérotype 6 ne semble pas posséder de plasmides, bien qu'elle soit aussi productrice de cristal.

En ce qui concerne la relation des plasmides avec le cristal protéique, GONZALEZ *et al.* (1981) ont recherché de façon systématique si la perte d'un plasmide entraînait le phénotype Cry^- (absence de cristal). Cette étude a été réalisée, d'une part avec des mutants spontanés Cry^- , et d'autre part après traitement des souches sauvages par le SDS (sodium dodecyl sulfate), suivant la méthode décrite par BERNHARD *et al.* (1978), afin de provoquer la perte de plasmides. Ce type d'investigation a clairement montré que, dans le cas de 2 souches: *thuringiensis* HD2 (sérotype 1) et *kurstaki* HD73 (sérotype 3), les plasmides de 75 Md et de 50 Md étaient respectivement absents des mutants Cry^- .

Une étude des homologies moléculaires existant entre ces différents plasmides a montré que la diversité physique des contenus extrachromosomiques n'avait pas son équivalent au niveau moléculaire. Deux groupes de taille (supérieure ou inférieure à 15 Md) ont en effet pu être distingués. Ces 2 groupes ne présentent que très peu d'homologies entre eux, alors qu'à l'intérieur de chacun d'eux il existe une conservation, partielle ou totale, de certains plasmides au travers des différents sérotypes (LERECLUS *et al.*, 1982). On peut noter, comme exemple, le cas où les plasmides de la souche *subtoxicus* (sérotype 6) sont marqués au ^{32}P et utilisés comme sonde radioactive lors d'hybridations moléculaires réalisées avec des plasmides provenant d'autres

TABLEAU 1

Contenus plasmidiques de 19 souches de *B. thuringiensis* productrices de la δ -endotoxine.
Plasmid content of 19 crystalliferous strains of *B. thuringiensis*.

H. sérotype ^a	Souches ^b	Nombre de plasmides	Plasmides observés par électrophorèse en gel d'agarose ou par microscopie électronique ^c (masses moléculaires exprimées en Md)
1	<i>berliner</i> 1715	17	3,9; 5,4; 7,5; 9,5; 15; 17; 21; 25; 28; 39; 42; 51; 60; 77; 100; 120; 180
1	<i>berliner</i> 22105 (type)	7	5,4; 6,2; 7,5; (15); 33; 56; 58
1	<i>thuringiensis</i> HD2	9	5,2; 6,2; 7,2; <u>7,6</u> ; 32; 37; 54; 57; 75; ~ 150
3a	<i>alesti</i> HD4	10	4,6; 4,9; 5,4; <u>6,2</u> ; <u>6,4</u> ; 35; 37; 39; 46; 105
3a, 3b	<i>kurstaki</i> (type)	5	5,2; 5,6; 7,8; (10,5); 54
3a, 3b	<i>kurstaki</i> HD1	8	1,5; 5,2; 5,6; 9,3; (10); 30; 47; 54
3a, 3b	<i>kurstaki</i> HD73	6	4,9; 5,2; 5,4; 7,5; 50; 50
3a, 3b	<i>kurstaki</i> HD 73.6	6	4,9; 5,2; 6,7; 7,5; 43; 50
4a, 4b	<i>sotto</i> (type)	3	5,2; 39; 43
4a, 4b	<i>dendrolimus</i> (type)	4	33; 37; 66; 73
5a, 5b	<i>galleriae</i> G1	5	6,3; 8,6; 20; 51; 74
5a, 5b	<i>galleriae</i> HD8	4	5,2; <u>8,7</u> ; 10,3; ~ 130
6	<i>entomocidus</i> (type)	0	
6	<i>subtoxicus</i> (type)	2	52; 56
7	<i>aizawai</i> (type)	8	3,9; 5,4; 5,6; 7; 8,5; 30; 35; (60)
7	<i>aizawai</i> 7.21	8	4; 6,6; 7,5; 8,9; 15; 18; 40; 50
9	<i>tolworthi</i> (type)	6	5,2; 7,6; 8; (16); 28; 45
14	<i>israelensis</i> HD567	9	3,2; 4,1; 4,9; ~ <u>10</u> ; 10,5; 66; 72; ~ 100; ~ 130
14	<i>israelensis</i> (type)	6	4; 4,5; 5,3; (10); 68; 72

a : Sérotype flagellaire, en accord avec la classification de de BARIAC (1981).

b : Les souches marquées « type » sont répertoriées dans la classification de de BARIAC & BONNEFOI (1968).

c : Les masses des plasmides des souches *berliner* 1715, *thuringiensis* HD2, *dendrolimus*, *galleriae* G1 et *subtoxicus* ont été déterminées par la mesure, en microscopie électronique, du contour de leur forme circulaire ouverte (exception faite du plasmide de 150 Md de la souche *thuringiensis* HD2). Ces plasmides ont été utilisés comme marqueurs en gel d'agarose pour déterminer la masse moléculaire des autres plasmides de *B. thuringiensis*.

- Les masses entre parenthèses correspondent à des molécules d'ADN extrachromosomique présentes en faible quantité et qui ne sont pas détectées de façon systématique.

- Les masses soulignées sont celles de plasmides isolés principalement sous la forme circulaire ouverte. Dans le cas du plasmide de 7,6 Md de la souche HD2 aucune forme hélicoïdale (superenroulée) n'a été observée. Le constituant de 10 Md de la souche *israelensis* HD567 n'est présent que sous la forme linéaire.

N.B. : Il s'agit là d'une caractérisation physique des différentes espèces de plasmides dont certaines d'entre elles peuvent représenter les formes dimériques d'espèces de masses moléculaires 2 fois inférieures. D'après GONZALEZ *et al.* (1981), GONZALEZ & CARLTON (1982), LERECLUS *et al.* (1982), LERECLUS *et al.* (1983).

a : Flagellar serotype according to de BARIAC'S classification (1981).

b : Strains marked « type » are indexed in the classification of de BARIAC & BONNEFOI (1968).

c : Masses of plasmids from *berliner* 1715, *thuringiensis* HD2, *dendrolimus*, *galleriae* G1 and *subtoxicus* strains were determined by contour length measurements of their open circular form by electron microscopy (with the exception of the 150 Md plasmid from the *thuringiensis* HD2 strain). These plasmids were used as molecular weight standards on agarose gels to obtain molecular weights for the other *B. thuringiensis* plasmids.

- Masses in parentheses correspond to extrachromosomal DNA present in minor amounts and not detected systematically.

- Underlined masses are those of plasmids isolated predominantly in the open circular form. In the case of the 7.6 Md HD2 plasmid, no supercoiled DNA has ever been detected. The 10 Md plasmid from the *israelensis* HD567 strain is only present under linear form.

N.B. : This table shows a physical characterization of different species of plasmids; perhaps some of them may represent the dimeric forms of species with lower molecular weights.

souches. Les résultats obtenus dans ce type d'expérience montrent que ces 2 plasmides de 52 et 56 Md hybrident seulement avec les plasmides de masse moléculaire élevée (comprise entre 40 et 70 Md) appartenant aux sérotypes 1, 3, 4, 5 et 9. Dans un seul cas, nous avons pu observer une homologie entre cette sonde radioactive et un constituant de taille nettement inférieure, le plasmide de 9,5 Md de la souche *berliner* 1715 (sérotype 1). Ces résultats suggèrent donc clairement qu'il existe des séquences d'ADN extrachromosomique communes à différents sérotypes de *B. thuringiensis* et que l'on peut ainsi considérer comme étant caractéristiques de l'espèce. Un autre résultat récent semble par ailleurs confirmer cette hypothèse : il s'agit de l'isolement d'une séquence d'ADN de 3 Md provenant du plasmide de 54 Md de la souche *kurstaki* type. Cet isolement a été obtenu par insertion *in vivo* du fragment de 3 Md sur le plasmide conjugatif pAM β 1 (LERECLUS *et al.*, 1983). Il s'est avéré par la suite que cette séquence d'ADN de 3 Md était

présente dans plusieurs souches dont la souche *berliner* 1715 où elle était localisée à la fois sur les plasmides de 9.5 et de 42 Md.

III. LOCALISATION, CLONAGE ET EXPRESSION DES GÈNES CODANT POUR LE CRISTAL PROTÉIQUE

En même temps que l'étude des plasmides de *B. thuringiensis*, plusieurs travaux ont été réalisés sur le gène de structure du cristal protéique. Les recherches ont abouti à cloner le gène, par recombinaison génétique *in vitro*, dans des micro-organismes génétiquement mieux connus : *Escherichia coli* Castellani & Chalmers et *Bacillus subtilis* Cohn. Chronologiquement, les premiers travaux menés sur ce sujet ont consisté à construire une banque de clones représentant l'ensemble du génome (ADN chromosomique

et extrachromosomique) de *B. thuringiensis*, souche *berliner* 1715 (KLIER *et al.*, 1979). A partir de la totalité des clones, dont le plasmide pBR322 constituait le vecteur, ces auteurs ont isolé une séquence d'ADN de 4 kilobases (kb) hybridant avec un ARN messager de 26S, spécifique de la sporulation et dont la taille était suffisante pour coder une protéine d'environ 150 000 daltons.

Il s'est avéré que, chez *E. coli* et *B. subtilis*, ce fragment d'ADN, d'origine chromosomique ou, comme le suggèrent KRONSTAD *et al.* (1983), provenant d'un plasmide de masse moléculaire très élevée (> 150 Md), codait bien pour un ARN messager de 15 à 26S qui n'était toutefois pas traduit en protéine. Le fragment de 4 kb a néanmoins pu être utilisé pour localiser, par hybridation moléculaire, une séquence d'ADN présentant avec lui d'importantes homologues sur un plasmide de 40 Md de la même souche *berliner* 1715 (KLIER *et al.*, 1982). Cette séquence d'ADN plasmidique contenait en réalité le gène actif du cristal protéique puisque, clonée chez *E. coli*, les mêmes auteurs ont observé qu'elle était responsable de la synthèse d'une protéine toxique contre les larves de lépidoptères et présentant les mêmes caractéristiques antigéniques que la δ -endotoxine. Il résultait donc de cette étude que, dans la souche *berliner* 1715, 2 séquences homologues du gène du cristal protéique étaient présentes : d'une part, sur le chromosome ou sur un plasmide de 150 Md et, d'autre part, sur un plasmide de 40 Md.

La synthèse des sous-unités protéiques constitutives du cristal a été seulement obtenue à partir du gène d'origine plasmidique : chez *E. coli*, dans des cellules en phase végétative et, chez *B. subtilis*, dans les cellules engagées dans le processus de sporulation. Ce dernier point indique que l'expression du gène est vraisemblablement soumise à un mécanisme de régulation identique chez *B. thuringiensis* et *B. subtilis*. Par ailleurs, les auteurs de ce travail estiment que la quantité de protéine toxique produite dans *E. coli* et *B. subtilis* représente environ 10 p. 100 de ce qui est généralement obtenu chez *B. thuringiensis*. Ce pourcentage relativement faible pourrait être à l'origine de l'absence du phénomène de cristallisation des sous-unités protéiques dans ces 2 organismes.

Parallèlement à l'étude précédente effectuée sur la souche *berliner* 1715, 2 autres équipes ont réalisé le clonage des gènes du cristal d'une souche *kurstaki*. Deux types de méthodologie, utilisation du vecteur plasmidique pBR322 (SCHNEPF & WHITELEY, 1981) et du phage Charon 4A (HELD *et al.*, 1982), ont respectivement abouti au clonage du gène porté par un plasmide et d'un gène présumé d'origine chromosomique. Dans les 2 cas, les clones recombinants obtenus chez *E. coli* ont été détectés pour leur production de protoxine par radioimmunologie. Donc, dans la souche *kurstaki*, il y a là encore une double localisation du gène mais, à la différence de la 1^{re} expérience, les 2 gènes auraient la propriété de s'exprimer chez *E. coli*.

L'utilisation des gènes clonés a par ailleurs permis de déterminer précisément, par hybridation moléculaire, la localisation des gènes du cristal dans plusieurs sérotypes de *B. thuringiensis*. La figure 1 représente les contenus plasmidiques de 4 souches différentes, où sont indiqués les plasmides porteurs du gène du cristal. Dans le cas de ces 4 souches, il s'agit d'un plasmide de masse moléculaire comprise entre 40 et 60 Md (KLIER *et al.*, 1982). De plus, les hybridations moléculaires avec les gènes clonés ont mis en évidence les diverses situations relatives à la localisation plasmidique et/ou chromosomique du gène du cristal. Ces résultats seront rappelés ultérieurement lors de la discussion (tabl. 4).

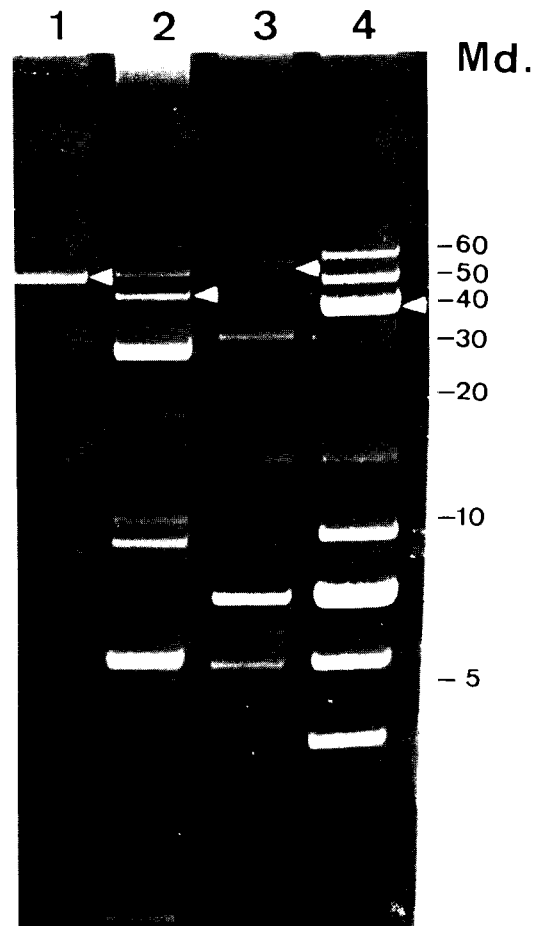


Figure 1

Localisation du gène plasmidique codant pour la δ -endotoxine dans 4 souches de *B. thuringiensis*.

Photographie d'un gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium, contenant l'ensemble des plasmides de 4 souches de *B. thuringiensis* ; 1 = subtoxicus (type) ; 2 = *kurstaki* H δ 1 ; 3 = *berliner* 22105 ; 4 = *berliner* 1715.

Les flèches indiquent les plasmides porteurs du gène du cristal protéique. Md représente l'échelle des masses moléculaires en mégadaltons.

Location of the δ -endotoxin plasmid gene in 4 *B. thuringiensis* strains.

Agarose gel of total plasmids, from 4 *B. thuringiensis* strains, stained with ethidium bromide : 1 = subtoxicus (wild type) ; 2 = *kurstaki* H δ 1 ; 3 = *berliner* 22105 ; 4 = *berliner* 1715.

Arrows indicate the plasmids harbouring the crystal protein gene. Md represents the scale of molecular weights in megadaltons.

Finalement, le clonage des gènes codant pour le cristal protéique a récemment permis d'établir la séquence d'ADN des promoteurs des gènes d'origine plasmidique (WONG *et al.*, 1983) et chromosomique (KLIER *et al.*, 1983). Dans les 2 cas une forte affinité a pu être observée entre ces promoteurs et l'ARN-polymérase — forme II — spécifique de la sporulation (KLIER *et al.*, 1978). De plus, certaines similitudes ont pu être dégagées entre le promoteur du gène du cristal d'origine plasmidique et les promoteurs des gènes de sporulation de *B. subtilis*. Ces résultats suggèrent donc que l'expression des gènes responsables de la synthèse du cristal protéique et l'expression des gènes chromosomiques de sporulation sont soumises à des mécanismes de régulation proches, sinon identiques.

IV. TRANSFERT D'ADN DANS *B. THURINGIENSIS*

D'une façon générale, bien que les techniques de recombinaison génétique *in vitro* offrent la possibilité d'isoler et d'étudier l'expression de certains gènes chez des organismes autres que celui d'origine, il est encore difficile d'envisager l'étude génétique approfondie d'une espèce bactérienne sans disposer des moyens classiques permettant le transfert d'ADN à l'intérieur même de cette espèce. C'est pourquoi, depuis quelques années, de nombreuses recherches ont été entreprises sur les systèmes de transformation, conjugaison et transduction chez *B. thuringiensis*.

A. Transformation

Aucun système de transformation sur les cellules entières et faisant intervenir un état de compétence n'a été mentionné chez *B. thuringiensis*. En revanche, plusieurs tentatives de transformation des protoplastes par des plasmides en présence de polyéthylène glycol ont été effectuées chez *B. thuringiensis* suivant la méthode décrite par CHANG & COHEN (1979). Les expériences de transformation ont été réalisées avec 3 plasmides différents : les plasmides pBC16 de *Bacillus cereus* Fr. and Fr. (ALIKHANIAN *et al.*, 1981), pUB110 (MITEVA *et al.*, 1981) et pC194 (MARTIN *et al.*, 1981) provenant de *Staphylococcus aureus* Rosenb. L'expression de ces plasmides a pu être obtenue dans *B. thuringiensis*, mais les fréquences de transformation restaient relativement faibles dans la plupart des cas (environ 10^{-6} transformant par cellule). Deux autres caractéristiques rendaient cette méthodologie peu fiable ; tout d'abord l'importante quantité d'ADN requise ($\geq 1 \mu\text{g}$ pour chaque expérience de transformation) et ensuite le fait que 2 souches seulement se sont révélées susceptibles d'être transformées, une souche *galleriae* appartenant au sérotype 5 et une souche dérivée de la variété *kurstaki* HD1 (sérotype 3).

On peut supposer que le caractère exceptionnel de la transformation de *B. thuringiensis* soit en partie dû aux conditions de régénération de la paroi bactérienne ne permettant qu'une réversion peu efficace et aléatoire des protoplastes en formes bacillaires viables (LERECLUS, 1981).

B. Conjugaison

Un phénomène assimilable à la conjugaison a été récemment mis en évidence entre différentes souches de *B. thuringiensis* par GONZALEZ & CARLTON (1982). Bien que dans la suite du texte nous appelions ce phénomène « conjugaison », quelque réserve doit être faite quant à sa définition. Il s'agit d'un mécanisme nécessitant le contact cellulaire de 2 populations bactériennes en croissance dans un milieu liquide et dont le résultat peut s'exprimer par l'observation d'un transfert de plasmides. Nous ne savons pas si ce mécanisme présente un caractère actif comme la conjugaison chez les bactéries Gram-négatives. Toutefois, l'insensibilité du phénomène à la présence de désoxyribonucléase implique que le transfert se produit dans des conditions où l'ADN est protégé, tout au moins partiellement, du milieu extracellulaire. GONZALEZ & CARLTON ont par ailleurs montré que le processus de transfert ne fait pas intervenir de particules phagiques.

Le tableau 2 résume quelques résultats obtenus par cette méthode de conjugaison. Il apparaît que certains plasmides sont transférables à des fréquences élevées (50 p. 100 des cellules réceptrices) alors que d'autres ne le sont pas, tout au moins avec de telles fréquences. Ces différences peuvent

exprimer des phénomènes d'incompatibilité entre plasmides, voire même entre souches ; pour une souche réceptrice donnée, n'importe quelle autre souche ne pourrait en effet être utilisée comme donneuse. Ces expériences ont permis à GONZALEZ *et al.* (1982) de faire 2 constatations concernant la fonction de plusieurs plasmides :

— l'introduction du plasmide de 43 Md de la souche HD 73.6 entraîne une modification de l'aspect colonial du transconjugant par rapport à la souche réceptrice ;

— le transfert de certains plasmides (par exemple le plasmide de 50 Md de la souche HD 73.6) rétablit la production de cristal chez les transconjugants obtenus à partir de bactéries réceptrices Cry^- (tabl. 2). Ces cristaux présentant la même spécificité antigénique que ceux de la souche donneuse, il paraît donc évident que le ou les gènes codant pour la δ -endotoxine sont bien portés par le plasmide transféré.

Une 2^e approche du système de conjugaison a été abordée au laboratoire où nous avons essayé de pallier l'absence de marqueur permettant de sélectionner les transconjugants. Tous les plasmides n'étant pas transmissibles avec des fréquences élevées, il était nécessaire de disposer d'un vecteur porteur d'un marqueur sélectif afin de suivre par co-conjugaison le transfert des plasmides cryptiques de *B. thuringiensis*.

Dans ce but, le plasmide pAM β 1 de *Streptococcus faecalis* Andr. & Horder (CLEWELL *et al.*, 1974) a été utilisé lors d'expériences de conjugaison intraspécifique dans *B. thuringiensis*. Ce plasmide porte un gène conférant la résistance à l'érythromycine et possède des propriétés mobilisatrices d'ADN plasmidique chez *S. faecalis*. Le plasmide pAM β 1 a tout d'abord été introduit dans différents sérotypes de *B. thuringiensis* par conjugaison intergénérique avec *S. faecalis* puis utilisé par la suite pour suivre le processus de conjugaison entre souches de *B. thuringiensis*. La sélection des transconjugants pour l'acquisition de la résistance à l'érythromycine a ainsi permis de déceler le transfert de plasmides cryptiques résidents de *B. thuringiensis* (tabl. 2) (LERECLUS *et al.*, 1983).

Il apparaît que, dans le cas de la souche *subtoxicus*, le passage d'un plasmide de 52 ou 56 Md est observé uniquement parmi les transconjugants sélectionnés pour la résistance à l'érythromycine et ayant donc reçu le plasmide pAM β 1. Lors d'expériences de conjugaison réalisées avec d'autres souches, cette méthode s'est aussi révélée efficace pour sélectionner, par le biais de pAM β 1, le transfert de plasmides n'étant pas auto-transmissible, tout au moins avec des fréquences élevées, chez *B. thuringiensis*. Néanmoins, il est encore trop tôt pour conclure que le plasmide pAM β 1 Bexprime, chez *B. thuringiensis*, la propriété de mobiliser l'ADN plasmidique durant la conjugaison.

C. Transduction

Décrit pour la première fois par THORNE (1978), le système de transduction chez *B. thuringiensis* a été utilisé par plusieurs équipes pour localiser des marqueurs chromosomiques et ébaucher ainsi plusieurs groupes de liaison chez différentes souches de cet organisme (THORNE, 1978 ; PERLAK *et al.*, 1979 ; LECADÉ *et al.*, 1980 ; LANDEN *et al.*, 1981). Deux phages ont été principalement utilisés lors de ces expériences : le phage CP54 de *B. cereus* et le phage Φ 63 de *B. thuringiensis*, tous deux isolés du sol. Ces 2 particules phagiques ont la potentialité de transférer de l'ADN par un mécanisme de transduction généralisée, avec des fréquences comprises entre 5.10^{-7} et 5.10^{-6} pour un

TABLEAU 2

Transfert intraspécifique de plasmides dans B. thuringiensis.
Intraspecific transfer of plasmids in B. thuringiensis.

Souches donneuses	Souches réceptrices résistantes à la streptomycine (Str ^R) ^a	Plasmides transmis	Pourcentage de transfert observé parmi les colonies réceptrices (Str ^R) ou (Str ^R Em ^R)	Références
<i>kurstaki</i> HD 73-6	<i>thuringiensis</i> HD2 cry ⁻	50 Md ^b 43 Md ^c 6.7 Md 4.9 Md	~ 20 % ~ 50 %	GONZALIZ & CARLTON (1982)
<i>kurstaki</i> HD1	<i>thuringiensis</i> HD2 cry ⁻	Aucun		GONZALIZ & CARLTON (1982)
<i>kurstaki</i> (type)	<i>kurstaki</i> HD1 cry ⁻ B	5.6 Md 5.2 Md	~ 50 %	LERECLUS <i>et al.</i> (1983)
<i>subtoxius</i> (type)	<i>kurstaki</i> HD1 cry ⁻ B	Aucun	< 10 %	LERECLUS <i>et al.</i> (1983)
<i>subtoxius</i> Em ^R (pAMβ1)	<i>kurstaki</i> HD1 cry ⁻ B	52 ou 56 Md	> 50 % ^d	LERECLUS <i>et al.</i> (1983)

a : Il s'agit dans tous les cas de mutants cristal⁻ dérivés des souches HD2 ou HD1.

b : L'introduction de ce plasmide rétablit la production de cristal protéique.

c : L'introduction de ce plasmide modifie l'aspect colonial de la souche réceptrice.

d : Le transfert est observé parmi les transconjugants sélectionnés pour l'acquisition de la résistance à l'érythromycine (Em^R) donc si le plasmide pAMβ1 présent dans la souche donneuse a aussi été transféré.

N.B. : Le transfert intraspécifique des plasmides cryptiques est observé par électrophorèse en gel d'agarose du contenu extrachromosomique des souches réceptrices.

a : In all cases the crystal mutants derived from the HD2 and HD1 strains.

b : The introduction of this plasmid restored the crystal protein production.

c : The introduction of this plasmid induced a change in colony morphology of the recipient strain.

d : The transfer was observed among the transconjugants after selection for the resistance to erythromycin (Em^R) thus indicating that the pAMβ1 plasmid present in the donor strain had been transferred.

N.B. : Intraspecific transmission of cryptic plasmid was observed by examining plasmid patterns of the recipient strains.

caractère donné. Un dérivé du phage Cp54, désigné Cp54Ber pour sa capacité à transduire la souche *berliner* 1715, a été plus particulièrement étudié (LECADET *et al.*, 1980). Il s'agit d'un phage à structure icosaédrique dont le matériel génétique est constitué par une molécule d'ADN linéaire d'environ 70 Md.

Le tableau 3 rassemble en 5 groupes de liaison un certain nombre de loci correspondant à des marqueurs d'auxotrophie ou de résistance à des antibiotiques. Il faut toutefois remarquer que les travaux qui ont abouti à l'établissement de ces groupes ont été réalisés avec des souches de *B. thuringiensis* différentes ; de ce fait, quelque ambiguïté peut apparaître à l'intérieur et entre chaque groupe de liaison. Bien que ces résultats ne concernent pas un sérotype unique de référence, ils peuvent néanmoins constituer une base de travail pour une étude plus approfondie sur le déterminisme génétique de la sporulation et de la synthèse de la δ-endotoxine, au niveau de l'ADN chromosomique. Dans cette perspective, le bactériophage TP13 isolé par PERLAK *et al.* (1979) sera peut-être un « outil » intéressant. Ce phage a en effet la capacité de convertir, à des fréquences élevées, un mutant oligosporogène Cry⁻ d'une souche *sotto* en Sp⁺Cry⁺. Un tel résultat peut être dû à la transduction d'un gène intervenant dans la synthèse de l'ARN polymérase spécifique de la sporulation et nécessaire à la synthèse du cristal protéique mais il peut aussi indiquer l'existence d'une liaison génétique entre un gène de sporulation et un gène de la δ-endotoxine éventuellement localisé sur le chromosome de cette souche.

V. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Il apparaît immédiatement, lorsqu'on essaye de rassembler tous les résultats des travaux effectués sur *B. thuringiensis*, que le nombre important de souches (plus de 900), regroupées en 19 sérotypes, présente le risque de provoquer une divergence des recherches si une même nomenclature n'est pas utilisée pour désigner les souches étudiées.

Le grand nombre de souches peut constituer un élément intéressant dans le cadre de certaines études comme celles concernant l'ADN extrachromosomique, sa variabilité, sa dissémination au travers des différents sérotypes parfois relativement éloignés au niveau écologique et finalement son mode de transmission entre souches ; en revanche il demande beaucoup plus de rigueur lorsqu'il s'agit d'étudier l'ADN chromosomique. Il est en effet assez étonnant de constater que les expériences de transduction, dont l'objectif est de regrouper sur un même chromosome tous les marqueurs génétiques de *B. thuringiensis*, soient réalisées sur des souches différentes et non pas uniquement sur les mieux connus (*berliner* 1715 et *kurstaki* HD1).

En ce qui concerne l'étude des plasmides de *B. thuringiensis*, si l'absence d'une nomenclature uniforme des variétés ne facilite pas la comparaison entre les souches, les résultats obtenus par les différents laboratoires ont néanmoins pu fournir des données comparables et complémentaires. Il ressort en effet du tableau 1, outre l'importante diversité de plasmides, qu'à l'intérieur d'un même sérotype il existe une relative similitude des plasmides en fonction de

TABLEAU 3

Groupes de liaison de marqueurs chromosomiques établis par cotransduction dans *B. thuringiensis*.
Linkage groups obtained by cotransduction of chromosomal markers in *B. thuringiensis*.

Marqueurs ^a		Groupes de liaison (cotransduction des marqueurs > 10 %)	Souches	
1 <i>asp1</i> <i>trp1</i> <i>his1</i> <i>lys1</i> <i>cys4</i>	2 <i>his1</i> <i>cys1-cys2</i> <i>leu2</i> <i>trp1</i>	I	1 : <i>berliner</i> 1715 (sérotype 1) 2 : <i>thompsoni</i> (sérotype 12)	1 : LECADÉT <i>et al.</i> , 1981 ; LECADÉT & LERECLUS (1984) 2 : TORNE, 1978 ; PERLAK <i>et al.</i> , 1979
<i>metD</i> ou <i>C argO</i>		II	<i>berliner</i> 1715 et <i>thompsoni</i>	THORNE, 1978 ; LECADÉT <i>et al.</i> , 1981
<i>metA</i> <i>purA</i> <i>cysA</i> <i>rif</i>		III	<i>berliner</i> 1715	LECADÉT <i>et al.</i> , 1981 ; LECADÉT & LERECLUS (1984)
<i>nalA</i> <i>rifA</i> <i>strA</i> <i>spcA</i>		IV	<i>gelechiaie</i> (sérotype 1)	LANDEN <i>et al.</i> , 1981
<i>gly1</i> <i>ura1</i> <i>gly2</i>		V	<i>berliner</i> 1715	LECADÉT & LERECLUS (1984)

a : La nomenclature des marqueurs correspond à celle utilisée pour *B. subtilis* (YOUNG & WILSON, 1975).

a : The nomenclature of markers corresponds to those used for *B. subtilis* (YOUNG & WILSON, 1975).

leur masse moléculaire. Ce point a été vérifié par les expériences d'hybridation moléculaire qui ont aussi indiqué que plusieurs plasmides, rassemblés en 2 catégories de taille (< et > 15 Md), étaient conservés, totalement ou partiellement, au travers des différents sérotypes. Ces premières observations qui ont abouti à établir 2 principaux groupes d'homologie parmi les plasmides, se sont avérées compatibles avec les résultats concernant la localisation du gène du cristal. Le clonage du gène ainsi que les expériences de conjugaison ont en effet montré que le gène codant pour la δ -endotoxine était porté, dans la plupart des souches, par un plasmide appartenant au même groupe d'homologie (celui comprenant les plasmides de masse moléculaire élevée). Le tableau 4 rassemble tous les résultats concernant la localisation des gènes codant pour le cristal protéique, résultats obtenus soit par clonage et hybridation avec le gène cloné, soit par l'examen des schémas extrachromosomiques des souches *Cry*⁻ isolées après avoir provoqué la perte du plasmide porteur du gène, soit enfin à l'issue d'expériences de conjugaison.

Si diverses situations sont donc possibles quant au déterminisme génétique du cristal protéique, la localisation du gène sur un plasmide de masse moléculaire supérieure à 30 Md semble constituer un trait prédominant. En revanche, une localisation unique, sur le chromosome ou sur un plasmide de taille élevée (> 150 Md), n'est observable que dans 2 souches : la souche *dendrolimus* (KLIER *et al.*, 1982) et la souche *entomocidus* puisqu'elle ne semble pas posséder de plasmides. La liste des souches présentant une double localisation du gène n'est pas exhaustive, du fait que celle-ci

n'a pas été recherchée dans tous les cas ; néanmoins il apparaît nettement que le phénomène de double localisation n'est pas exceptionnel ; il s'applique en effet au moins aux 3 souches suivantes : *berliner* 1715, *kurstaki* et *subtoxicus*. Jusqu'à présent, les travaux réalisés sur ces isolats semblent indiquer qu'un seul des 2 gènes (d'origine chromosomique ou plasmidique) puisse s'exprimer après clonage chez *E. coli* ou *B. subtilis*. Les expériences destinées à provoquer la perte d'un plasmide semblent démontrer que, chez *B. thuringiensis*, seul le gène d'origine plasmidique est actif dans les conditions habituelles de croissance (à 30 °C en présence de glucose). Cependant, on peut remarquer que, là encore, le manque de rigueur dans la désignation des souches (principalement au niveau des souches *kurstaki*) crée une certaine ambiguïté dans l'interprétation des résultats et ne permet pas de conclure d'une façon définitive sur ce point précis.

Pour en revenir à la localisation du gène du cristal, 2 autres résultats doivent être soulignés : ils concernent, d'une part, la souche *kurstaki* HD1 Dipel, où le gène serait présent à la fois sur 2 plasmides (tabl. 4) et, d'autre part, une souche *israelensis*, pour laquelle il est suggéré que le gène du cristal est porté par un plasmide de taille nettement inférieure, d'environ 4 Md (FAUST *et al.*, 1983). D'autres auteurs, au contraire, indiquent que dans cette souche le plasmide impliqué a une masse de 72 Md (CARLTON *et al.*, 1982).

Ces 2 observations, ajoutées aux divers types de localisation décrits précédemment, incitent à faire l'hypothèse que la répartition du gène du cristal dans les différents sérotypes

TABLEAU 4

Localisation des gènes codant pour le cristal protéique.
Location of the genes coding for the crystal protein.

H. sérotype	Souches	Plasmides ^a masse en Md	Chromosome	Modes de détermination	Références
1	<i>thuringiensis</i> HD-2	75		Perte provoquée, conjugaison	GONZALEZ <i>et al.</i> (1981, 1982)
	<i>thuringiensis berliner</i> 1715	42		Clonage et expression hétérospécifique	KLIER <i>et al.</i> (1982)
	<i>thuringiensis berliner</i> 22105	56	+	Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	KLIER <i>et al.</i> , (1982)
3a	<i>alesti</i> HD-4	105		Perte provoquée	GONZALEZ <i>et al.</i> (1981)
	<i>alesti</i> HD-4	> 100		Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	WHITELEY <i>et al.</i> (1982)
3a 3b	<i>kurstaki</i> HD-1 (Dipel)	32 et > 100	?	Clonage et expression hétérospécifique	SCHNEPF & WHITELEY (1981)
	<i>kurstaki</i> HD-1	47	—	Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	KLIER <i>et al.</i> (1982)
	<i>kurstaki</i> HD-1	110		Perte provoquée	CARLTON <i>et al.</i> (1982)
	<i>kurstaki</i> HD-73	50		Perte provoquée, conjugaison	GONZALEZ <i>et al.</i> (1981, 1982)
	<i>kurstaki</i> HD-73	56		Clonage et expression hétérospécifique	WHITELEY <i>et al.</i> (1982)
	<i>kurstaki</i> HD-263	44		Perte provoquée, conjugaison	GONZALEZ <i>et al.</i> (1982)
	<i>kurstaki</i> souche ?			Clonage et expression hétérospécifique	HELD <i>et al.</i> (1982)
4a 4b	<i>sotto</i>	33		Clonage et expression hétérospécifique	WHITELEY <i>et al.</i> (1982)
	<i>sotto</i>	40		Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	KLIER <i>et al.</i> (1982)
	<i>dendrolimus</i>	—	+	Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	KLIER <i>et al.</i> (1982)
5a 5b	<i>galleriae</i> HD-8	≈ 130		Perte provoquée	GONZALEZ <i>et al.</i> (1981)
	6 <i>subtoxicus</i>	52 ou 56	+	Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	KLIER <i>et al.</i> (1982)
9	<i>tolworthi</i>	40 à 60		Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	KLIER <i>et al.</i> (1982)
	<i>tolworthi</i>	50		Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	WHITELEY <i>et al.</i> (1982)
10	<i>darmstadiensis</i>	50		Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	WHITELEY <i>et al.</i> (1982)
11a 11b	<i>toumanoffi</i>	> 100		Hybridation avec le fragment d'ADN cloné	WHITELEY <i>et al.</i> (1982)
14	<i>israelensis</i> HD-567	72		Perte provoquée, conjugaison	CARLTON <i>et al.</i> (1982)

Le signe + indique que le gène du cristal est présent sur le chromosome ou, comme le suggèrent KRONSTAD *et al.* (1983), sur un plasmide de masse moléculaire élevée (> 150 Md) non différencié de l'ADN chromosomique.

a : Cette colonne indique la masse moléculaire des plasmides porteurs du gène du cristal.

The sign + indicates that the crystal gene was present on the chromosome or, as suggested by KRONSTAD *et al.* (1983), on a high molecular weight plasmid (> 150 Md) undistinguishable from the chromosomal DNA.

a : This column indicates the molecular weight of plasmids harbouring the crystal gene.

de *B. thuringiensis*, et principalement à l'intérieur d'une même cellule, puisse avoir à son origine un mécanisme de transposition d'ADN faisant intervenir une structure moléculaire assimilable à une séquence d'insertion. Les travaux qui ont abouti à l'isolement, par transposition *in vivo*, d'une séquence d'ADN commune à plusieurs plasmides dont ceux porteurs du gène du cristal (LERECLUS *et al.*, 1983) semblent aussi aller dans le sens d'une telle hypothèse. Sur ce sujet un travail intéressant peut être envisagé pour rechercher s'il existe une relation entre le gène du cristal et une séquence d'insertion et de quel type de relation il s'agit.

D'une façon générale, l'ensemble des recherches réalisées sur la génétique de *B. thuringiensis* offre de larges perspectives tant sur le plan fondamental qu'au niveau appliqué.

L'exploitation des données actuelles sur le déterminisme de la synthèse du cristal protéique et l'utilisation du système de conjugaison convergeront en effet vraisemblablement vers une meilleure connaissance de l'expression et de la régulation du ou des gènes impliqués dans cette synthèse. Le cristal étant une protéine parasporale, c'est donc aussi sur le phénomène simple de différenciation cellulaire qu'est la sporulation que ces recherches pourront apporter des informations intéressantes. On peut bien entendu entrevoir d'autres développements à ces travaux, en particulier sur la fonction des plasmides de cet organisme.

En ce qui concerne les applications de ces recherches, hormis l'utilisation actuelle du cristal des souches *berliner* 1715 et *kurstaki* HD1 contre un nombre limité de

lépitoptères, elles peuvent être réparties en 2 secteurs :

— tout d'abord celui représenté par le cristal protéique de la souche *israelensis*. La δ -endotoxine produite par cette bactérie suscite en effet beaucoup d'intérêt du fait de son activité contre les larves de moustiques, vecteurs des parasites responsables du paludisme, de la fièvre jaune et de l'onchocercose. Le clonage du gène correspondant est entrepris dans de nombreux laboratoires et pourrait permettre, par association avec le gène codant pour les toxines produites par *B. sphaericus* (TINELLI *et al.*, 1980 ; DAVIDSON, 1981), d'élargir le spectre d'activité de ces bactéries contre les moustiques.

— le 2^e secteur résultera de l'élargissement du spectre de toxicité de *B. thuringiensis* en vue d'étendre ses possibilités d'utilisation à d'autres espèces phytophages de grande importance économique à l'échelle mondiale et difficiles à combattre à l'aide des moyens chimiques actuellement disponibles. Il s'agit notamment de ravageurs polyphages appartenant à la famille des *Noctuidae* parmi lesquels il faut distinguer, en tout premier lieu, *Spodoptera littoralis* Boisdu., ravageuse du coton et des légumineuses fourragères dans les régions circum-méditerranéennes, ainsi que *Mamestra brassicae* L. dont les dégâts intéressent un grand nombre de cultures basses en Europe.

En raison de son grand intérêt économique, ce sujet fait actuellement l'objet des préoccupations d'autres chercheurs dont les premiers travaux ont consisté à rechercher des bactéries naturellement actives contre ces insectes. Une souche *aizawai* du sérotype 7 et une souche *entomocidus* du sérotype 6 ont ainsi été dégagées comme produisant un cristal relativement plus actif contre *S. littoralis*, la noctuelle du coton (LUTHY *et al.*, 1982 ; SALAMA & FODA, 1982). L'augmentation du niveau de toxicité du cristal de cette

souche peut alors être envisagée, soit par des procédés biochimiques, soit par voie génétique. Sur ce dernier point, le clonage du gène correspondant pourrait être suivi d'expériences de mutagenèse *in vitro* ou d'une association avec un autre gène dans une même bactérie, cela en vue d'obtenir l'augmentation du niveau de toxicité par modification du cristal ou par effet synergique.

Introduire dans une seule cellule 2 ou plusieurs gènes codant pour des cristaux protéiques dont les toxicités sont complémentaires reviendrait à construire une bactérie présentant un spectre d'activité plus large vis-à-vis des insectes. Il a été en effet récemment montré que l'association, par conjugaison, de 2 plasmides codant pour des cristaux distincts (spécifiques des sérotypes 1 et 3) aboutit à la synthèse de cristaux ayant les caractères antigéniques des 2 souches d'origine (GONZALEZ *et al.*, 1982).

En conclusion, si les importantes perspectives offertes par *B. thuringiensis* sur le plan agronomique ont largement contribué à l'évolution rapide des recherches d'ordre fondamental chez cet organisme et principalement sur le déterminisme de la δ -endotoxine, les résultats obtenus laissent envisager à leur tour non seulement le développement des applications mais aussi celui des recherches menées en amont sur les caractéristiques génétiques de cette bactérie.

Reçu le 6 avril 1983.
Accepté le 26 octobre 1983.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Marguerite-M. LECADÉ et Daniel MARTOURET dont les connaissances sur le sujet ont bien facilité l'élaboration de cette revue. Je suis aussi très reconnaissant envers Danielle LEFEVRE pour son concours sympathique et efficace.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alikhanian S. I., Ryabchenko N. F., Bukanov N. O., Sakanyan V. A., 1981. Transformation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* protoplasts by plasmid pBC16. *J. Bacteriol.*, **146**, 7-9.
- Angus T. A., Norris J. R., 1968. A comparison of the toxicity of some varieties of *Bacillus thuringiensis* Berliner for silkworm larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **11**, 289-295.
- Barjac H. de, 1978. Toxicité de *B. thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles stephensi*. *C. R. Acad. Sci. Paris, sér. D*, **286**, 1175-1178.
- Barjac H. de, 1981. Identification of H. serotype of *Bacillus thuringiensis*, p. 35-43. In : H. D. Burges. *Microbial control of pest and plant diseases*, 1970-1980. Academic Press Inc., New York, 949 p.
- Barjac H. de, Bonnefoi A., 1968. A classification of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.*, **11**, 335-347.
- Bernhard K., Schrempf H., Goebel W., 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **133**, 897-903.
- Bulla L. A. Jr, Kramer K. J., Davidson L. T., 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, **130**, 373-383.
- Bulla L. A. Jr, Davidson L. I., Kramer K. J., Jones B. L., 1979. Purification of the insecticidal toxins from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1123-1130.
- Carlton B. C., Gonzalez J. M. Jr, Brown B. J., 1982. Assignment of delta-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* to specific plasmids by curing and plasmid transfer analyses, p. 68. In : *Abstr. IIIrd Int. Coll. Invertebr. Pathol.*, Brighton (U.K.).
- Chang S., Cohen S. N., 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts. *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111-115.
- Clewell D. B., Yagi Y., Dunny C. M., Schultz S. K., 1974. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.*, **117**, 283-289.
- Davidson E. W., 1981. Bacterial diseases of insect caused by toxin-producing bacilli other than *Bacillus thuringiensis*. p. 269-291. In : E. W. Davidson. *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*. Allanheld, Osmun, Totowa, N. J. 562 p.
- Debabov V. G., Azizbekyan R. R., Khlebalina O. I., D'Yachenko V. V., Galushka F. P., Belykh R. A., 1977. Isolation and preliminary characterization of extrachromosomal elements of *Bacillus thuringiensis* DNA. *Genetika*, **13**, 496-501.
- Farkas J., Sebasta K., Horska K., Samek Z., Doljcs J., Sorm F., 1969. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galechiae*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 1118-1120.
- Faust R. M., Abe K., Held G. A., Iizuka T., Bulla L. A., Meyers C. L., 1983. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid*, **9**, 98-103.
- Glatron M.-F., Rapoport G., 1972. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *Biochimie*, **54**, 1291-1301.
- Glatron M.-F., Lecadet M.-M., Dedonder R., 1972. Structure of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* Berliner; characterization of a repetitive subunit. *Eur. J. Biochem.*, **30**, 330-338.
- Gonzalez J. M. Jr, Carlton B. C., 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, **3**, 92-98.

- Gonzalez J. M. Jr, Dulmage H. T., Carlton B. C., 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, **5**, 351-365.
- Gonzalez J. M. Jr, Carlton B. C., 1982. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*. p. 85-95. In: Streips U. N., Goodgal S. H., Guild W. R., Wilson G. A. *Genetic exchange: a celebration and a new generation*, Dekker, New York.
- Gonzalez J. M. Jr, Brown B. J., Carlton B. C., 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6951-6955.
- Held G. A., Bulla L. A. Jr, Ferrari E., Hoch J., Aronson A. I., Munnich S. A., 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6065-6069.
- Klier A., Lecadet M.-M., Rapoport G., 1978. Transcription *in vitro* of sporulation-specific mRNAs by RNA polymerase from *Bacillus thuringiensis*, p. 205-211. In: Chambliss G. Vary J. C. *Spore VII*, Am. Soc. Microbiol., Wash. D.C., 354 p.
- Klier A. F., Kunst F., Rapoport G., 1979. Structure of cloned ribosomal DNA cistrons from *Bacillus thuringiensis*. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 997-1010.
- Klier A., Fargette F., Ribier J., Rapoport G., 1982. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain *berliner* 1715. *EMBO J.*, **1**, n° 7, 791-799.
- Klier A., Parsot C., Rapoport G., 1983. *In vitro* transcription of the cloned chromosomal crystal gene from *Bacillus thuringiensis*. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 3973-3987.
- Kronstad J. W., Schnepf H. E., Whiteley H. R., 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.*, **154**, 419-428.
- Landen R., Heierson A., Boman H. G., 1981. A phage for generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* and mapping of four genes for antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 49-59.
- Lecadet M.-M., 1970. *Bacillus thuringiensis* toxins. The proteinaceous crystal, p. 437-471. In: Montie T. C., Kadis S., Aijl S. J., *Microbial toxins*, vol. 3, Academic Press Inc., New York., 548 p.
- Lecadet M.-M., Martouret D., 1962. La toxine figurée de *B. thuringiensis*: production enzymatique de substances solubles toxiques par injection. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D*, **254**, 2457-2460.
- Lecadet M.-M., Martouret D., 1967. Enzymatic hydrolysis of the crystal of *B. thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **2**, 322-330.
- Lecadet M.-M., Blondel M.-O., Ribier J., 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715, using bacteriophage CP54 Ber. *J. Gen. Microbiol.*, **121**, 203-212.
- Lecadet M.-M., Barjac H. de, 1981. *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin, p. 293-321. In: Davidson F. W., *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*. Allanheld, Osmun. Totowa, N.J., 562 p.
- Lecadet M.-M., Lereclus D., Blondel M.-O., Ribier J., 1981. *Bacillus thuringiensis*: studies on chromosomal and extrachromosomal DNA, p. 88-92. In: Levinson H. S., Sonenshein A. L., Tipper D. J., *Sporulation and germination*. Am. Soc. Microbiol., Wash. D.C., 317 p.
- Lecadet M.-M., Lereclus D., 1984. Structure and activity of the *B. thuringiensis* δ -endotoxin. Recent development in genetics. In: *Bacterial proteins toxins*, F.E.M.S. Symposium 1983 (sous presse).
- Lereclus D., 1981. *Etude des plasmides de Bacillus thuringiensis et préliminaires à l'élaboration d'un système de transformation chez cette bactérie*. Thèse de 3^e cycle. Univ. Paris VII, 102 p.
- Lereclus D., Lecadet M.-M., Ribier J., Dedonder R., 1982. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 391-398.
- Lereclus D., Menou G., Lecadet M.-M., 1983. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAMB1. *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 307-313.
- Luthy P., Ebersold H. R., 1981. The entomocidal toxins of *B. thuringiensis*, *Pharm. Ther.*, vol. 13, 257-283. Pergamon Press Ltd.
- Luthy P., Jaquet F., Huber-Lukac H. E., Huber-Lukac M., 1982. Physiology of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* including the ultrastructure and histopathological studies. p. 29-36. In: *Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases*. W.H.O., V.B.C., Genève, 188 p.
- Martin P. A. W., Lohr J. R., Dean D. H., 1981. Transformation of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **145**, 980-983.
- Martouret D., 1978. Emplois de *B. thuringiensis*. *Bull. Tech. Inf. Minist. Agric.*, **332-333**, 465-470.
- Miteva V. I., Shivarova N. I., Grigorova R. T., 1981. Transformation of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by plasmid DNA F.E.M.S. *Microbiol. Lett.*, **12**, 253-256.
- Perlak F. J., Mendelsohn C. L., Thorne C. B., 1979. Converting bacteriophage for sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, **140**, 699-706.
- Salama H. S., Foda M. S., 1982. A strain of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* with high potential activity on *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **39**, 110-111.
- Schnepf H. E., Whiteley H. R., 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2893-2897.
- Sebesta K., Horska K., 1970. Mechanisms of inhibition of DNA dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **209**, 357-376.
- Stahly D. P., Dingman D. W., Bulla L. A. Jr, Aronson A. I., 1978. Possible origin and function of the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **84**, 581-588.
- Thorne C. B., 1978. Transduction in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 1109-1115.
- Tinelli R., Barjac H. de, Bourgoïn C., 1980. Isolement d'une fraction de spore de *Bacillus sphaericus* toxique pour les larves d'anophèles. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D*, **291**, 537-539.
- Tyrell D. J., Bulla L. A. Jr, Andrews R. E., Kramer K. J., Davidson L. I., Nordin P., 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Bacteriol.*, **145**, 1052-1062.
- Whiteley H. R., Kronstad J. W., Schnepf H. E., 1982. Cloning the delta toxin gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli* and localization of the gene in different strains of *B. thuringiensis*, p. 147-156 In: *Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases*. W.H.O., V.B.C., Genève, 188 p.
- Wong H. C., Schnepf H. E., Whiteley H. R., 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1960-1967.
- Young F. E., Wilson G. A., 1975. Chromosomal map of *Bacillus subtilis*, p. 596-614. In: P. Gerhardt, R. N. Costilow, H. L. Sadoff. *Spore VI*. Am. Soc. Microbiol., Wash. D.C., 619 p.