Nathalie Bourassa

Étude de la contamination associée à la production *in vivo* du ChfuGV chez *Choristoneura fumiferana*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Dr. Réjean Beaudet, président du jury
Dr. Jean-Charles Côté, examinateur externe
Dr. Claude Guertin, directeur de recherche
Dr. Pierre Juteau, codirecteur de recherche

Septembre 2002
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Institut Armand-Frappier
Université du Québec

© droits réservés de Nathalie Bourassa, 2002

Résumé

Le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) est un entomopathogène dont l'utilisation est envisagée comme bio-insecticide dans la lutte contre les populations de cet insecte, mieux connu sous le nom de tordeuse des bourgeons de l'épinette. Cependant, il n'existe aucune lignée cellulaire permettant sa réplication. En conséquence, la production virale doit se faire *in vivo*, c'est-à-dire en infectant des larves, ce qui entraîne une possibilité de contamination par des micro-organismes opportunistes. Avant l'homologation de ce bio-insecticide, les contaminants microbiens présents dans le produit doivent être connus afin d'évaluer le risque de l'utilisation de ce produit sur la santé humaine.

Le but du projet était de dénombrer et d'identifier les contaminants présents dans différents lots de virus produits en présence ou en absence d'auréomycine, un antibiotique communément utilisé dans l'élevage d'insectes. Le décompte des micro-organismes viables a été effectué sur différents milieux de culture. Un décompte viral en microscopie électronique a également été effectué afin de vérifier l'impact de l'antibiotique utilisé sur la production virale. Les bactéries aérobies retrouvées dans ces différents lots ont été isolées et identifiées à l'aide de techniques de microbiologie traditionnelle et par comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S avec les séquences disponibles dans la littérature. Les principaux mycètes ont également été identifiés par des techniques de microbiologie traditionnelle.

Les deux micro-organismes les plus fréquemment isolés sont *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*, deux bactéries du groupe de risque numéro deux de Santé Canada. Une diminution de la quantité et de la diversité des micro-organismes a été observée lorsque l'antibiotique est ajouté à la nourriture artificielle sans toutefois affecter significativement la production virale. L'auréomycine mène à une diminution de *P. aeruginosa* mais n'a aucun effet sur *B. cereus*. Ces résultats jettent les premières bases à la connaissance de la flore microbienne associée à la production virale *in vivo* chez *C.*

fumiferana et contribueront à la mise en place de procédures de production permettant de réduire la présence de micro-organismes à un niveau acceptable et d'éliminer ceux ayant une incidence sur la santé humaine.

Étudiante

Directeur de recherche

Codirecteur de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Claude Guertin, pour l'opportunité qu'il m'a offerte d'entreprendre ce travail au sein de son équipe ainsi que pour sa rigueur scientifique et son soutien moral. J'aimerais également remercier mon codirecteur de recherche, Pierre Juteau, pour ses judicieux conseils. De plus je voudrais exprimer ma reconnaissance au docteur Abderrazzak Merzouki pour avoir partagé ses connaissances avec moi dans le cadre de ce projet.

Je remercie également le personnel du service de microbiologie appliquée de l'INRS-Institut Armand-Frappier, en particulier monsieur Guy McSween, madame Ginette Denis et monsieur Denis Minville pour leur aide dans l'identification des micro-organismes.

J'aimerais remercier mes collègues de travail qui ont facilité mes deux années au laboratoire par leur aide et leur amitié. Je pense en particulier à André Forté, Annie Bourassa, Josée Leblanc, Michel Fortin, Myriam Jean et Jakub Sawiki. Je tiens à souligner la participation de monsieur Jakub Sawiki pour les photographies et du docteur Michel Fortin pour les analyses statistiques. Merci à tous les deux.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance à la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier reçu tout au long de ce projet.

Finalement je veux remercier ma famille pour leur amour et leur soutien en particulier ma chère mère à qui je dédie ce mémoire.

Table des matières

Résumé ii

Remerciements iv

Table des matières v

Liste des figures ix

Liste des tableaux x

Introduction 1

Chapitre 1 : Revue bibliographique 3

1.1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* (Clem.)) 3
1.1.1 Lutte directe pour contrôler les épidémies de *C. fumiferana* 4
1.1.2 Cycle de vie de *C. fumiferana* 5
1.1.3 Facteurs affectant les populations de *C. fumiferana* 5
1.1.4 Entomopathogènes retrouvés chez *C. fumiferana* 6

1.2 ChfuGV : le granulovirus de *C. fumiferana* 7
1.2.1 Baculovirus 7
1.2.2 Granulovirus 8
1.2.3 Réplication des baculovirus 8
1.2.4 Production virale *in vivo* et contamination 11

1.3 Réglementation gouvernementale concernant les produits antiparasitaires 12
1.3.1 Homologation des produits antiparasitaires microbiens 12
1.3.1.1 Contaminants microbiens 12
1.3.2 Commission internationale pour la définition des caractéristiques microbiennes des aliments 13
1.3.2.1 Normes pour les micro-organismes pathogènes 13
1.3.3 Normes de la Loi canadienne de protection de l'environnement 15

1.4 Identification des micro-organismes 15
1.4.1 Bactéries 15
1.4.1.1 Méthodes utilisant les caractères culturaux, morphologiques, physiologiques et biochimiques 16
1.4.1.2. Méthodes utilisant les caractères chimiotaxinomiques 17
1.4.1.3 Méthodes utilisant les caractères génotypiques et phylogénétiques 17
1.4.2 Mycètes 19
1.4.2.1 Méthodes d'identification utilisant les caractères culturaux et morphologiques 19
1.4.2.2 Autres méthodes 20

1.5 Contamination des préparations virales produites *in vivo* : étude de cas 20

Chapitre 2 : Matériel et méthodes 25

2.1 Production virale 25
2.1.1 Élevage des larves en laboratoire 25
2.1.2 Infection des larves par le ChfuGV 25
2.1.3 Purification virale 26

2.2 Décompte viral et microbien 27
2.2.1 Décompte des particules virales en microscopie électronique 27
2.2.2 Décompte des bactéries aérobies et des mycètes sur milieu de culture gélosé 28
2.2.3 Analyses statistiques 28

2.3 Isolement des colonies bactériennes, coloration et microscopie 29
2.3.1 Isolement des colonies 29
2.3.2 Coloration Gram 29
2.3.3 Test de KOH 30

2.4 Identification des bactéries par l'étude des caractères biochimiques 30
2.4.1 Coques Gram positifs 30
2.4.1.1 Test de catalase 34
2.4.1.2 API Staph 34
2.4.1.3 Test de coagulase 34
2.4.1.4 API 20 Strep 35
2.4.2 Bacilles Gram positifs 35
2.4.2.1 Test de sporulation 35
2.4.2.2 API 50 CH 36
2.4.2.3 API 20E 36
2.4.3 Bacilles Gram négatifs 37
2.4.3.1 Test de l'oxydase 37
2.4.3.2 Fermentation du lactose 37
2.4.3.3 API 20 NE 37
2.4.4 Analyse des résultats à l'aide du logiciel APILAB Plus 38

2.5 Identification des bactéries par le séquençage du gène de l'ARNr 16S 39
2.5.1 Extraction et quantification de l'ADN génomique 39
2.5.2 Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR 40
2.5.3 Digestion enzymatique de l'amplicon 41
2.5.4 Clonage des fragments de PCR pour le séquençage 41
2.5.4.1 Ligation du produit de PCR dans pCR®2.1 42
2.5.4.2 Transformation bactérienne 42
2.5.4.3 Sélection des colonies recombinantes 43
2.5.4.4 Mini-préparation des plasmides 43
2.5.4.5 Digestion enzymatique des plasmides 44

2.5.5 Séquençage du gène de l'ARNr 16S 44
2.5.6 Comparaison avec les banques de données 45

2.6 Identification des champignons microscopiques par l'étude des caractères culturaux et morphologiques 45
2.6.1 Isolement et culture des champignons microscopiques 45
2.6.2 Préparation des lames pour la microscopie 45
2.6.3 Clés d'identification 46

Chapitre 3 : Résultats 47

3.1 Décompte viral 47

3.2 Décompte des micro-organismes viables sur milieu gélosé 47

3.3 Isolement et identification des bactéries par le système API 50
3.3.1 Tests préliminaires et galeries API 50
3.3.2 Confirmation de l'identification 51
3.3.2.1 *Staphylococcus aureus* : test de coagulase 51
3.3.2.2 *Kocuria varians/rosea* : observation de la pigmentation sur milieu de culture 51

3.4 Identification des bactéries par le séquençage du gène de l'ARNr 16S 54
3.4.1 Extraction d'ADN génomique 54
3.4.2 Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR et analyse de restriction des fragments obtenus 54
3.4.3 Clonage et séquençage de l'ADNr 16S 57

3.5 Comparaison des deux méthodes d'identification des bactéries et synthèse des résultats 60
3.5.1 Comparaison des deux méthodes d'identification 60
3.5.2 Synthèse des identifications 69

3.6 Isolement et identification des mycètes 69
3.6.1 Détermination du groupe et du genre 71
3.6.2 Détermination de l'espèce 71

Chapitre 4 : Discussion 75

4.1 Décompte viral 75

4.2 Décompte des micro-organismes 75

4.3 Comparaison des deux techniques d'identification des bactéries 78

4.4 Souches bactériennes isolées 80

4.5 Identification des mycètes 82
4.6 Risques associés à l'utilisation d'un insecticide à base de ChfuGV 84
4.7 Méthodes de contrôle des contaminants 87
Conclusion 89
Liste des références 91
Appendices 102
Appendice A 103
Appendice B 105
Appendice C 108
Appendice D 114
Appendice E 116

Liste des figures

Figure 1 : Granulovirus de *Choristoneura fumiferana* 10

Figure 2 : Clé d'identification des genres de bactéries d'importance médicale (Prescot, Harley et Klein, 1995) 32

Figure 3 : Migration sur gel d'agarose du produit des digestions *Hin*P1I, *Rsa*1 et *Alu*1 du gène de l'ARNr 16S amplifié par PCR pour les 15 différents profils isolés 56

Figure 4 : Bactéries isolées 64

Figure 5 : Structures caractéristiques des trois genres de mycètes identifiés 74

Liste des tableaux

Tableau 1 : Micro-organismes d'importance alimentaire dont la présence est réglementée dans un produit antiparasitaire microbien 14

Tableau 2 : Micro-organismes rencontrés dans des préparations virales produites *in vivo* 22

Tableau 3 : Concentrations de ChfuGV obtenues lors de la production *in vivo* chez les larves de *Choristoneura fumiferana* élevées sur une diète artificielle avec ou sans auréomycine 48

Tableau 4 : Concentrations de micro-organismes viables provenant de broyats de larves nourries sur une diète artificielle avec ou sans antibiotique et ayant ou pas été infectées par le ChfuGV 49

Tableau 5 : Identification par le système API des bactéries isolées dans les préparations de ChfuGV produites *in vivo* 52

Tableau 6 : Homologie de nos séquences de l'ADNr 16S des bactéries isolées avec les séquences de la base de données EMBL 58

Tableau 7 : Comparaison des résultats d'identification obtenus avec le système API et avec la séquence de l'ADNr16S 61

Tableau 8 : Fréquence d'apparition des différentes espèces bactériennes identifiées selon les traitements 70

Tableau 9 : Fréquence d'apparition des différentes espèces mycéliennes identifiées selon les traitements 72

Introduction

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), est l'insecte ravageur le plus important des forêts de conifères d'Amérique du Nord. Chaque année, cet insecte cause des pertes de plusieurs milliers de dollars à l'industrie forestière canadienne (Service canadien des forêts, 2000). Traditionnellement, les insecticides chimiques ont été beaucoup utilisés pour contrôler les populations de la tordeuse. Étant donné les dommages causés à l'environnement par de tels produits (Ecobichon, 1990), de nouvelles alternatives sont nécessaires afin d'obtenir un contrôle des populations tout en respectant l'environnement.

De plus en plus, les entomopathogènes (bactéries, virus, etc.) sont considérés comme des alternatives intéressantes pour remplacer les insecticides chimiques. Le granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (ChfuGV) infecte spécifiquement la tordeuse des bourgeons de l'épinette et son potentiel insecticide contre celle-ci a été démontré antérieurement (Forté *et al.*, 1999; Guertin, 1995). Cependant, ce virus doit être produit *in vivo* puisque aucune lignée cellulaire permettant sa croissance n'est disponible. La production de virus dans les insectes mène inévitablement à un certain niveau de contamination microbien du produit final (Belkosky, 1994 ; Grzywacz *et al.*, 1997 ; Murhammer, 1996 ; Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983). Certains micro-organismes présents dans ce produit peuvent représenter un risque pour la santé humaine, animale et environnementale (Belkosky, 1994 ; Grzywacz *et al.*, 1997 ; Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983). C'est pourquoi, avant l'utilisation dans l'environnement du ChfuGV, des connaissances doivent être acquises sur la nature des contaminants éventuellement présents dans le produit afin qu'aucun micro-organisme représentant un risque pour la santé humaine et animale ne soit répandu.

Ce projet de recherche porte sur le décompte et l'identification des micro-organismes dominants présents dans différentes préparations de ChfuGV produites *in vivo*. L'accent est mis sur l'isolement de bactéries pouvant représenter un risque pour la santé humaine. Deux approches sont utilisées pour l'identification. Il s'agit d'une

approche biochimique basée sur le système API de BioMérieux et d'une approche moléculaire basée sur l'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S des micro-organismes isolés. Une identification des mycètes dominants présents dans nos lots de production est également effectuée par observation microscopique des structures de reproduction.

Cette étude permet d'apporter des connaissances sur les micro-organismes présents dans une suspension virale produite *in vivo* chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette, la littérature sur le sujet étant inexistante. Les résultats obtenus sont la prémisse à l'élaboration de nouvelles méthodes de production menant à l'élimination des contaminants bactériens pouvant nuire à la santé humaine, animale et environnementale, élément essentiel au processus d'homologation d'une formulation insecticide à base du ChfuGV. Finalement, cette étude fait une comparaison entre deux techniques utilisées pour l'identification de micro-organismes provenant d'échantillons d'insectes infectés.

Chapitre 1
Revue bibliographique

1.1 Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* (Clem.))

La tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae), est le plus important défoliateur des peuplements de conifères de l'Amérique du Nord (Royama, 1984). Cet insecte infeste périodiquement de vastes superficies forestières où il provoque des dommages importants pouvant conduire à la mort des arbres.

La distribution géographique de la tordeuse des bourgeons de l'épinette est étroitement liée à celle de ses hôtes préférés, le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.), l'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) et l'épinette rouge (*Picea rubens* Sarg.) (Rose et Lindquist, 1994 ; Talerico, 1984). On la retrouve dans toutes les provinces canadiennes et dans certains états américains (Bonneau *et al.*, 1999). Au Canada, les provinces les plus touchées par les épidémies de tordeuses sont les provinces maritimes, le Québec et l'Ontario (Mattson, Simmons et Witter, 1988).

Quatre épidémies de tordeuses ont marqué le 20e siècle soit celles débutant en 1909, 1938, 1967 et en 1992 (Bérard et Côté, 1996; Bonneau *et al.*, 1999). Lors de l'épidémie de 1967 à 1992, les pertes en matière ligneuse attribuables à la défoliation par la tordeuse ont été estimées à 14 milliards de dollars ou l'équivalent de 10 années d'exploitation (Service canadien des forêts, 2000). Il est maintenant connu que les populations de tordeuses augmentent graduellement pour atteindre un niveau épidémique environ tous les 30 ans. Les épidémies ne sont pas déclenchées par un phénomène unique mais résultent de changements cycliques normaux causés par un ensemble de facteurs (Bonneau *et al.*, 1999).

1.1.1 Lutte directe pour contrôler les épidémies de *C. fumiferana*

Le premier programme de pulvérisation contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette a été effectué en 1949. À cette époque, c'est le DDT (dichlorodiphényltrichloréthane) qui était utilisé comme insecticide (Armstrong, 1985). Les craintes concernant les effets du DDT sur l'environnement et le désir d'obtenir des insecticides plus spécifiques contre l'insecte ont stimulé les recherches sur des produits alternatifs. C'est ainsi que plusieurs produits ont été testés au Canada contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Deux insecticides chimiques ont été développés et largement utilisés soient le fenitrothion (Sumithion, Accothion, Novathion, Folithion) dès 1969 et l'aminocarbe (Matacil) dès 1975 (Armstong, 1985; Ecobichon 1990). Depuis, suite à une controverse sur l'innocuité de ces produits, les études supportant l'homologation de ces deux pesticides ont été déclarées non valides tant aux États-Unis qu'au Canada (Ecobichon, 1990). Cependant, les deux produits ont été utilisés dans les forêts du Nouveau Brunswick jusqu'à la fin des années 80.

Actuellement seuls les insecticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) sont utilisés dans la lutte contre les populations de tordeuses des bourgeons de l'épinette. *Bacillus thuringiensis* est une bactérie aérobie habitant le sol, Gram positive et productrice de spores. Lors de la sporulation chez *B. thuringiensis*, il y a formation d'un corps parasporal appelé δ-endotoxine qui cause la destruction des cellules épithéliales de l'intestin lorsque ingéré par l'insecte menant à une cessation de l'alimentation et éventuellement à la mort de l'insecte (Cunningham, 1985). L'utilisation d'un tel insecticide représente cependant deux risques : i) cette bactérie est toxique non seulement pour la tordeuse des bourgeons de l'épinette mais également pour certains autres lépidoptères (Johnson *et al.*, 1995) et ii) il est possible que l'utilisation d'un seul insecticide mène à l'émergence d'insectes résistants comme c'est le cas chez la teigne des crucifères (*Plutella xylostella*) (Shelton *et al.*, 1993). C'est pourquoi une diversification des moyens de lutte biologique est souhaitable.

1.1.2 Cycle de vie de *C. fumiferana*

La tordeuse des bourgeons de l'épinette est un insecte univoltine puisqu'il ne se reproduit qu'une seule fois par année (Royama, 1984). Les femelles adultes déposent leurs œufs sur la surface inférieure des aiguilles de leurs hôtes vers la fin juillet ou le début août. Après une période de 10 à 14 jours, les larves du premier stade émergent et se tissent un abri, appelé hibernaculum, à l'intérieur duquel elle passeront l'hiver sous la forme de deuxième stade. Vers la fin avril ou le début mai, les larves sortent de leur hibernation et s'alimentent en minant les aiguilles des années précédentes. Aussitôt les bourgeons ouverts, les larves se dirigent vers les jeunes aiguilles, s'y alimentent et subissent plusieurs mues jusqu'à leur sixième et dernier stade, vers la fin juin. Les larves de 5e et de 6e stades sont responsables de 85% de la défoliation. Au début juillet, les larves se transforment en chrysalides et, après une période de 8 à 10 jours, les papillons émergent. On retrouve des papillons de la mi-juin à la mi-août et ceux-ci ne vivent en moyenne que deux semaines, le temps de l'accouplement et de la ponte (Bonneau *et al.*, 1999 ; Mattson, Simmons et Witter, 1988 ; Royama, 1984; Talerico, 1984).

1.1.3 Facteurs affectant les populations de *C. fumiferana*

Certains facteurs peuvent influencer la dynamique des populations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Par exemple, le climat, lorsqu'il est chaud et sec, favorise le développement des larves. L'abondance et la qualité de la nourriture ont aussi une influence sur la croissance des larves. Talerico (1984) et Blais (1985) ont montré que les larves de *C. fumiferana* se développent mieux lorsque les peuplements sont matures et lorsque la floraison est abondante. D'autres facteurs comme les parasites et les entomopathogènes ou encore la prédation par les araignées et les oiseaux peuvent contrôler, jusqu'à un certain niveau, les populations de tordeuses. Cependant, en période épidémique, la capacité reproductive de l'insecte est trop élevée et les facteurs biotiques naturels n'arrivent plus à contrôler les populations (Mattson, Simmons et Witter, 1988 ; Talerico, 1984).

1.1.4 Entomopathogènes retrouvés chez *C. fumiferana*

Parmi les pathogènes de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, on retrouve certains mycètes Entomophtorales comme *Conidiobolus*, *Erynia* et *Entomophaga* qui peuvent causer des épizooties. Les deux espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Entomophaga aulicae* et *Erynia radicans* (Cunningham, 1985). Les champignons imparfaits tels que *Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, et *Metarrhizium* ont un rôle moins important dans la dynamique des populations (Talerico, 1984).

Nosema fumiferana, une microsporidie, est le protozoaire retrouvé le plus fréquemment chez *C. fumiferana*. Ce protozoaire infecte la tordeuse des bourgeons de l'épinette à tous les stades, réduisant la fécondité des insectes adultes et causant parfois la mort des larves. *Pleistophora schubergi* et *Thelohania* spp. sont moins fréquemment rencontrés (Talerico, 1984).

Plusieurs bactéries sont présentes dans les populations de tordeuses des bourgeons de l'épinette. Parmi celles-ci, une espèce appartenant au genre *Bacillus* soit *B. thuringiensis* cause une mortalité dans les populations de *C. fumiferana*. Cette espèce infecte naturellement les insectes à partir du deuxième stade larvaire jusqu'au stade de chrysalide (Strongman *et al.*, 1997).

Quatre virus ont été isolés dans les populations naturelles de *C. fumiferana* soient un nucléopolyédrovirus (CfNPV), un entomopoxvirus (CfEPV), un cypovirus (CfCPV) et un granulovirus (ChfuGV) (Cunningham, 1985).

Dans le but de développer un biocide alternatif et complémentaire au B.t., le potentiel de certains pathogènes de *C. fumiferana* a été étudié. Entre autres, le ChfuGV est un granulovirus dont le potentiel comme outil de lutte biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette a déjà été démontré (Forté *et al.*, 1999; Guertin, 1995) et dont l'utilisation comme moyen biologique pour contrôler les populations est envisagée.

1.2 ChfuGV : le granulovirus de *C. fumiferana*

Des études ont clairement démontré le potentiel insecticide du ChfuGV, qui se compare avantageusement à *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Forté *et al.*, 1999; Guertin, 1995). De plus, sa spécificité à l'hôte lui confère un avantage par rapport au Bt. Aucune étude n'a été réalisée sur la résistance de la tordeuse au ChfuGV. Cependant, on peut supposer que, puisque l'action du virus n'est pas due à une toxine comme dans le cas du Bt, les risques de résistance sont moins élevés. Le ChfuGV est retrouvé naturellement dans les populations de tordeuses (Bird, 1959), donc son utilisation en lutte biologique n'entraînera pas l'ajout d'une nouvelle espèce dans l'écosystème. C'est ce qu'on appelle l'approche augmentative, c'est-à-dire l'augmentation du nombre d'individus d'une espèce déjà présente dans le milieu. La présence du corps d'inclusion chez ChfuGV permet aux particules virales de demeurer viables longtemps dans l'environnement (Rohrmann, 1992) permettant ainsi la propagation de l'infection.

1.2.1 Baculovirus

Le ChfuGV est membre de la famille des *Baculoviridae*, une famille de virus pathogènes pour plus de 600 espèces d'arthropodes (Blissard et Rohrmann, 1990). Chaque espèce de baculovirus n'infecte normalement qu'un ou quelques hôtes étroitement apparentés et est nommé selon le nom de son hôte principal (Tanada et Hess, 1991). Certaines formulations à base de baculovirus sont homologuées comme insecticides biologiques au Canada. C'est le cas, notamment du Lecontvirus contre le diprion de Leconte (*Neodiprion lecontei* (Fitch.)), et du Disparâ contre la spongieuse (*Lymantria dispar* (L.)) (Service canadien des forêts, 2002).

Les *Baculoviridae* sont caractérisés par un large génome d'ADN double brin circulaire et super enroulé compris à l'intérieur d'une nucléocapside enveloppée de lipoprotéines. Les virions sont inclus dans une matrice de protéines cristallines, le corps d'inclusion, qui entoure et protège l'ADN viral contre les conditions environnementales, comme par exemple les rayons UV. La famille des *Baculoviridae* se divise en deux

genres, les nucléopolyédrovirus (NPV) et les granulovirus (GV), dont fait partie le ChfuGV (Blissard, 1996).

1.2.2 Granulovirus

Chez les granulovirus, une seule nucléocapside est présente par corps d'inclusion contrairement aux nucléopolyédrovirus où on peut en retrouver jusqu'à 100 (Kelly, 1982). Les granulovirus inclus sont de forme ovocylindrique et ont une dimension de 300 à 500 nm de longueur par 120 à 350 nm de largeur. L'enveloppe est composée de trois couches protéiques et la capside est formée de sous-unités protéiques assemblées en anneaux imbriqués les uns sur les autres (figure 1).

1.2.3 Réplication des baculovirus

Le cycle infectieux du virus chez l'insecte est biphasique c'est-à-dire qu'il se divise en deux parties (Consigli, Russel et Wilson, 1986). L'infection primaire est initiée lorsque l'insecte ingère le virus compris dans un corps d'inclusion. Dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'insecte, le corps d'inclusion est dissout ce qui libère la nucléocapside enveloppée. Suite à cette étape, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane des cellules épithéliales de l'intestin moyen et la nucléocapside est relâchée dans le cytoplasme. Grâce à un mécanisme impliquant les microtubules, la nucléocapside est dirigée vers le noyau et s'attache sur les pores nucléaires pour l'insertion de l'ADN viral dans le noyau (Tanada et Hess, 1991). C'est à cet endroit qu'aura lieu la réplication du virus. La phase précoce de la réplication est assurée par l'ARN polymérase II de la cellule hôte et mène à la formation des protéines nécessaires à l'initiation de la phase tardive de la réplication. Lors de la phase tardive, les protéines structurales sont produites et il y a assemblage des virions non inclus. Ces particules virales, vont sortir par bourgeonnement du côté basal des cellules épithéliales de l'intestin pour se diriger vers l'hémolymphe de l'insecte.

Figure 1 : Granulovirus de *Choristoneura fumiferana*

Photographie prise en microscopie électronique, du granulovirus de *Choristoneura fumiferana* (agrandissement : 200 000 X)

Lors de l'infection secondaire, les particules virales vont se diriger vers d'autres organes comme les corps gras, la trachée ou l'épiderme (Vincent, 2000). Cette fois, l'entrée des virions dans la cellule se fait par endocytose (Charlton et Volkman, 1993). La fusion de l'enveloppe virale et de l'endosome permet l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme. Suite à cette étape, l'ADN viral sera injecté dans le noyau et la réplication aura lieu. Au cours de ce processus, la granuline est produite en grande quantité et des virus inclus sont formés. L'infection secondaire se termine par la mort de l'insecte et par la libération des virus inclus dans l'environnement (Consigli, Russel et Wilson, 1986).

1.2.4 Production virale *in vivo* et contamination

Puisqu'il n'existe pas de lignée cellulaire permettant sa réplication, le ChfuGV doit être produit *in vivo* c'est-à-dire en infectant des larves de *C. fumiferana* élevées en laboratoire. Les larves sont déposées sur une nourriture artificielle, jusqu'au quatrième stade larvaire. Elles sont par la suite exposées au virus pendant une période de temps permettant à l'infection d'avoir lieu. Les larves sont par la suite récoltées et homogénéisées avant que le produit soit réduit en poudre pour son utilisation dans l'environnement. Ce processus implique un grand nombre de manipulations qui ne sont pas faites en milieu stérile. Ceci, en plus de la microflore de l'insecte et de la nourriture artificielle qui n'est pas stérile, mène à une contamination microbienne du produit final tel qu'il a été démontré chez d'autres baculovirus (Murhammer, 1996; Sikorowski et Lawrence, 1994). Pour éviter la présence de tels contaminants, différentes méthodes ont été testées. On peut penser à l'utilisation d'antibiotiques (Grisdale et Wilson, 1993), de produits antifongiques, à la centrifugation de la suspension virale ou à la récolte des larves vivantes seulement (Grzywacz *et al.*, 1997). Dans l'élevage de *C. fumiferana*, il est courant d'utiliser un antibiotique, l'auréomycine, ajouté à la nourriture artificielle (Grisdale et Wilson, 1993). Cet antibiotique appartient à la famille des tétracyclines et a un effet bactériostatique sur certaines bactéries en inhibant la synthèse protéique. Il agit sur plusieurs bactéries incluant les Gram positives et Gram négatives. Il est particulièrement utilisé contre les bactéries fréquemment retrouvées à la surface de la peau chez les humains (Banque de données automatisée sur les médicaments, 2000).

1.3 Réglementation gouvernementale concernant les produits antiparasitaires

L'emploi d'agents antiparasitaires microbiens relève de la *Loi sur les produits antiparasitaires* (LPA) et de son règlement ainsi que de la *Loi sur les aliments et les drogues* (LAD) et de son règlement. L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) est sous la responsabilité de Santé Canada et est responsable de l'application de la LPA (Santé Canada, 2001). Un agent antiparasitaire microbien est une matière active ou une entité microbienne (bactérie, algue, champignon microscopique, protozoaire, virus, mycoplasme, rickettsie ou un organisme apparenté) ayant des qualités insecticides qui peut être utilisé pour contrôler des populations d'insectes (Agriculture et Agro-alimentaire Canada, 1993). La LPA et la LAD stipulent que tous les pesticides, incluant les produits antiparasitaires microbiens et leurs préparations commerciales, doivent être homologués avant leur utilisation ou leur vente au Canada. C'est à l'ARLA qu'incombe la tâche d'examiner les demandes d'homologations de tout nouveau pesticide et qui en fait l'évaluation avant d'en approuver l'usage.

1.3.1 Homologation des produits antiparasitaires microbiens

Le document intitulé *Directives sur l'homologation des agents antiparasitaires microbiens et de leurs produits* (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2001) a été publié pour faciliter les demandes d'homologation des bio-pesticides. Pour faire homologuer un produit antiparasitaire microbien, le demandeur doit fournir plusieurs renseignements, entre autres : les caractéristiques du produit, son origine, son pouvoir infectieux et sa toxicité, sa stabilité, son devenir dans l'environnement et la présence d'ingrédients occasionnels. Parmi les ingrédients occasionnels, on retrouve, entre autres, les contaminants microbiens, les toxines microbiennes et les autres métabolites des micro-organismes.

1.3.1.1 Contaminants microbiens

Tout produit antiparasitaire microbien doit être exempt de micro-organismes pathogènes pour les humains ou les animaux tels que définis par la Commission

internationale pour la définition des caractéristiques microbiennes des aliments (ICMSF) (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 1998). Pour ces contaminants, l'ARLA recommande l'application des normes internationales fixées par l'ICMSF. Pour les micro-organismes non pathogènes, aucune limite ferme n'est établie. Ceux-ci sont acceptables mais seulement à une concentration qui ne va pas affecter la stabilité ou la performance du produit ce qui est établi séparément pour chaque produit.

1.3.2 Commission internationale pour la définition des caractéristiques microbiennes des aliments

La Commission internationale pour la définition des caractéristiques microbiennes des aliments (ICMSF) est une agence dont le but est de fournir des lignes directrices aux gouvernements et aux industries concernant la sécurité microbiologique des aliments (International commission on microbiological specification for foods, 2001). Celle-ci publie plusieurs documents pouvant servir de référence dans l'évaluation microbiologique des aliments. Entre autre, l'ARLA recommande de se rapporter aux deux ouvrages suivants pour l'évaluation microbiologique des produits antiparasitaires microbiens : *Microorganisms in foods : Their significance and methods of enumeration* (International commission on microbiological specification for foods, 1978) et *Microorganisms in foods : Vol. 2. Sampling for Microbiological Analysis : Principles and Specific Applications* (International commission on microbiological specification for foods, 1986). Ces ouvrages de référence déterminent les limites microbiologiques pour différents produits alimentaires incluant les boissons, viandes, fromages, etc. et peuvent êtres adaptés pour convenir à l'évaluation des produits microbiens.

1.3.2.1 Normes pour les micro-organismes pathogènes

Le tableau 1 présente les pathogènes alimentaires les plus courants (International commission on microbiological specification for foods, 1978; International commission on microbiological specification for foods, 1986). Leur absence doit être vérifiée dans un produit antiparasitaire dont la composition réelle est inconnue avant son utilisation dans l'environnement.

Tableau 1 : Micro-organismes d'importance alimentaire dont la présence est réglementée dans un produit antiparasitaire microbien

Micro-organisme	Infection causée
Aeromonas sp.	Gastro-entérite et autres maladies
Bacillus anthracis	Maladie du charbon
Bacillus cereus	Infection alimentaire de type émétique ou diarrhéique
Brucella spp.	Fièvre ondulante
Clostridium botulinum	Botulisme
Clostridium perfringens	Intoxication alimentaire et gangrène gazeuse
Coxiella burnetii	Fièvre Q
Enterococcus faecalis	Empoisonnement alimentaire
Enterococcus faecium	Empoisonnement alimentaire
E.coli entérotoxique	Diarrhée du voyageur
E.coli entéropathogène	Diarrhée infantile
E.coli entérohémorragique	Colite hémorragique
E.coli entéroinvasif	Dysenterie bacillaire
Francisella tularensis	Tularémie
Listeria monocytogenes	Listériose
Mycobacterium bovis	Tuberculose
Proteus spp.	Empoisonnement alimentaire
Pseudomonas aeruginosa	Empoisonnement alimentaire
Salmonella typhi	Fièvre typhoïde
Salmonella typhimurium	Infection entérique
Shigella dysenteriae	Dysenterie bacillaire
Staphylococcus aureus	Empoisonnement alimentaire
Vibrio cholerae	Choléra
Vibrio parahaemolyticus	Gastro-entérite
Yersinia enterolitica	Gastro-entérite
Yersinia pseudotuberculosis	Gastro-entérite

1.3.3 Normes de la Loi canadienne de protection de l'environnement

Puisqu'ils sont soumis à la *Loi sur les produits antiparasitaires* et à la *Loi sur les aliments et les drogues*, les produits antiparasitaires microbiens ne sont pas soumis à la loi canadienne de protection de l'environnement. Cependant, à titre indicatif, les micro-organismes qui ne doivent pas être présents dans les produits microbiens soumis à cette loi sont mentionnés ici : *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes, Vibrio, Campylobacter, Clostridium* spp., *Bacillus anthracis, Pseudomonas aeruginosa, Yersinia* spp., *Candida albicans, Aspergillus fumigatus,* les coliformes fécaux et les entérocoques fécaux (Gouvernement du Canada, 1997).

1.4 Identification des micro-organismes

L'identification des organismes vivants fait partie d'une science plus large appelée la taxinomie ou systématique. Celle-ci est la science de la classification biologique et regroupe la classification, la nomenclature et l'identification (Prescot, Harley et Klein, 1995). Les micro-organismes ont longtemps été classifiés selon leurs caractères physiologiques et morphologiques mais la comparaison directe du matériel génétique et des produits de gènes a permis de développer des outils de classification basés sur une relation évolutive plutôt que sur une ressemblance générale. Ces techniques ont clairement démontré que la vie se divise en trois lignes de descendants soient les domaines *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Woese, Kandler et Wheelis, 1990).

1.4.1 Bactéries

Les bactéries sont des procaryotes des domaines *Bacteria* et *Archaea*. Parmi les méthodes d'identification des bactéries on retrouve les méthodes utilisant les caractères culturaux, morphologiques, physiologiques, biochimiques, sérologiques et les tests d'inhibition, les méthodes utilisant les caractères chimiotaxinomiques et les méthodes utilisant les caractères génotypiques et phylogénétiques (Busse, Denner et Lubitz, 1996). La classification phénotypique des procaryotes est retrouvée dans le *Bergey's Manual of*

Systematic Bacteriology (Holt, 1984-1989) et est encore largement utilisée dans l'identification de souches bactériennes. Puisque la systématique bactérienne est principalement basée sur les caractères morphologiques et physiologiques, les résultats phylogénétiques basés sur l'ARN ribosomal ont souvent été en contradiction avec les arrangements taxinomiques. Certains membres d'un taxon sont en réalité moins reliés entre eux qu'avec certains membres d'un autre taxon (Busse, Denner et Lubitz, 1996). Suite aux études phylogénétiques, plusieurs branches de descendants du domaine *Bacteria* ont été décrites.

1.4.1.1 Méthodes utilisant les caractères culturaux, morphologiques, physiologiques et biochimiques

Malgré l'apparition de nouvelles techniques moléculaires d'identification, les méthodes d'identification traditionnelles sont encore valables et souvent utilisées. L'identification par les méthodes de microbiologie traditionnelle débute par l'étude des caractères culturaux comme la morphologie et la couleur des colonies sur différents milieux et par l'étude des caractères morphologiques comme la forme et la dimension des cellules, la présence de flagelles, la coloration Gram ou la présence de spores. Les caractères physiologiques incluent entre autres la température ou le pH permettant la croissance et la tolérance à certaines concentrations salines. Les caractéristiques biochimiques regroupent le profil enzymatique, l'oxydation ou la fermentation des hydrates de carbone et l'utilisation de différentes sources de carbone (Prescott, Harley et Klein, 1995). Étant donné que ces tests sont souvent laborieux, plusieurs compagnies offrent des trousses d'identification basées sur les caractères biochimiques notamment les systèmes API et Vitek de BioMérieux, le système crystal E/NF de Becton Dickinson (Robinson, McCarter et Tetreault, 1995) ou le système Biolog de la compagnie du même nom (Holmes *et al.*, 1994).

Malgré leur apparente facilité, les techniques d'identification traditionnelles représentent une grande quantité de travail et les résultats sont souvent difficiles à interpréter. De plus, les profils de réactions peuvent différer selon le temps d'incubation, la quantité d'inoculum, la présence de plasmides ou l'âge de la souche. Ces tests sont

surtout conçus pour des souches cliniques et peuvent représenter une difficulté pour des souches environnementales ou ayant subi des modifications phénotypiques (Busse, Denner et Lubitz, 1996).

1.4.1.2 Méthodes utilisant les caractères chimiotaxinomiques

La chimiotaxinomie est définie comme étant l'étude des variations chimiques dans les organismes vivants et l'utilisation des caractères chimiques dans la classification et l'identification (Hardie, 1989). En effet, les bactéries synthétisent plusieurs molécules qui peuvent être analysées et comparées avec des souches de références pour permettre l'identification. Parmi celles-ci on peut nommer les acides gras, constituants de la membrane cellulaire ou le système des quinones qui joue un rôle important dans le transport d'électrons (Hardie, 1989). Cependant, ces méthodes doivent souvent être couplées à des analyses biochimiques ou à d'autres études chimiotaxonomiques et la présence de certains constituants cellulaires est sujette à des changements selon la température de croissance, le milieu de culture utilisé ou la phase de croissance de la bactérie rendant l'analyse des résultats parfois compliquée (Busse, Denner et Lubitz, 1996).

1.4.1.3 Méthodes utilisant les caractères génotypiques et phylogénétiques

Depuis le développement des techniques moléculaires, il est possible d'examiner les caractéristiques du génome des bactéries et de déduire des relations phylogénétiques entre les différents micro-organismes. L'analyse de l'ADN génomique par le polymorphisme de longueur de fragments de restriction est surtout utilisée pour différencier deux espèces d'un même genre ou deux souches d'une même espèce. Cette technique requiert la digestion de l'ADN génomique par une endonucléase de restriction et les fragments résultants sont séparés par électrophorèse pour la comparaison du patron de restriction entre deux isolats. Cette technique peut également être appliquée à un gène en particulier, par exemple, le gène de l'ARNr 16S, pour la différentiation de deux espèces rapprochées. Pour cette utilisation, il est recommandé d'utiliser au moins trois enzymes différentes afin de bien discriminer entre deux isolats très rapprochés (Massol-

Deya *et al.*, 1995). Les méthodes d'hybridation avec des sondes d'ADN sont utilisées principalement pour la détection de micro-organismes dans des échantillons cliniques. Les sondes utilisées sont hautement spécifiques et dirigées vers un gène en particulier dont la séquence est connue. Le polymorphisme d'amplification aléatoire est également utilisé pour différencier deux isolats très similaires. Le principe est basé sur l'utilisation d'une amorce arbitraire pour amplifier des fragments du génome.

Les principales techniques d'identification impliquant des caractères phylogénétiques sont l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (ARNr 16S). La première méthode est utilisée pour la classification d'une souche au niveau de l'espèce. Une similarité de l'ADN de 70% indique une relation au niveau de l'espèce et une similarité située entre 20% et 60% indique une relation au niveau du genre (Busse, Denner et Lubitz, 1996).

Présentement, la majorité des études phylogénétiques sont basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S (ADNr 16S) et plusieurs séquences d'ADNr sont maintenant répertoriées. Bien que la meilleure indication de la relation entre deux organismes reste l'hybridation ADN-ADN, le séquençage du gène de l'ARNr 16S offre également de bonnes indications dans la majorité des cas. De plus, la disponibilité et le coût de moins en moins élevé offert par le séquençage automatique rend cette option intéressante pour l'identification de bactéries. L'ADNr 16S a une longueur d'environ 1500 paires de bases et est composé de séquences hautement conservées et aussi de séquences hautement variables. Ce sont les séquences conservées qui permettent l'élaboration d'amorces universelles et l'amplification par PCR du gène chez toutes les bactéries. Le séquençage du gène et la comparaison avec des banques de données répertoriant les séquences d'ADNr 16S connues donnent de bonnes indications quant à l'identité d'une souche donnée. Il est généralement accepté qu'une homologie supérieure à 97,5% de la séquence de l'ADNr 16S correspond à une homologie de l'ADN chromosomique de 70% (relation au niveau de l'espèce). Cependant, pour certains organismes, il a été démontré qu'une homologie de l'ADNr 16S pouvant atteindre 100% correspondait à une valeur d'hybridation ADN-ADN inférieure à 70% (Stackebrandt et

Goebel, 1994). Il convient donc d'être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus par le séquençage de l'ADNr 16S.

1.4.2 Mycètes

Les mycètes sont des organismes eucaryotes du domaine *Eucarya*, porteurs de spores, qui se nourrissent par absorption, qui sont dépourvus de chlorophylle et se reproduisent de façon sexuée et asexuée. Ceux-ci sont divisés en quatre embranchements selon les modalités de leur reproduction sexuée: les Zygomycota, les Ascomycota, les Basidiomycota et les Deuteromycota (Prescot, Harley et Klein, 1995).

1.4.2.1 Méthodes d'identification utilisant les caractères culturaux et morphologiques

L'identification des moisissures fait rarement appel à des caractères biochimiques. Les mycologues utilisent des clés d'identifications faisant appel à des caractères culturaux et morphologiques. Les principaux caractères culturaux observés sont la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et la présence d'un pigment diffusible, l'odeur et la présence d'exsudat. Ces caractères sont différents sur chaque milieu de culture et nécessitent souvent l'utilisation de milieux standardisés (Botton *et al.*, 1990).

En plus de l'observation des caractères culturaux, l'identification des mycètes se fait principalement par examen microscopique. Les caractéristiques du mycélium notamment sa largeur, l'absence ou la présence de cloison, l'ornementation des parois, le mode de ramification et la différentiation des thallospores doivent être notées avec précision. Les caractéristiques des structures différentiées sont d'une importance encore plus grande étant donné que celles-ci permettent l'identification d'un isolat au niveau du genre et de l'espèce. Ces caractéristiques incluent la nature de ces organes : zygospores, apothécies, cléistothèques, périthèces, sporocystes, acervules, pycnides et autres, leur forme, leur couleur, leur dimension, la texture des parois et l'ornementation. De plus, les dimensions des spores et des organes sporogènes doivent être utilisées (Botton *et al.*, 1990).

1.4.2.2 Autres méthodes

L'identification des mycètes est souvent difficile étant donné qu'il peut être parfois impossible d'obtenir des spécimens présentant les structures permettant l'identification. Parmi les techniques alternatives pouvant servir à l'identification des moisissures, mentionnons la détection d'enzymes spécifiques, l'utilisation de sondes d'ADN, les essais immunologiques, l'analyse des protéines sur SDS-PAGE et le séquençage de gènes notamment le gène de la petite sous-unité ribosomale (ARNr 18S) (Busse, Denner et Lubitz, 1996).

1.5 Contamination des préparations virales produites *in vivo* : étude de cas

Quelques publications mentionnent la présence de contaminants dans différentes préparations de Baculovirus produites *in vivo* chez des insectes de laboratoire. Cependant, parmi celles-ci, très peu font une étude détaillée de la nature des contaminants retrouvés (Ignoffo et Shapiro, 1978 ; Shapiro *et al.*, 1981). De plus, jusqu'à maintenant, aucune publication ne traite des contaminants microbiens présents dans des préparations de ChfuGV produites dans les arves de *Choristoneura fumiferana* ou de la microflore de cet insecte en laboratoire. Ceci rend notre étude extrêmement pertinente puisque cette information est essentielle pour l'homologation d'un insecticide à base de ChfuGV. Quelques études ont cependant été effectuées concernant les contaminants microbiens de produits viraux obtenus à partir de différents insectes.

Une évaluation quantitative et qualitative de la contamination microbienne de différents lots de NPV de la spongieuse, un insecte ravageur des forêts de feuillus au Canada et aux États-Unis, a été effectuée (Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983). Les méthodes de détection, d'énumération et d'identification des contaminants sont des méthodes de microbiologie traditionnelle c'est-à-dire le décompte des micro-organismes viables sur gélose et l'identification par des tests biochimiques miniaturisés (galerie API). Le Service Canadien des Forêts a également effectué une étude sur les contaminants microbiens du NPV de la spongieuse produit *in vivo* (Belkosky, 1994). Un décompte des

bactéries aérobies et des bactéries sporulantes a été effectué sur TSA (tryptic soy agar). Les pathogènes ont été détectés sur des milieux sélectifs et l'identification finale a été faite avec des tests biochimiques miniaturisés (galeries API).

Une seule étude a été publiée sur les contaminants dans une préparation de NPV chez des larves de vers du cotonnier (Grzywacz *et al.*, 1997). Le décompte des micro-organismes aérobies et anaérobies a été effectué sur gélose nutritive et les pathogènes ont été détectés suivant des techniques traditionnelles pour *Salmonella*, *Shigella*, les entérobactéries, *Staphylococcus*, *Bacillus* et les mycètes. L'identification à l'espèce a été faite sur des galeries API. Le décompte des micro-organismes les plus souvent rencontrés à différentes étapes du processus de production soit après la première filtration, après la première centrifugation et après la centrifugation finale a également été effectué.

Dans des préparations virales produites *in vivo* dans des larves d'insectes, les concentrations moyennes de micro-organismes trouvées étaient de $2{,}49 \times 10^7$ CFU/ml (Grzywacz *et al.*, 1997), $5{,}97 \times 10^8$ CFU/g (Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983) et de 6.09×10^9 CFU/g (Belkosky, 1994). Dans les trois cas, les résultats sont très variables d'un lot à l'autre (écart-types de $5{,}98 \times 10^6$ CFU/g à $1{,}08 \times 10^{10}$ CFU/g). Les identifications effectuées sont résumées au tableau 2. Dans les trois cas, des bactéries appartenant à la liste de l'ARLA ont été retrouvées soient *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus facium* et *Pseudomonas* sp.. Parmi ces espèces, *B. cereus* est le micro-organisme le plus fréquemment rencontré. Cette bactérie souvent retrouvée au niveau du sol est un pathogène pour plusieurs insectes (Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983 ; Strongman *et al.*, 1997) et est fréquemment retrouvée chez des insectes morts ou vivants (Inglis, Lawrence et Davis, 2000) ce qui explique sa présence. Cependant, comme elle a été impliquée dans plusieurs cas d'empoisonnement alimentaire, sa présence dans le produit viral est indésirable et les trois auteurs s'accordent pour mentionner qu'elle doit être sévèrement contrôlée dans une production industrielle de virus *in vivo*. La bactérie *E. faecalis* est également retrouvée dans les trois cas. Cette bactérie qui est retrouvée fréquemment chez les insectes (Eaves et Mundt, 1960 ; Inglis, Lawrence et Davis, 2000 ; Martin et Mundt, 1972 ; Miller et Miller, 1996) était attendue parmi les espèces

Tableau 2 : Micro-organismes rencontrés dans des préparations virales produites *in vivo*

Micro-organisme	**Ver du cotonnier** (Grzywacz *et al.*, 1997)	**Spongieuse** (Belkosky, 1994)	**Spongieuse** (Podgwaite, Bruen et Shapiro., 1983)
Acetobacter spp.	-	+	-
Acinetobacter calcoaceticus var. *anitratum*	+	++	+
Actinomyces israli	+	-	-
Actinomyces naeslundii	-	-	+
Actinomyces spp.	-	+	-
Aspergillus niger	-	-	+
Bacillus cereus	+++	+++	+++
Bacillus coagulans	-	-	+
Bacillus licheniformis	-	-	++
Bacillus macerans	-	-	+
Bacillus mycoides	+	-	-
Bacillus subtilis	-	+++	+
Bacillus sphaericus	+++	-	-
Citrobacter freundii	+	-	-
Chromobacterium spp.	-	+	-
Clostridium spp.	+	-	-
Enterobacter agglomerans	-	-	+
Enterobacter cloacae	-	+	-
Enterobacter sakazakii	+	-	-
Enterococcus faecalis	+++	-	++
Enterococcus faecalis var. *liquefaciens*	-	+++	+
Enterococcus faecium	+	-	+
Klebsiella oxytoca	+	-	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	-
Micrococcus luteus	-	+	+
Moraxella nonliquefaciens	-	+	-
Pseudomonas cepacia	-	+++	-
Pseudomonas fluorescens grp.	-	+	+
Pseudomonas pseudomallei	-	-	+
Pseudomonas spp.	-	-	+
Rodotorula spp.	-	-	+
Serratia liquefaciens	-	+	+
Staphylococcus capitis	-	+	-
Staphylococcus epidermidis	+	++	++
Streptococcus durans	-	-	+
Torulopsis maris	+	-	-

- = non retrouvé, + = fréquence < 30%, ++ = fréquence 30% >< 70%, +++ = fréquence > 70%

identifiées. Sa présence chez les insectes pousse les auteurs à croire que la source de *E. faecalis* n'est pas d'origine fécale.

Parmi les espèces fréquemment retrouvées, mentionnons *Staphylococcus epidermidis* qui a été retrouvée dans les trois études. Puisque cette bactérie est fréquemment retrouvée à la surface de la peau chez les humains, il est probable qu'elle provienne des manipulateurs (Sikorowski et Lawrence, 1994). *Bacillus subtilis* est retrouvé chez les préparations de spongieuse (Belkosky, 1994; Podgwaite, Bruen et Shapiro., 1983) mais pas dans les préparations de ver du cotonnier. Chez ce dernier, en plus de *B. cereus* et de *E. faecalis*, on retrouve fréquemment *Bacillus sphaericus*.

Belkosky (1994) présente des résultats préliminaires du décompte de bactéries à partir des constituants de la nourriture artificielle de la spongieuse. Des bactéries ont été isolées à partir du germe de blé, de l'eau, de la caséine et de l'agar utilisés dans la préparation de la nourriture. Ces quatre ingrédients entrent également dans la composition de la nourriture artificielle utilisée dans l'élevage de *Choristoneura fumiferana* (Appendice A).

Les résultats de ces études montrent que des contaminants microbiens peuvent être associés aux préparations virales produites *in vivo*. La présence de *B. cereus* et de *E. faecalis*, deux pathogènes d'insectes mais également deux bactéries potentiellement pathogènes pour l'humain, fait ressortir l'importance de connaître la composition exacte de la microflore des préparations virales dans l'intérêt de la santé humaine, animale et environnementale. La présence de micro-organismes isolés à partir de certains constituants de la nourriture artificielle utilisée pour la spongieuse porte à croire que certaines bactéries identifiées par Belkosky (1994) pourront être retrouvées dans nos lots puisque les mêmes ingrédients sont utilisés dans l'élevage en laboratoire de *Choristoneura fumiferana*.

Puisque aucune étude n'a encore été réalisée sur les contaminants microbiens présents dans une préparation *in vivo* de ChfuGV, il convient d'augmenter les

connaissances à ce sujet afin de déterminer si les constituants majeurs de la microflore du produit représentent un risque pour la santé. De plus, notre étude comparera deux techniques d'identification afin d'en évaluer la pertinence dans le cas de bactéries provenant de lots de virus produits *in vivo*.

Chapitre 2
Matériel et méthodes

2.1 Production virale

2.1.1 Élevage des larves en laboratoire

La production virale *in vivo* est faite chez les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Service Canadien des Forêts, Sault-Sainte-Marie, Ontario) selon la méthode décrite par Forté *et al.* (1999). Les larves reçues chaque semaine, pendant 13 semaines, ont été élevées et infectées séparément de sorte que 13 lots distincts de virus ont été produits. Dans quatre lots (7 à 10), un antibiotique a été ajouté à la nourriture artificielle à une concentration finale de 3,6% (p/v) (auréomycine 5,5%, BioServ, Frenchtown, New Jersey, É.-U.). Deux lots sans antibiotique (11 et 12) ont été utilisés comme témoins c'est-à-dire que les larves n'ont pas été mises en présence du virus. Les larves sont élevées, jusqu'au 4e stade, dans une chambre environnementale (MLR-350H, Sanyo Electric Co., Osaka, Japon) (50% d'humidité, 25 °C, photopériode de 14 heures) et sont alimentées d'une nourriture artificielle (Grisdale et Wilson, 1993) (Appendice A). L'évaluation du stade larvaire se fait visuellement, par l'observation de la grosseur des larves et de leur capsule céphalique (Allen, Dorais et Kettela, 1984; Talerico, 1984).

2.1.2 Infection des larves par le ChfuGV

Les larves du quatrième stade sont mises en présence d'une nourriture artificielle fraîche sur laquelle une suspension virale a été étalée à raison de $3x10^{7}$ granules par godet. Les larves sont par la suite incubées dans les mêmes conditions pour une période de 12 jours, nécessaire à la production de virus en quantité satisfaisante. À la fin de la période d'incubation, les larves, les fils de soie et les excréments sont récupérés et le tout est homogénéisé (Omni-Mixer 17150, Sorvall, Du Pont Instruments, Newtown, Connecticut, É.-U.) dans une solution de SDS 1% (Gibco BRL, Invitrogen Co., San Diego, Californie, É.-U.) afin de briser la membrane cellulaire des insectes. Le broyat est

filtré à travers trois épaisseurs de coton à fromage afin de retirer les débris de larves. La suspension résultante est utilisée d'une part pour l'étude des micro-organismes contaminants et d'autre part pour la poursuite de la purification et le décompte des particules virales.

2.1.3 Purification virale

La purification virale est basée sur la méthode décrite par Tompkins (1991). Le filtrat issu de l'infection des larves par le ChfuGV est laissé 30 minutes en présence de SDS, afin de briser la membrane cellulaire des insectes. Les débris cellulaires restants sont éliminés par une centrifugation à 300 X g durant 5 minutes (Centrifugeuse RC5C, Sorvall, Du Pont Instruments). Un litre du surnageant est ensuite récupéré et soumis à une centrifugation à 10 000 X g durant 25 minutes afin de faire sédimenter les particules virales. Le culot est remis en suspension dans une solution de NaCl 0,5M (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, É.-U.), incubé 30 minutes à la température de la pièce et séparé du liquide par une centrifugation à 10 000 X g durant 10 minutes. Trois lavages dans de l'eau distillée stérile permettant d'éliminer toute trace de sel suivi à chaque fois d'une centrifugation à 10 000 X g durant 10 minutes sont ensuite effectués et le culot est remis en suspension dans de l'eau distillée stérile. La suspension est ensuite placée sur un gradient de glycérol discontinu (50%, 60%, 70%, 80% et 90% v/v) (Sigma Chemical Co., St-Louis, Missouri, É.-U.) et soumise à une centrifugation à 80 000 X g (Ultra-centrifugeuse L5-50, Beckman Instruments Inc., Fullerton, Californie, É.-U.) durant 45 minutes. Les particules virales sont récupérées dans la fraction de glycérol 80%. Trois lavages consécutifs avec un volume égal d'eau distillée stérile sont effectués suivis à chaque fois d'une centrifugation à 10 000 X g durant 25 minutes (Centrifugeuse RC5C). Le surnageant est retiré, le culot est remis en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile et centrifugé à 16 000 X g durant 10 minutes (Centrifugeuse MicroMax, International Equipment Company, Needham Heights, Massachusett, É.-U.). Le dernier culot est finalement remis en suspension dans un volume final de 5 ml d'eau distillée stérile et la suspension virale est conservée à –20°C.

2.2 Décompte viral et microbien

Tous les lots, à l'exception du premier lot, ont été utilisés pour le décompte viral et le décompte microbien. Ils ont été numérotés 1 à 12 tandis que le premier lot est identifié par la lettre i.

2.2.1 Décompte des particules virales en microscopie électronique

Le décompte des particules virales est fait selon la méthode décrite par Alain, Berthiaume et Trudel (1989). La suspension virale est diluée trois fois d'un facteur de 10 et un volume de 100 µl de chacune des dilutions est déposé dans un tube et mélangé à un volume égal d'une suspension de billes de latex ($3{,}51 \times 10^8$ billes/ml) (S130-3 polystyrene latex, Agar Scientific, Stansted, Royaume-Uni). Une grille de cuivre (MECALAB, Montréal, Québec, Canada) recouverte d'une membrane de Formvar (0,5g Formvar (MECALAB), 100 ml 1,2-dichloroéthane (Becton Dickinson, Spark, Maryland, É.-U.)) et de carbone (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) est déposée, surface recouverte vers le haut, dans le fond du tube contenant le mélange de virus et de billes. Les particules virales et les billes de latex se retrouvent à la surface de la grille suite à une centrifugation à 120 000 X g (Centrifugeuse Airfuge, Beckman) pendant une période de 5 minutes. Le surnageant est éliminé, les grilles sont récupérées, lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile et séchées sur du papier buvard. Elles sont ensuite colorées négativement avec une goutte d'acide phosphotungstique (PTA) 3%, d'un pH de 6, pendant 3 minutes et asséchées sur du papier buvard. Les grilles sont observées en microscopie électronique (EM 300, Philips Electronics Industries Ltd., Eindhoven, Pays-Bas) à un grossissement de 13 000 X et le nombre de billes et de particules virales sont comptées dans 20 champs différents. Le nombre de granules par ml est calculé à partir de la concentration connue des billes de latex selon la formule :

$$\text{Granules/ml} = n_v \times d \times K / n_s$$

où n_v signifie le nombre de particules virales comptées, d signifie la dilution utilisée, n_s signifie le nombre de billes de latex comptées et K est une valeur constante représentant la concentration de la suspension de billes de latex soit $3,51x10^8$ billes/ml.

2.2.2 Décompte des bactéries aérobies et des mycètes sur milieu de culture gélosé

Le broyat récupéré suite à la filtration à travers le coton fromage est dilué plusieurs fois d'un facteur de 10 (10^{-2} à 10^{-8}) et 100 µl de chaque dilution sont étalés sur gélose nutritive (Becton Dickinson, Spark, Maryland, É.-U.), gélose R2A (Difco, Becton Dickinson) et gélose Sabouraud dextrose (Becton Dickinson) (Appendice B) à l'aide d'une tige de verre recourbée. Les géloses nutritives et R2A sont des milieux de cultures qui supportent la croissance de la majorité des espèces bactériennes tandis que le milieu de culture Sabouraud dextrose est conçu pour la croissance des mycètes microscopiques (Atlas, 1997). Afin de favoriser la croissance des bactéries pouvant représenter un danger pour les humains, les géloses nutritives et R2A sont incubées à 37°C pendant 48 heures. Les géloses Sabouraud sont quant à elles incubées à 25°C pendant une période de 72 heures afin de permettre la croissance des moisissures. Ces étapes sont effectuées en triplicata. Seuls les pétris ayant un nombre de colonies situé entre 30 et 300 sont utilisés pour le décompte des unités formatrices de colonies. Dans quelques cas, lorsque le nombre de colonies présentes sur chaque gélose n'est pas compris dans cet intervalle, des dilutions supplémentaires sont effectuées ($2x10^{-4}$, $2x10^{-5}$, $5x10^{-5}$, $5x10^{-6}$, $5x10^{-7}$) à partir du broyat de larves conservé à 4°C.

2.2.3 Analyses statistiques

Afin de vérifier l'effet de l'utilisation d'un antibiotique sur la quantité de particules virales et sur la quantité de micro-organismes retrouvés, les données des décomptes viraux et microbiens ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) hiérarchisée effectuée à l'aide du logiciel JMPIN, version 3.2.1 (SAS Institute Inc., Cary, Caroline du Nord, É.-U.). L'effet de la présence du ChfuGV sur le nombre de micro-organismes a également été vérifié par un ANOVA hiérarchisé. Les effets testés pour le nombre de

particules virales sont : le traitement (avec ou sans antibiotique) qui est le premier niveau hiérarchique et le lot de production, qui est le deuxième niveau hiérarchique. Pour le décompte des micro-organismes viables, les effets vérifiés par l'analyse statistique sont le traitement (avec ou sans antibiotique et avec ou sans infection virale) qui est le premier niveau hiérarchique, le milieu de culture utilisé, qui est le second niveau hiérarchique et le lot de production qui est le troisième et dernier niveau hiérarchique. Dans les deux cas, le seuil de signification (α) utilisé est de 0,05. Dans le cas ou un effet significatif est observé, un ANOVA à un critère de sélection ainsi qu'un test de comparaison multiple de Tukey-Kramer HSD sont effectués pour déterminer la ou les valeurs qui varient significativement par rapport aux autres valeurs.

2.3 Isolement des colonies bactériennes, coloration et microscopie

2.3.1 Isolement des colonies

Chacune des colonies ayant une morphologie différente sur gélose est isolée sur le milieu qui a permi sa croissance. L'isolement est effectué avec un fil de platine stérile par repiquage successif jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Les bactéries du lot initial sont identifiées par un chiffre tandis que les bactéries des lots 1 à 12 sont identifiées de la façon suivante : numéro de lot : numéro de la bactérie. Par exemple, la troisième bactérie à être isolée dans le lot 5 est numérotée 5:3.

2.3.2 Coloration Gram

Chacun des isolats est coloré selon la méthode développée par Christian Gram (Prescott, Harley et Klein, 1995) et observé au microscope optique (Leitz Laborlux S, Leica, Heerbrugg, Suisse) à un grossissement de 1000 X sous immersion d'huile. La coloration de Gram est effectuée avec une trousse Difco (Becton Dickinson). Premièrement, une colonie bien isolée est prélevée et mise en suspension dans une goutte d'eau stérile, puis déposée sur une lame de microscope. Lorsque le frottis est sec, il est fixé à la flamme et coloré avec la solution de cristal violet, un colorant basique, pendant

une minute et est rincé à l'eau du robinet. Ensuite, la préparation est traitée avec une solution d'iode, qui augmente les interactions entre les cellules et le colorant, pendant deux minutes. Après un autre rinçage à l'eau du robinet, le frottis est décoloré avec une solution d'alcool isopropylique et d'acétone pendant environ 15 secondes et rincé une troisième fois. Finalement, le frottis est contre-coloré à la safranine pendant une minute, afin de permettre la visualisation des cellules qui ont été décolorées, rincé puis asséché sur du papier buvard avant d'être observé en microscopie.

2.3.3 Test de KOH

Pour certains isolats, une confirmation de la réaction de Gram par un test de KOH est nécessaire. Ce test fait appel au fait que les parois des bactéries Gram négatives se brisent au contact d'une solution alcaline ce qui entraîne la libération de leur ADN et la formation de filaments visqueux (Suslow, Schroth et Isaka, 1982). Une émulsion de la colonie est effectuée dans une solution de KOH 3% (Sigma Chemical Co.) sur une lame de microscope et une augmentation de la viscosité signifie la présence de bactéries Gram négatives. La bactérie *Escherichia coli* est utilisée comme témoin positif pour ce test.

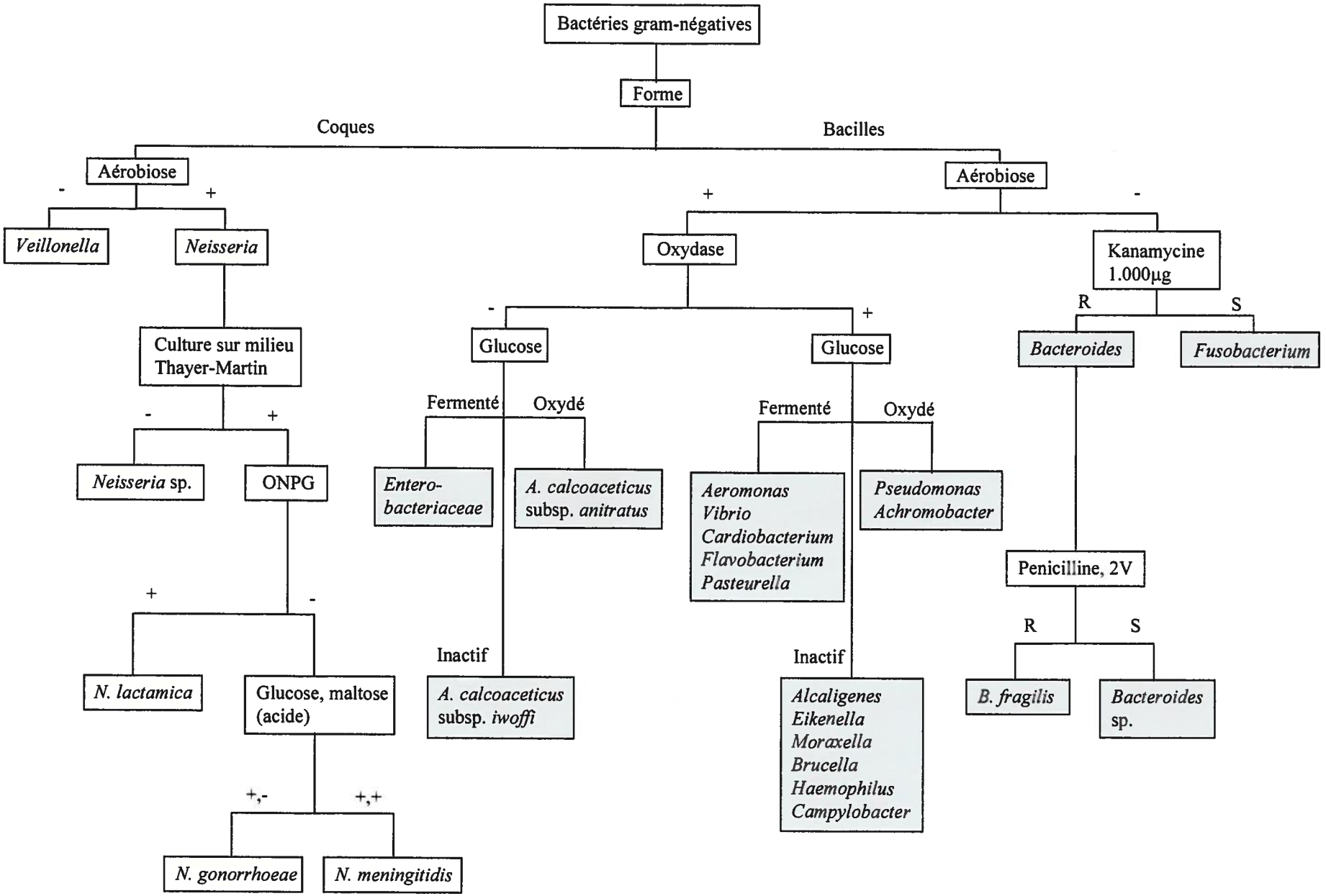
2.4 Identification des bactéries par l'étude des caractères biochimiques

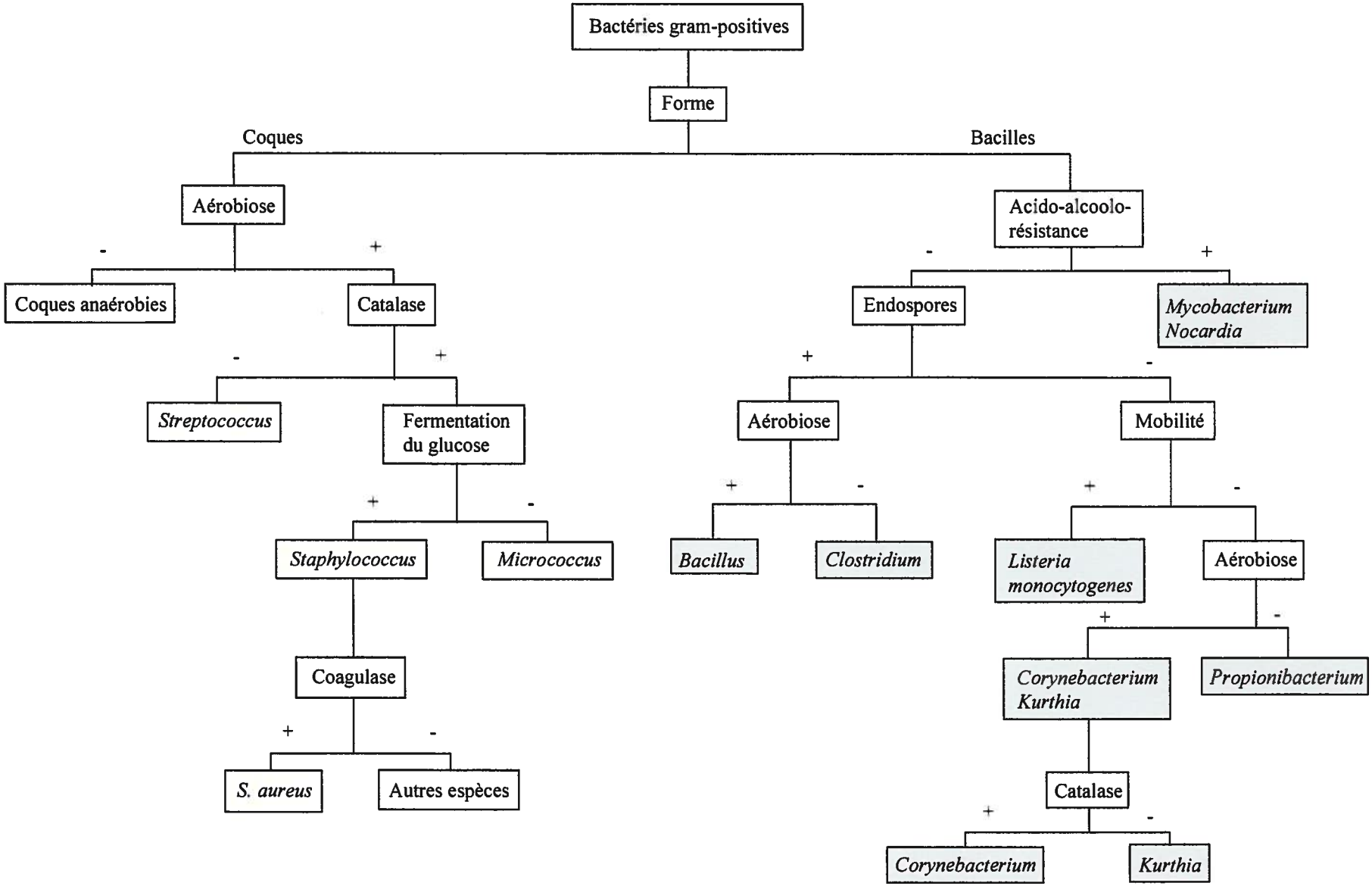
Le choix des tests à effectuer est fait à l'aide d'une clé d'identification des genres de bactéries d'importance médicale (Prescott, Harley et Klein, 1995) présentée à la figure deux.

2.4.1 Coques Gram positifs

Tel que présenté à la figure 2, le test préliminaire, dans le cas de coques Gram positifs, est un test de catalase. Ce test permet de faire un choix quant à la galerie API à utiliser pour l'identification au niveau de l'espèce des coques Gram positifs.

Figure 2 : Clé d'identification des genres de bactéries d'importance médicale (Prescot, Harley et Klein, 1995)


Bactéries gram-négatives
Forme
Coques
Bacilles
Aérobiose
Aérobiose
-
+
+
-
Veillonella
Neisseria
Oxydase
Kanamycine 1.000µg
Culture sur milieu Thayer-Martin
-
+
Glucose
Glucose
R
S
Bacteroides
Fusobacterium
Fermenté
Oxydé
Fermenté
Oxydé
Neisseria sp.
ONPG
Entero-bacteriaceae
A. calcoaceticus subsp. anitratus
Aeromonas
Vibrio
Cardiobacterium
Flavobacterium
Pasteurella
Pseudomonas
Achromobacter
Penicilline, 2V
+
-
Inactif
Inactif
R
S
N. lactamica
Glucose, maltose (acide)
A. calcoaceticus subsp. iwoffi
Alcaligenes
Eikenella
Moraxella
Brucella
Haemophilus
Campylobacter
B. fragilis
Bacteroides sp.
+,-
+,+
N. gonorrhoeae
N. meningitidis


Bactéries gram-positives
Forme
Coques
Bacilles
Aérobiose
-
+
Coques anaérobies
Catalase
-
+
Streptococcus
Fermentation du glucose
+
-
Staphylococcus
Micrococcus
Coagulase
+
-
S. aureus
Autres espèces
Acido-alcoolo-résistance
-
+
Endospores
Mycobacterium Nocardia
+
-
Aérobiose
Mobilité
+
-
+
-
Bacillus
Clostridium
Listeria monocytogenes
Aérobiose
+
-
Corynebacterium Kurthia
Propionibacterium
Catalase
+
-
Corynebacterium
Kurthia

2.4.1.1 Test de catalase

Le test de catalase, utilisé pour détecter l'enzyme du même nom qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et O_2, sert à séparer les streptocoques des staphylocoques et microcoques. À l'aide d'un cure-dent stérile, une colonie est déposée sur une lame de microscope et immergée de peroxyde d'hydrogène 6% (Distribution Iris, Montréal, Québec, Canada). La formation de bulles indique une réaction positive propre aux genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* tandis que l'absence de bulle indique une réaction négative correspondant à la présence de bactéries du genre *Streptococcus*.

2.4.1.2 API Staph

La galerie API Staph (BioMérieux, Lyon, Rhône-Alpes, France) permet l'identification en 24 heures des bactéries de genre *Staphylococcus* et *Micrococcus*. Les tests disponibles sur cette galerie ainsi que les réactifs nécessaires à la lecture des résultats sont présentés à l'appendice C. L'inoculation de la galerie se fait selon les recommandations du fabricant. À partir d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive, une suspension bactérienne est faite dans le milieu API Staph (BioMérieux). Une évaluation visuelle de la turbidité de la suspension est effectuée afin que celle-ci soit équivalente à l'étalon 0,5 de l'échelle McFarland. Cette suspension est utilisée pour ensemencer chacun des puits de la galerie API Staph. Lorsque le fabriquant le spécifie, le puit est recouvert d'huile minérale stérile. La galerie est déposée dans son support rempli d'eau et incubée à 37°C pour 24 heures. Suite à l'incubation, la galerie est lue selon les directives du fabricant. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel APILAB Plus (BioMérieux).

2.4.1.3 Test de coagulase

Pour confirmer l'identification de *Staphylococcus aureus*, un test de détection de la coagulase, l'enzyme qui provoque la coagulation du plasma, est effectué (Prescott, Harley et Klein, 1995). À partir d'une culture pure, une colonie est transférée dans un tube de bouillon BHI (Brain Heart Infusion) (Becton Dickinson) (Appendice B). Le tout

est incubé à 37°C durant 18 à 24 heures. À l'aide d'une pipette stérile, 500 µl de plasma réhydraté (Bacto coagulase plasma) (Bacto, Becton Dickinson) sont placés dans un tube stérile. Deux gouttes de la culture préparée sont ajoutées et le tout est mélangé délicatement. Après une incubation à 37°C durant une période de 4 heures, une coagulation dans le fond du tube est observée dans le cas d'un résultat positif. Si aucune coagulation n'est apparente après 4 heures, le résultat est négatif.

2.4.1.4 API 20 Strep

La galerie API 20 Strep (BioMérieux) permet l'identification en 24 heures des bactéries de genre *Streptococcus*. Cette galerie met en évidence certaines activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les détails des tests disponibles sur cette galerie ainsi que les réactifs nécessaires à la lecture des résultats sont présentés à l'appendice C. La galerie est utilisée selon les directives du fabricant c'est-à-dire qu'une suspension dense (étalon 4 de l'échelle McFarland) est réalisée à partir d'une culture pure de 24 heures. Celle-ci est utilisée pour ensemencer les cupules des tests enzymatiques et pour effectuer une deuxième suspension dans le milieu API GP (BioMérieux), un milieu enrichi qui contient un indicateur de pH. Cette suspension sera utilisée pour les réactions de fermentation. Après l'inoculation, la galerie est déposée dans son support rempli d'eau, incubée à 37°C pour 24 heures et lue selon les directives du fabricant. Les résultats sont analysés avec le logiciel APILAB Plus (BioMérieux).

2.4.2 Bacilles Gram positifs

Les bacilles Gram positifs sont soumis à un test de production d'endospores afin de déterminer s'il appartiennent au genre *Bacillus*.

2.4.2.1 Test de sporulation

Une colonie bien isolée est mise en culture dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif (Becton Dickinson) (Appendice B). Le tout est incubé à 37°C pendant 24 heures. Suite à cette période d'incubation, un témoin positif est préparé par

l'ensemencement d'une gélose nutritive, à partir de chacun des tubes. Ceux-ci sont ensuite placés dans un bain-marie ajusté à 75°C (HAAKE V, Haake, Karlsruhe, Allemagne) pour une période de 15 minutes, afin d'éliminer tous les organismes non sporulants. Après refroidissement, une gélose nutritive est ensemencée à partir de chacun des tubes pour vérifier la présence de bactéries sporulantes. Le tout est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les isolats dont la croissance est visible sur les deux géloses sont considérés comme appartenant au genre *Bacillus*.

2.4.2.2 API 50 CH

La galerie API 50 CH (BioMérieux) permet l'étude du métabolisme des glucides et l'identification des bactéries du genre *Bacillus* lorsqu'elle est utilisée avec la galerie API 20 E. Le milieu API 50 CHB (BioMérieux) est utilisé pour mettre en suspension toutes les colonies présentes sur la gélose. Il contient un indicateur de pH qui prend une coloration jaune lorsque des acides organiques sont produits suite au catabolisme des glucides. Suite à l'inoculation de chacune des cupules avec la suspension préparée précédemment, la galerie est déposée dans son support rempli d'eau et incubée à 37°C pendant 24 heures. La liste complète des substrats disponibles dans cette galerie est présentée à l'appendice C.

2.4.2.3 API 20E

La galerie API 20 E (BioMérieux) permet non seulement l'identification des entérobactéries et autres bacilles Gram négatifs mais permet aussi de compléter l'identification des bactéries du genre *Bacillus*. Pour cette dernière utilisation, seulement les tubes de ONPG à GLU sont utilisés selon les directives du fabricant. Les tests disponibles ainsi que les réactifs nécessaires à la lecture des résultats sont présentés à l'appendice C. À partir d'une culture de 24 heures, une colonie est remise en suspension dans un milieu de NaCl 0,85% (BioMérieux). Cette suspension est utilisée pour remplir les cupules. La galerie est par la suite placée dans son support rempli d'eau et incubée pendant 24 heures à 37°C. Les résultats sont analysés avec le logiciel APILAB Plus (BioMérieux).

2.4.3 Bacilles Gram négatifs

Deux tests préliminaires doivent être faits pour le choix de la galerie API à utiliser pour les bacilles Gram négatifs. Il s'agit du test de l'oxydase et de la fermentation du lactose.

2.4.3.1 Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase permet de détecter la présence de la cytochrome *c* oxydase, capable de réduire l'O_2. À l'aide d'un cure-dent stérile, une colonie est déposée à la surface d'un papier filtre. Une goutte de solution de dihydrochlorure de tétraméthyl-p-phénilènediamine 1% (Bio mérieux) est déposée sur la colonie. La réaction est positive lorsqu'une couleur pourpre apparaît dans les dix secondes qui suivent l'application du réactif (Prescott, Harley et Klein, 1995).

2.4.3.2 Fermentation du lactose

Les bacilles Gram négatifs sont cultivés sur des géloses MacConkey (Becton Dickinson) (Appendice B) qui contiennent du lactose comme seul sucre. Les bactéries qui fermentent le lactose forment des colonies rouges alors que les bactéries qui ne fermentent pas le lactose forment des colonies incolores (Prescott, Harley et Klein, 1995). Pour ces dernières, la galerie API 20 NE est utilisée pour l'identification.

2.4.3.3 API 20 NE

La galerie API 20 NE (BioMérieux) permet l'identification en 48 heures des bacilles Gram négatifs non-*Enterobacteriaceae* (Appendice C). Une suspension de turbidité équivalente à l'étalon 0,5 de l'échelle McFarland est préparée dans une solution de NaCl 0,85% (BioMérieux) à partir de laquelle la moitié des cupules sont ensemencées. Cette solution sert également d'inoculum pour une seconde suspension dans un milieu AUX (BioMérieux) contenant un indicateur de pH pour l'inoculation des cupules

restantes. La galerie est placée dans son support rempli d'eau et incubée à 30°C. La lecture des résultats se fait après 24 heures et après 48 heures et ceux-ci sont analysés à l'aide du logiciel d'identification APILAB Plus (BioMérieux).

2.4.4 Analyse des résultats à l'aide du logiciel APILAB Plus

Lorsque les résultats des tests biochimiques des différentes galeries API sont entrés dans la base de données APILAB Plus, l'identification fournie par le logiciel est accompagnée du pourcentage d'identification, de l'indice T, d'un commentaire sur l'identification qui est déterminé par le pourcentage d'identification et l'indice T, des tests à l'encontre et d'une note, le cas échéant. Le pourcentage d'identification représente la proximité relative de la bactérie à l'étude aux différents groupes ou taxons de la base de données. L'indice T quant à lui, représente la proximité de la bactéries à l'étude au profil le plus typique dans un taxon. Un pourcentage d'identification supérieur à 99,9% ainsi qu'un indice T supérieur à 0,75 mène à une excellente identification. Un pourcentage d'identification supérieur à 99,0% ainsi qu'un indice T supérieur à 0,5 ou 0,25 mènent respectivement à une très bonne identification ou une bonne identification. Si le pourcentage d'identification est supérieur à 80,0% et que l'indice T est inférieur à 0,25, l'identification est acceptable. Lorsque les taxons retenus pour l'identification appartiennent à la même espèce, l'identification est effectuée au niveau de l'espèce tandis que lorsque ces taxons appartiennent au même genre, l'identification est seulement au niveau du genre. Si les taxons retenus appartiennent à différents genres, l'identification offre une faible discrimination et est non fiable si la somme des % d'identification est inférieure à 80% (BioMérieux, 1997).

2.5 Identification des bactéries par le séquençage du gène de l'ARNr 16S

2.5.1 Extraction et quantification de l'ADN génomique

Des colonies bien isolées sont mises en suspension dans 100 µl d'eau distillée stérile dans un tube à centrifugation stérile de 0,5 ml. Les tubes sont par la suite placés dans un bain d'eau bouillante pendant une période de 5 minutes afin de briser les membranes cellulaires et permettre la libération de l'ADN. Les tubes sont ensuite refroidis rapidement sur glace et les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 6000 X g pendant 5 minutes dans une centrifugeuse de table (MicroMax, International Equipment Company). Le surnageant contenant l'ADN est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

La quantité d'ADN dans le surnageant est estimée par comparaison avec un marqueur standard après migration sur gel d'agarose 0,8% (Bio-Rad, Hercules, Californie, É.-U.). Différentes quantités (500 ng, 400 ng, 300 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng et 10 ng) d'un marqueur d'ADN (phage lambda, 0,25 µg/µl) (Roche Ltd., Basel, Suisse) sont respectivement déposées dans des puits d'un gel d'agarose. Quatre microlitres de chaque suspension d'ADN microbien sont également déposés dans les puits. Un courant de 120 volts est appliqué et la migration est conduite durant environ 15 minutes. Le gel d'agarose est déposé dans un bain contenant 0,5 µg par ml de bromure d'éthidium (Bio-Rad) pour une période de 30 minutes et l'ADN est visualisé sous UV avec l'appareil Gel Doc 1000 (Bio-Rad) et à l'aide du logiciel Quantity One Version 4.2.3 (Bio-Rad).

Dans certains cas, lorsqu'aucun ADN n'était visible sur gel d'agarose suite à la réalisation de la technique décrite précédemment, une seconde méthode d'extraction a été nécessaire. Des colonies bien isolées sont alors mises en suspension dans 200 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl (Gibco, Invitrogen), pH de 8,0, 1 mM EDTA (Gibco, Invitrogen), pH de 8,0) et 8 µl d'une solution de lysozyme (50 mg/ml) (Sigma Chemical Co.) sont ajoutés. Le tout est placé à 37°C pendant une heure pour permettre au lysozyme

de briser la paroi cellulaire des bactéries. Suite à cette période, 20 µl d'une solution de SDS 10% sont ajoutés au mélange et le tout est placé dans un bain d'eau bouillante pour une période de 5 minutes afin de briser les membranes cellulaires et de permettre la libération de l'ADN bactérien. Les tubes sont ensuite rapidement refroidis sur glace et les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 6000 X g pendant 5 minutes. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré et purifié par une extraction au phénol : chloroforme. La concentration de l'ADN bactérien est ensuite estimée de la façon décrite précédemment.

Dans certains cas, une troisième technique d'extraction de l'ADN bactérien a été nécessaire. Des colonies bien isolées sont mises en suspension dans 500 µl de tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl (J.T.Baker chemical Co., Phillipsburg, New Jersey, É.-U.), 10 mM Na_2HPO_4 (Sigma Chemical Co.), 1,8 mM KH_2PO_4 (Sigma Chemical Co.), pH 7,4) dans un tube de 1,5 ml à bouchon hermétique, stérile. Cinq cent µl de solution d'extraction (500mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl, SDS 10%, 100mM EDTA) sont ajoutés de même que 1,0 g de billes de verre 0,1 mm (B. Braun Biotech International, Allemagne). Le tout est homogénéisé pendant 10 minutes à vitesse maximale (Retsch, Sybron/Brinkmann, Rexdale, Ontario, Canada) afin de briser les membranes cellulaires, 500 µl de chacune des suspensions contenant l'ADN bactérien sont récupérés et celui-ci est purifié au phénol : chloroforme.

2.5.2 Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR

Les amorces universelles pour les eubactéries pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et pH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') (Ulrike *et al.*, 1989), correspondant respectivement aux positions 19-38 et 1541-1581 du gène de l'ARNr 16S de *Escherichia coli*, ont été utilisées pour la réaction de PCR (Réaction de polymérisation en chaîne). La réaction d'amplification est conduite dans un volume de 50 µl contenant 5 µl de tampon de réaction 10X (Stratagene, La Jolla, Californie, É.-U.) (Appendice D), 0,2 mM d'un mélange de déoxynucléotides (Stratagene), 10 pmol de chaque amorce et 2,5 U de *Taq* polymérase (Stratagene). La réaction de PCR est effectuée sur l'appareil

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Californie, États-Unis) et les paramètres expérimentaux sont les suivants : départ à chaud à 80°C pendant 5 minutes, période pendant laquelle l'ADN bactérien (100 pg à 10 ng) est ajouté, ensuite, dénaturation de l'ADN matrice à 94°C pendant 5 minutes et appariement des amorces à 55°C pendant 5 minutes. Cette séquence est suivie d'une période d'élongation à 72°C pendant 2 minutes, d'une période de dénaturation à 94°C pendant 40 secondes et d'une période d'appariement des amorces à 55°C pendant une minute. Le cycle d'élongation, dénaturation, appariement est effectué 30 fois. Une période d'extension supplémentaire de 10 minutes à 72°C termine la réaction. Le produit PCR est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.5.3 Digestion enzymatique de l'amplicon

Suite à la réaction de PCR, une vérification sur gel d'agarose 0,8% est effectuée pour s'assurer qu'un amplicon unique et d'une taille d'environ 1500 pb a bien été obtenu. Le produit de PCR est ensuite soumis à trois digestions enzymatiques effectuées séparément avec *Hin*P1I, *Rsa*1 et *Alu*1 (New England BioLabs Inc., Beverly, Massachusetts, É.-U.) afin d'obtenir trois profils de digestion pour chaque échantillon. Cette technique est appelée « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP). Brièvement, 10 µl de produit de PCR sont ajoutés dans un tube stérile de 0,6 ml de même que 7,5 µl d'eau stérile, 2 µl du tampon 10X spécifique à l'enzyme utilisé (NEBuffer 2 pour *Hin*P1I et *Alu*1 et NEBuffer 1 pour *Rsa*1) (New England BioLabs Inc.) (Appendice D) et 0,5 µl d'enzyme. Le tout est incubé à 37°C pendant une heure avant visualisation du résultat sur gel d'agarose 2%. Pour chaque profil de digestion différent, un représentant est choisi pour le clonage et le séquençage du fragment de PCR.

2.5.4 Clonage des fragments de PCR pour le séquençage

Les fragments de PCR sont clonés à l'aide de la trousse TA cloning kit (Invitrogen). Le vecteur pCR®2.1 inclus dans cette trousse est conçu pour le clonage de fragments PCR puisqu'il présente à chaque extrémité 3' une base déoxythymidine (T)

libre qui peut s'apparier lors du clonage avec la déoxyadénosine (A) libre, ajoutée par la *Taq* polymérase lors de la réaction de PCR .

2.5.4.1 Ligation du produit de PCR dans pCR®2.1

Chaque fragment de PCR choisi pour le séquençage est utilisé à raison de 20 ng d'ADN pour chacune des réactions de ligation. Le volume réactionnel final est de 10 µl et comprend 2 µl du vecteur pCR®2.1 (25 ng/µl, dans 10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), 1 µl (4U Weiss) de l'enzyme ADN ligase du phage T4 et 1 µl de tampon de ligation 10X (Appendice D). Le tout est incubé à 14°C pendant 16 heures avant d'être utilisé pour la réaction de transformation.

2.5.4.2 Transformation bactérienne

Suite à la réaction de ligation, les plasmides sont insérés dans des cellules *E. coli* compétentes INVαF' One Shot (Invitrogen). Pour ce faire, 2 µl du produit de la ligation sont ajoutés à 50 µl de cellules compétentes. L'introduction de l'ADN plasmidique dans les cellules est effectuée à l'aide d'un choc thermique. Les cellules sont placées dans un bain de glace pendant 30 minutes, transférées à 42°C pendant une période de 30 secondes et replacées dans la glace. Après l'ajout de 250 µl de milieu de culture SOC (Invitrogen) (Appendice B) les cellules sont placées à 37°C sous agitation constante à 125 rotations par minute, pendant une heure afin de régénérer les parois bactériennes endommagées pendant le choc thermique. Suite à cette étape, différents volumes des produits de transformation sont étalés sur des milieux de culture 2 x YT (Difco, Becton Dickinson) (Appendice B) supplémentés avec 1,5% d'agar et 100 mg/ml d'ampicilline (Gibco BRL) et sur lesquels 40 µl d'une solution de 40 mg/ml de X-gal (bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) ont été étalés. Le tout est incubé pour un minimum de 18 heures à 37°C.

2.5.4.3 Sélection des colonies recombinantes

Le vecteur pCR®2.1 possède un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection des colonies provenant de cellules recombinantes. La sélection des cellules qui possèdent l'insert, quant à elle, se fait par α-complémentation. Le vecteur pCR®2.1 possède les fragments α et Ω du gène *lacZ*, codant pour la β-galactosidase, qui sont séparés par le site de clonage. La présence de l'insert interrompt la transcription du gène *lacZ* ce qui fait que le substrat chromogène X-gal ne peut être dégradé en un produit bleu par la β-galactosidase. Les cellules ayant le plasmide contenant l'insert présenteront donc le phénotype de colonies blanches tandis que les cellules ayant le plasmide ne contenant pas l'insert présenteront le phénotype de colonies bleues. Les colonies présentant le phénotype désiré sont prélevées à l'aide d'un fil de platine stérile et mises en culture dans 5 ml de bouillon 2 x YT, contenant 100 mg/ml d'ampicilline, à 37°C sous agitation constante pendant une période de 18 heures.

2.5.4.4 Mini-préparation des plasmides

L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée avec la trousse QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Les cultures préparées la veille sont centrifugées à vitesse maximale pendant une minute (MicroMax, IEC). Les cellules sont remises en suspension dans le tampon P1 contenant la Rnase A. La lyse cellulaire est effectuée en conditions alcalines, en présence de NaOH et de SDS (tampon P2). Le SDS solubilise les phospholipides et les protéines de la membrane tandis que le pH alcalin dénature l'ADN chromosomal et plasmidique de même que les protéines. La réaction est par la suite neutralisée et ajustée à une concentration élevée de sels par l'ajout du tampon N3. La haute concentration de sels permet la précipitation des protéines dénaturées, de l'ADN chromosomique, des débris cellulaires et du SDS. Suite à ces étapes, le mélange est centrifugé à vitesse maximale (MicroMax, IEC) pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et déposé sur la colonne QIAprep contenant une membrane de silica-gel qui permet l'absorption sélective de l'ADN plasmidique dans un tampon à haute concentration de sel et l'élution de l'ADN plasmidique dans un tampon à faible concentration de sels. Les colonnes sont ce trifugées à vitesse maximale pendant une

minute ce qui permet l'absorption des plasmides sur la membrane. Les sels sont par la suite retirés par un lavage avec le tampon PE contenant 80% d'éthanol. L'ADN plasmidique est par la suite élué par l'ajout de 50 µl d'eau stérile et par une période de centrifugation à vitesse maximale pendant une minute.

2.5.4.5 Digestion enzymatique des plasmides

Les plasmides obtenus à l'étape précédente sont digérés avec l'enzyme de restriction *Eco*R1 (New England BioLabs Inc.) afin de linéariser le vecteur et de séparer celui-ci de l'insert grâce aux sites *Eco*R1 situés de part et d'autre du site de clonage. Le mélange réactionnel a un volume final de 20 µl et contient 5 µl du produit de la mini-préparation de plasmides, 2 µl du tampon NEBuffer *Eco*R1 10X (Appendice D), 0,2 µl de BSA 100X (New England BioLabs Inc.) et 0,5 µl de l'enzyme *Eco*R1. Le tout est incubé à 37°C pendant une période d'une heure. La totalité du mélange réactionnel est déposé dans les puits d'un gel d'agarose 0,8% et un courant de 120 volts est appliqué pendant une période de 30 minutes. Le gel est visualisé tel que décrit précédemment et les échantillons contenant le vecteur linéarisé et l'insert de la bonne taille (1500 pb) sont choisis pour le séquençage.

2.5.5 Séquençage du gène de l'ARNr 16S

Le séquençage de l'ADN plasmidique est réalisé à l'aide d'un séquençeur automatique (ABI Prism 3700 DNA Analyser) (DNA LandMark inc., Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada). La méthode utilisée est basée sur celle de Sanger *et al.* (1977). Lors d'une réaction de PCR, une petite quantité de quatre ddNTP, chacun couplé à un fluorochrome différent, est ajoutée à un mélange des quatre dNTP. Les ddNTP peuvent être incorporés dans la chaîne d'ADN par la polymérase mais empêchent l'incorporation d'un dNTP à leur suite compromettant la poursuite de l'élongation du brin d'ADN. Cette technique génère des fragments d'ADN de longueurs différentes qui sont analysés par électrophorèse capillaire. Lorsque l'échantillon passe à travers le capillaire, les différents fragments sont séparés et atteignent la fin du capillaire à des temps

différents. La fluorescence émise par chacun des différents ddNTP est capturé par un détecteur et le résultat est exprimé sous la forme d'un chromatogramme où les différents pics représentent une base. L'amorce anti-sens M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') et l'amorce sens du promoteur de T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') sont utilisées pour le séquençage.

2.5.6 Comparaison avec les banques de données

Le programme FASTA 3 de l' « European Bioinformatics Institute » (European Bioinformatics Institute, 2002) est utilisé pour la comparaison des séquences obtenues avec les séquences disponibles dans la banque de données EMBL.

2.6 Identification des champignons microscopiques par l'étude des caractères culturaux et morphologiques

2.6.1 Isolement et culture des champignons microscopiques

Chaque champignon microscopique ayant une morphologie différente est isolé sur gélose Sabouraud dans l'enceinte d'une hotte à flux laminaire (Safety Cabinet, Envirco Corporation, Albuquerque, Nouveau Mexique, É.-U.). Dans certains cas, les isolats ont été cultivés sur milieu Czapek afin de favoriser l'apparition de structures de différentiation. Lorsque de telles structures sont visibles à l'oeil, celle-ci sont touchées à l'aide d'un cure-dent stérile et repiquées ponctuellement. Lorsque de telles structures ne sont pas visibles, une section de l'agar contenant du mycélium est prélevée et déposée à la surface du milieu de culture. Les géloses sont incubées à 25°C pour une période de 5 jours et observées quotidiennement pour voir l'apparition de structures différentiées.

2.6.2 Préparation des lames pour la microscopie

L'observation des structures de reproduction se fait en microscopie optique (Leitz Laborlux S, Leica) à un grossissement de 400 X ou de 1000 X sous immersion d'huile.

Une coupe mince du mycélium est faite à l'aide d'un scalpel désinfecté à l'éthanol 70% et déposée sur une lame de microscope. Une lamelle est fixée sur la coupe par une mince couche de silicone.

2.6.3 Clés d'identification

Les clés de détermination utilisées pour l'identification des mycètes sont celles retrouvées dans l'ouvrage de Botton *et al.* (1990). Pour chaque isolat, le groupe, le genre et l'espèce sont déterminés par l'observation des caractéristiques culturales et morphologiques.

Chapitre 3
Résultats

3.1 Décompte viral

Le tableau 3 présente les concentrations virales (granules/ml) obtenues lors de la production virale *in vivo*. La production virale sans antibiotique (lots 1 à 6) a permis d'obtenir des concentrations variant entre $9{,}77 \times 10^{9}$ granules/ml et $1{,}07 \times 10^{12}$ granules/ml (moyenne = $5{,}13 \times 10^{11}$). De même, la concentration dans les lots avec auréomycine (lots 7 à 10) varie entre $6{,}30 \times 10^{10}$ granules/ml et $1{,}22 \times 10^{12}$ granules/ml (moyenne = $4{,}47 \times 10^{11}$). Aucune particule virale n'a été détectée chez les insectes qui n'ont pas été mis en contact avec le virus (lots 11 et 12).

L'analyse de variance hiérarchisée démontre que la différence de 13%, observée entre les concentrations virales moyennes des traitements avec et sans auréomycine, n'est pas significative ($p = 0{,}4017$). Cependant, il existe une différence significative entre les différents lots ($p \leq 0{,}0001$). Suite à ce dernier résultat, un test de comparaison multiple de Tukey-Kramer HSD a été réalisé à l'intérieur des deux traitements afin de partager les lots qui diffèrent les uns des autres. Ce test a démontré que, dans le cas du traitement avec antibiotique, le lot 9 est le seul qui diffère significativement des autres. Dans le cas du traitement sans antibiotique, aucune valeur ne peut être à elle seule responsable de la variation significative observée.

3.2 Décompte des micro-organismes viables sur milieu gélosé

Les résultats du dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture sont présentés au tableau 4. Les valeurs présentées ont été obtenues en calculant la moyenne et l'écart-type de toutes les concentrations obtenues (UFC/ml) à partir des boîtes de Pétri sur lesquelles le nombre de colonies se situait entre 30 et 300. Pour les lots sans

Tableau 3 : Concentrations de ChfuGV obtenues lors de la production *in vivo* chez les larves de *Choristoneura fumiferana* élevées sur une diète artificielle avec ou sans auréomycine

Traitement	Lots	Concentration virale Granules/ml	Écart-type (+/-)
Sans antibiotique	1	$8,40 \times 10^{11}$	$1,19 \times 10^{11}$
	2	$1,07 \times 10^{12}$	$1,35 \times 10^{12}$
	3	$3,30 \times 10^{11}$	$6,79 \times 10^{11}$
	4	$3,34 \times 10^{11}$	$5,69 \times 10^{11}$
	5	$4,93 \times 10^{11}$	$6,15 \times 10^{11}$
	6	$9,77 \times 10^{9}$	$1,23 \times 10^{10}$
Avec antibiotique	7	$9,26 \times 10^{10}$	$1,21 \times 10^{11}$
	8	$6,30 \times 10^{10}$	$1,07 \times 10^{11}$
	9	$1,22 \times 10^{12}$	$1,66 \times 10^{12}$
	10	$4,11 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^{12}$
Non infecté	11	0	0
	12	0	0

Pour chacun des lots, n = 60

Tableau 4 : Concentrations de micro-organismes viables provenant de broyats de larves nourries sur une diète artificielle avec ou sans antibiotique et ayant ou pas été infectées par le ChfuGV

Traitement	Lots	Milieu agar nutritif			Milieu agar Sabouraud			Milieu agar R2A		
		Concentration (UFC/ml)	Écart-type (+/-)	n	Concentration (UFC/ml)	Écart-type (+/-)	n	Concentration (UFC/ml)	Écart-type (+/-)	n
Sans antibiotique	1	$1,40x10^{8}$	0	2	$1,66 x10^{8}$	$6,24 x10^{7}$	3	$2,80 x10^{8}$	$5,66 x10^{7}$	2
	2	$8,47 x10^{8}$	$1,27 x10^{8}$	3	$4,05 x10^{8}$	$6,05 x10^{7}$	3	$2,70 x10^{8}$	-	1
	3	$3,94 x10^{10}$	$7,07 x10^{8}$	2	$2,96 x10^{10}$	$5,55 x10^{9}$	4	$3,60 x10^{10}$	$4,86 x10^{9}$	3
	4	$2,62 x10^{7}$	$2,40 x10^{7}$	7	$8,85 x10^{6}$	$1,13 x10^{6}$	4	$2,55 x10^{7}$	$6,36 x10^{6}$	2
	5	$5,88 x10^{8}$	$8,73 x10^{7}$	4	$1,48 x10^{8}$	$1,52 x10^{8}$	6	$1,01 x10^{9}$	$9,27 x10^{8}$	7
	6	$2,31 x10^{8}$	$2,47 x10^{7}$	6	$2,32 x10^{8}$	$9,94 x10^{7}$	8	$3,13 x10^{8}$	$1,07 x10^{8}$	5
Avec antibiotique	7	$1,61 x10^{6}$	$4,78 x10^{5}$	4	$2,80 x10^{6}$	$2,69 x10^{5}$	2	$4,94 x10^{6}$	$3,80 x10^{6}$	9
	8	$4,30 x10^{6}$	$1,41 x10^{6}$	2	$3,21 x10^{6}$	$8,87 x10^{5}$	6	$6,74 x10^{6}$	$4,72 x10^{6}$	8
	9	$2,42 x10^{6}$	$1,93 x10^{6}$	3	$8,25 x10^{5}$	$9,57 x10^{4}$	4	$1,67 x10^{6}$	$1,21 x10^{5}$	3
	10	$4,87 x10^{6}$	$1,38 x10^{6}$	3	$6,80 x10^{6}$	$4,92 x10^{5}$	3	$9,53 x10^{6}$	$3,06 x10^{6}$	6
Non-infecté	11	$2,46 x10^{7}$	$6,74 x10^{6}$	3	$2,44 x10^{7}$	$2,86 x10^{6}$	3	$2,89 x10^{7}$	-	1
	12	$5,27 x10^{6}$	$1,15 x10^{6}$	5	$5,69 x10^{6}$	$3,07 x10^{6}$	5	$6,36 x10^{6}$	$1,02 x10^{6}$	4

antibiotique (1 à 6), la concentration moyenne des micro-organismes viables sur agar nutritif, Sabouraud et R2A sont respectivement de $6,87x10^9$ UFC/ml, $5,09x10^9$ UFC/ml et $6,32x10^9$ UFC/ml. Pour les lots dans lesquels l'auréomycine a été ajoutée (7 à 10), ces concentrations sont respectivement de $3,30x10^6$ UFC/ml, $3,41x10^6$ UFC/ml et $5,72x10^6$ UFC/ml ce qui représente une diminution de 99,9% dans tous les cas. Les lots non infectés (11 et 12) montrent une diminution de 99,7% de la concentration moyenne des micro-organismes pour les trois milieux de culture utilisés avec des valeurs de $1,47x10^7$ UFC/ml, $1,50x10^7$ UFC/ml et $1,76x10^7$ UFC/ml.

L'analyse de variance hiérarchisée des résultats du décompte viable fait ressortir une différence significative entre les différents traitements utilisés (sans antibiotique, avec antibiotique ou non-infectés) ($p \leq 0,0001$). Suite à ce résultat, un test de comparaison multiple Tukey-Kramer HSD a été effectué afin de déterminer les traitements qui diffèrent les uns des autres. Celui-ci a démontré une différence significative entre les traitements avec et sans auréomycine. Les concentrations de micro-organismes associées au traitement 3 (non-infectés) ne varient pas significativement avec les valeurs des deux autres traitements. L'analyse de variance hiérarchisée a également décelé une différence significative entre les différents milieux de culture et les différents lots ($p = 0,0004$ et $p \leq 0,0001$, respectivement). Cependant, les milieux de culture diffèrent significativement uniquement dans les lots avec antibiotique (ANOVA à un critère de sélection, $p = 0,0070$). Le test de comparaison multiple a démontré que seul le milieu R2A diffère significativement avec les autres dans ce cas.

3.3 Isolement et identification des bactéries par le système API

3.3.1 Tests préliminaires et galeries API

Dans chacun des lots (le lot initial (i) qui n'a pas été utilisé dans le décompte viral et microbien et les lots 1 à 12), et pour chacun des 3 milieux de culture utilisés, un représentant de chaque phénotype, (couleur, forme, texture de la colonie, etc.) a été isolé.

À partir de tous les lots de production, 123 isolats bactériens ont été cultivés. L'appendice E présente les résultats des différents tests préliminaires à l'identification qui ont été effectués sur les souches bactériennes isolées. Les isolats ont été regroupés en 47 groupes selon les résultats des tests préliminaires et selon l'apparence des colonies sur milieu de culture. Un représentant de chaque groupe ainsi formé a été identifié par le système API. Parmis ceux-ci, 7 genres et 16 différentes espèces bactériennes ont été identifiés. Ces identifications sont présentées au tableau 5 avec les pourcentages d'identification, l'indice T et le commentaire fournis par le logiciel APILAB.

3.3.2 Confirmation de l'identification

Suite aux résultats obtenus avec les galeries API, le logiciel APILAB suggérait des tests supplémentaires pour la confirmation de l'identification dans le cas de *S. aureus* et de *K. varians*. Ces résultats ont été pris en compte dans l'identification finale de ces bactéries.

3.3.2.1 *Staphylococcus aureus* : test de coagulase

Les groupes 13, 20, 29 et 41 ont tous été identifiés par la galerie API Staph comme appartenant à l'espèce *S. aureus*. Les commentaires sur les identifications, fournis par le logiciel APILAB sont : bonne identification et bonne identification au genre. Cependant, afin de confirmer cette identification, tous ces isolats ont subi le test de la coagulase et ont tous obtenu un résultat négatif contredisant l'identification de la galerie API Staph. Le taxon le plus rapproché suggéré par le logiciel APILAB est *S. saprophyticus* dans le cas de 13, *S. xylosus* dans le cas de 20 et 29 et *S. homini* dans le cas de 41.

3.3.2.2 *Kocuria varians/rosea* : observation de la pigmentation sur milieu de culture

Le groupe 27 est le seul à avoir été identifié comme appartenant au genre *Kocuria*. Le pourcentage d'identification est de 79,6% et l'indice T est de 0,64 ce qui fournit une faible discrimination. L'identification de l'espèce n'est pas fournie par la galerie API

Tableau 5 : Identification par le système API des bactéries isolées dans les préparations de ChfuGV produites *in vivo*

Groupe	Identification API	Pourcentage d'identification	Indice T	Commentaire*
1	*Bacillus subtilis*	99,0	0,40	c
2	*Bacillus subtilis*	97,8	0,63	c
3	*Staphylococcus warneri*	95,0	0,88	c
4	*Bacillus subtilis*	95,9	0,58	c
5	*Bacillus subtilis*	98,9	0,50	c
6	*Bacillus cereus*	66,5	0,98	e
7	*Bacillus cereus*	66,5	0,98	e
8	*Bacillus subtilis*	99,5	0,88	b
9	*Staphylococcus saprophyticus*	88,7	1,00	d
10	*Pseudomonas aeruginosa*	99,5	1,00	b
11	*Pseudomonas aeruginosa*	99,5	1,00	b
12	*Pseudomonas aeruginosa*	99,5	1,00	b
13	*Staphylococcus aureus*	65,9	0,80	f
14	*Bacillus subtilis*	95,2	0,60	c
15	*Staphylococcus saprophyticus*	88,7	0,87	d
16	*Pseudomonas aeruginosa*	99,5	1,00	a
17	*Staphylococcus xylosus*	99,8	0,84	b
18	*Staphylococcus warneri*	95,0	0,88	c
19	*Staphylococcus saprophyticus*	46,6	0,76	g
20	*Staphylococcus aureus*	73,7	0,79	f
21	*Bacillus pumilus*	99,9	0,82	a
22	*Bacillus licheniformis*	86,4	0,42	d
23	*Bacillus cereus*	95,5	0,80	c
24	*Bacillus subtilis*	99,8	0,62	b
25	*Bacillus pumilus*	99,9	0,77	a
26	*Bacillus pumilus*	99,9	0,92	a
27	*Kocuria varians/rosea*	79,6	0,16	h
28	*Staphylococcus saprophyticus*	88,7	0,87	d
29	*Staphylococcus aureus*	73,7	0,79	f
30	*Bacillus stearothermophilus*	99,9	0,77	a

* a = excellente, b = très bonne, c = bonne, d = acceptable, e = excellente au genre, f = bonne au genre, g = acceptable au genre et h = faible discrimination

Tableau 5 : Identification par le système API des bactéries isolées dans les préparations de ChfuGV produites *in vivo* (suite)

Groupe	Identification API	Pourcentage d'identification	Indice T	Commentaire*
31	*Micrococcus* sp.	99,1	0,51	b
32	*Pseudomonas fluorescens*	99,9	0,97	a
33	*Pseudomonas fluorescens*	99,9	0,67	b
34	*Lactococcus lactis lactis*	48,7	0,60	h
35	*Bacillus sphaericus*	83,0	0,91	h
36	*Staphylococcus lugdunensis*	85,4	0,88	d
37	*Staphylococcus warneri*	96,5	0,88	c
38	*Pseudomonas aeruginosa*	99,1	0,52	b
39	*Bacillus stearothermophilus*	99,1	0,64	b
40	*Staphylococcus warneri*	46,8	0,54	g
41	*Staphylococcus aureus*	94,1	0,86	c
42	*Bacillus stearothermophilus*	91,5	0,70	h
43	*Bacillus pumilus*	99,9	0,68	b
44	*Bacillus pumilus*	99,9	0,64	b
45	*Staphylococcus epidermidis*	80,8	0,89	f
46	*Bacillus cereus*	66,5	0,98	e
47	*Ralstonia pickettii*	95,1	0,64	c

* a = excellente, b = très bonne, c = bonne, d = acceptable, e = excellente au genre, f = bonne au genre, g = acceptable au genre et h = faible discrimination

Staph. Cependant, l'espèce *K. rosea* produit un pigment rouge contrairement à ce qui est observé pour le groupe 27, ce qui mène à l'identification de *K. varians*.

3.4 Identification des bactéries par le séquençage du gène de l'ARNr 16S

3.4.1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN à partir des colonies isolées selon la première technique décrite dans la méthodologie a permis d'obtenir des concentrations d'ADN génomique variant de 1 ng/µl à 1 µg/µl. Dans certains cas (isolats 1, 2, 7, 1 :1, 1 :2), la seconde technique d'extraction de l'ADN génomique utilisant du SDS et du lysozyme a dû être utilisée et a généré des concentrations d'ADN variant entre 10 à 400 ng/µl. La dernière technique d'extraction de l'ADN a été nécessaire dans le cas de l'isolat 7 : 5 et a généré de l'ADN génomique d'une qualité supérieure aux deux autres techniques (moins de dégradation de l'ADN), avec une concentration de 400 ng/µl.

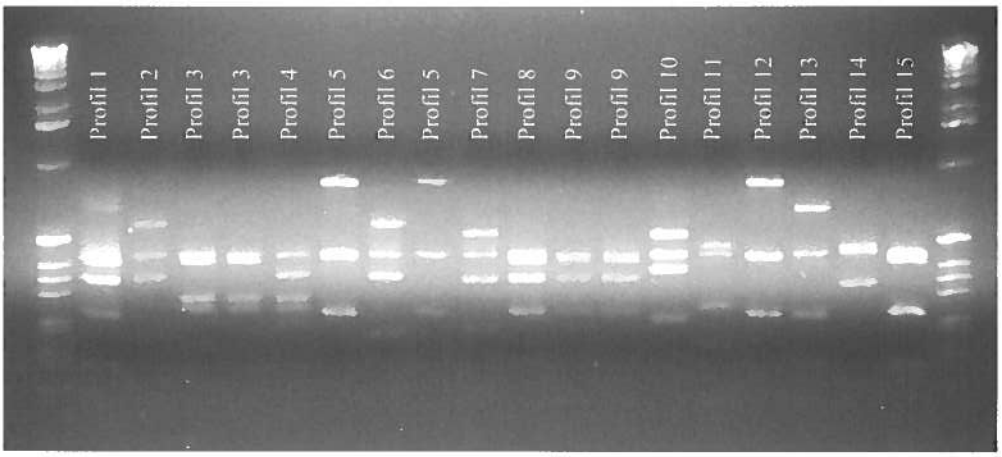
3.4.2 Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR et analyse de restriction des fragments obtenus

Les amorces pA et pH ont permis l'amplification de fragments uniques d'environ 1500 paires de bases dont la présence a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Suite à la digestion de ces fragments par les enzymes *Hin*P1I, *Rsa*1 et *Alu*1, trois patrons de digestion ont été générés pour chaque échantillon (figure 3). La comparaison entre les différents patrons a permis la séparation des isolats selon le génotype ce qui a conduit à 15 profils différents. Sur la figure 3a, (*Hin*P1I) on remarque que les profils 2 et 6, 5 et 12, ainsi que 8 et 9 sont similaires. Cependant, ceux-ci sont différents dans la figure 3c (*Alu*1). Sur la figure représentant les profils de digestion par *Rsa*1, on remarque que les profils 1, 5, 8, 9 et 15 ainsi que les profils 4 et 10 sont similaires. Lorsqu'on observe les profils de digestion *Hin*P1I, les profils 1, 5 et 15 ainsi que les profils 4 et 10 diffèrent entre eux tandis que les profils 8 et 9 sont toujours similaires. Sur la figure 3c (*Alu*1) cependant, ces deux profils sont différents. Sur la figure présentant la digestion

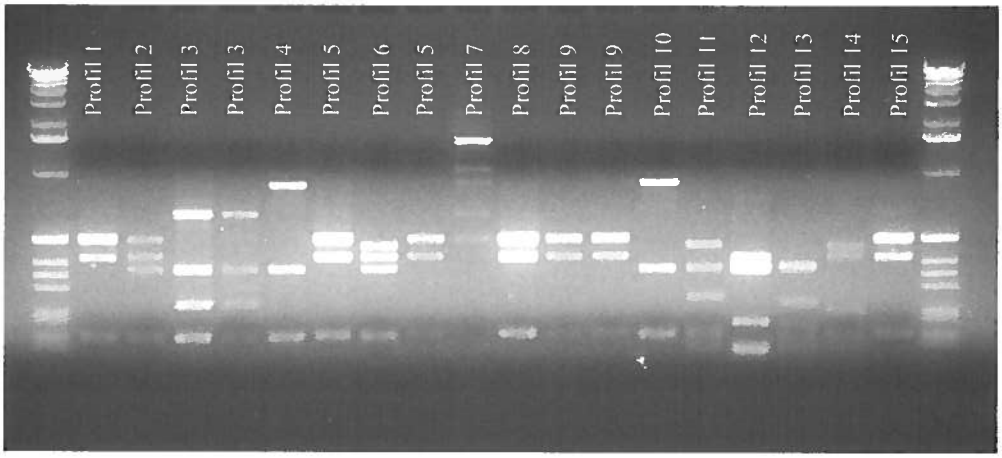
Figure 3 : **Migration sur gel d'agarose du produit des digestions *Hin*P1I, *Rsa*1 et *Alu*1 du gène de l'ARNr 16S amplifié par PCR pour les 15 différents profils isolés**

a) Digestion de l'ADNr 16S par *Hin*P1I
b) Digestion de l'ADNr 16S par *Rsa*1
c) Digestion de l'ADNr 16S par *Alu*1

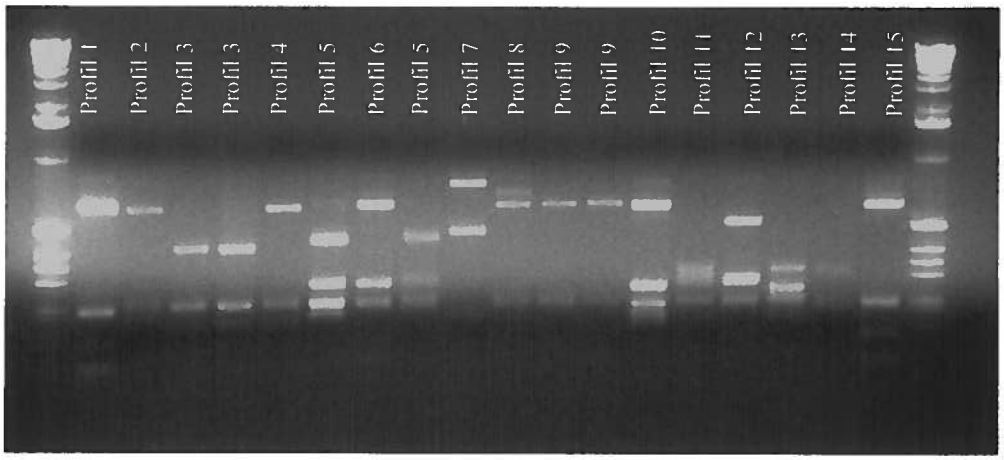
3a) Digestion de l'ADNr 16S par *Hin*P1I



3b) Digestion de l'ADNr 16S par *Rsa*1



3c) Digestion de l'ADNr 16S par *Alu*1



*Alu*1, les profils 1, 4, 9 et 15 ainsi que 6 et 10 sont similaires. Sur la figure 3b, cependant, ces profils sont différents à l'exception des profils 1 et 9 qui sont différents lorsque digérés par *Hin*P1I (figure 3a).

3.4.3 Clonage et séquençage de l'ADNr 16S

Un seul représentant pour chacun des profils a été choisi pour le clonage du produit PCR et le séquençage du gène de l'ARNr 16S à l'exception des profils 5 et 9 où deux représentants ont été soumis au séquençage. Le séquençage a été effectué à l'aide des amorces propres au plasmide utilisé pour le clonage, ce qui a généré des séquences d'environ 500 pb à chaque extrémité du gène. Dans un seul cas (profil 9b), la séquence complète du gène a été obtenue en utilisant les mêmes amorces. Le tableau 6 présente les homologies les plus élevées obtenues par la comparaison de nos séquences dans le logiciel FASTA. Les trois espèces bactériennes dont la séquence du gène de l'ARNr 16S a obtenu les plus hauts taux d'identité avec nos deux séquences et qui sont bien caractérisées dans la littérature sont indiquées en ordre d'homologie décroissant. La séquence 1 est la séquence contenant les nucléotides de l'amorce pA (positions 19-38 du gène de l'ARNr 16S de *Escherichia coli*), et la séquence 2 est celle contenant les nucléotides de l'amorce pH (positions 1541-1581 du gène de l'ARNr 16S de *Escherichia coli*). On y remarque que les pourcentages d'identité varient entre 85,421% et 100%.

Dans chacun des cas, l'identification qui a été retenue est celle qui obtenait le plus haut pourcentage d'homologie avec notre séquence et qui était la mieux caractérisée dans la littérature. Celle-ci est représentée en caractère gras dans le tableau 6. Dans les cas où les homologies ne permettent pas une identification à l'espèce, seul le genre est en caractère gras.

Dans le cas du profil 4, les deux espèces ayant la plus haute homologie avec nos séquences sont *P. gessardii* et *P. libanensis*. Cependant, puisque les homologies sont les mêmes pour ces deux espèces, seul le genre a été retenu. Deux représentants pour le profil 5 ont été soumis au séquençage. Dans le cas du profil 5a, les homologies avec *B. subtilis*

Tableau 6 : Homologies de nos séquences de l'ADNr 16S des bactéries isolées avec les séquences de la banque de données EMBL

Profil de restriction [1]	Séquence de la banque EMBL			Homologie avec nos séquences	
	Nom [2]	Numéro d'accès	Référence	Séquence 1	Séquence 2
1	***Staphylococcus succinus***	AF004219	Lambert *et al.*, 1998	97,581%	100%
	Staphylococcus aureus	AP003136	Kuroda *et al.*, 2001	95,484%	98,934%
	Staphylococcus piscifermentans	Y15753	Probst *et al.*, 1998	nd [3]	97,513%
2	***Bacillus cereus***	AF290547	Ticknor *et al.*, 2001	100%	99,606%
	Bacillus thuringiensis	AF290549	Ticknor *et al.*, 2001	99,825%	99,606%
	Bacillus weihenstephanensis	AB021199	Goto *et al.*, 2000	99,133%	99,094%
3	***Pseudomonas aeruginosa***	AE004844	Stover *et al.*, 2000	99,824%	100%
	Pseudomonas resinovorans	AB021373	Anzai *et al.*, 2000	Nd	99,312%
	Pseudomonas fragi	D84014	Anzai, Kudo et Oyaizu, 1997	96,991%	97,483%
4	***Pseudomonas gessardii***	AF074384	Verhille *et al.*, 1999	99,820%	99,421%
	Pseudomonas libanensis	AF057645	Dabboussi *et al.*, 1999	99,820%	99,421%
	Pseudomonas azotoformans	D84009	Anzai, Kudo et Oyaizu, 1997	99,288%	99,426%
5a	***Bacillus subtilis***	Z99104	Kunst *et al.*, 1997	98,630%	99,371%
	Bacillus vallismortis	AB021198	Goto *et al.*, 2000	98,383%	99,362%
	Bacillus mojavensis	AB021191	Goto *et al.*, 2000	98,601%	99,149%
5b	*Bacillus subtilis*	Z99104	Kunst *et al.*, 1997	95,152%	97,542%
	Bacillus atrophaeus	AB021181	Goto *et al.*, 2000	95,164%	98,292%
	Bacillus vallismortis	AB021198	Goto *et al.*, 2000	95,274%	97,516%
6	***Bacillus megaterium***	AF142677	Kunnimalaiyaan *et al.*, 2001	99,346%	100%
	Bacillus flexus	AB021185	Goto *et al.*, 2000	98,182%	98,864%
	Bacillus halodurans	AP001509	Takami *et al.*, 2000	91,176%	96,082%
7	***Bacillus halodenitrificans***	AB021186	Goto *et al.*, 2000	90,853%	95,709%
	Bacillus marismortui	AJ009793	Arahal *et al.*, 1999	90,812%	95,169%
	Bacillus naganoensis	AB021193	Goto *et al.*, 2000	86,781%	94,394%
8	***Staphylococcus aureus***	AP003130	Kuroda *et al.*, 2001	96,716%	98,783%

1 = profils tels que définis à la figure 3, 2 = les noms en caractères gras sont ceux ayant été retenus pour l'identification du profil, 3 = non disponible

Tableau 6 : Homologies de nos séquences de l'ADNr 16S des bactéries isolées avec les séquences de la banque de données EMBL (suite)

Profil de restriction [1]	Séquence de la banque EMBL			Homologie avec nos séquences	
	Nom [2]	Numéro d'accès	Référence	Séquence 1	Séquence 2
8	*Staphylococcus succinus*	AF004220	Lambert *et al.*, 1998	95,731%	98,783%
	Staphylococcus muscae	S83566	Hajek *et al.*, 1992	nd [3]	98,087%
9a	***Staphylococcus aureus***	AP004828	Baba *et al.*, 2002	96,910%	98,883%
	Staphylococcus succinus	AF004220	Lambert *et al.*, 1998	96,441%	99,069%
	Staphylococcus schleiferi	S83568	Hajek *et al.*, 1992	Nd	98,699%
9b	*Staphylococcus aureus*	AP004829	Baba *et al.*, 2002	97,729%	nd
	Staphylococcus succinus	AF004219	Lambert *et al.*, 1998	97,471%	nd
	Staphylococcus piscifermentans	Y15753	Probst *et al.*, 1998	96,950%	nd
10	***Enterococcus mundtii***	AF061013	Patel *et al.*, 1998	99,650%	99,844%
	Enterococcus hirae	Y17302	Stakebrandt *et al.*, 1999	97,938%	99,529%
	Enterococcus avium	AF061008	Patel *et al.*, 1998	96,120%	99,533%
11	***Kocuria palustris***	Y16263	Kovacs *et al.*, 1999	100%	99,443%
	Kocuria erythromyxa	Y11330	Rainey *et al.*, 1997	95,963%	95,652%
	Micrococcus roseus	X87756	Stakebrandt *et al.*, 1995	95,795%	95,506%
12	*Flavobacterium ferrugineum*	M62798	Woese *et al.*, 1990	87,937%	89,583%
	Flexibacter sancti	M62795	Woese *et al.*, 1990	85,263%	88,000%
	Chitinophaga pinensis	AF078775	Sly, Taghavi et Fegan, 1999	85,421%	86,331%
13	***Dietzia natronolimnaea***	X92157	Duckworth *et al.*, 1998	99,029%	99,180%
	Dietzia maris	X79290	Rainey *et al.*, 1995	97,767%	99,031%
	Tsukamurella paurometabola	AF283280	Kattar *et al.*, 2001	93,691%	95,611%
14	***Streptomyces somaliensis***	AJ007400	Kim *et al.*, 2000	99,634%	99,649%
	Streptomyces sampsonii	D63871	Takeuchi *et al.*, 1996	99,647%	99,491%
	Streptomyces felleus	Z76681	Hain *et al.*, 1997	99,632%	99,474%
15	***Staphylococcus succinus***	AF004220	Lambert *et al.*, 1998	99,324%	93,707%
	Staphylococcus muscae	S83566	Hajek *et al.*, 1992	96,441%	nd
	Staphylococcus aureus	AP004828	Baba *et al.*, 2002	94,764%	92,517%

1 = profils tels que définis à la figure 3, 2 = les noms en caractères gras sont ceux ayant été retenus pour l'identification du profil, 3 = non disponible

sont élevées mais puisque ces homologies sont beaucoup moins élevées dans le cas du profil 5b, l'identification retenue est *Bacillus* sp.. Dans le cas du profil 7, le plus haut taux d'homologie obtenu est avec *Bacillus litoralis* (numéro d'accès : AJ309559). Cependant, cette séquence ne faisant pas l'objet d'une publication et les autres homologies étant trop faibles pour déterminer une espèce (tableau 6), l'identification retenue est *Bacillus* sp.. Le profil 12 obtient des homologies peu élevées (89,583% et moins) avec des espèces bactériennes identifiées et publiées dans la littérature. C'est pourquoi l'identification de cette bactérie n'a pas été possible. Dans le cas du profil 15, une des deux séquences disponibles obtient une homologie de 99,324% avec *Staphylococcus succinus*. Cependant, la seconde séquence obtient seulement une homologie de 93,707% avec cette espèce, ce qui est trop peu élevé pour suggérer une relation au niveau de l'espèce. Dans ce cas, seul le genre a été retenu.

3.5 Comparaison des deux méthodes d'identification des bactéries et synthèse des résultats

3.5.1 Comparaison des deux méthodes d'identification

Le tableau 7 présente une comparaison des résultats d'identification obtenus avec les deux techniques utilisées (galeries API et séquençage de l'ADNr 16S). On y remarque que les identifications au niveau de l'espèce concordent entre les deux techniques pour deux identifications soient *Bacillus cereus* (profil 2, regroupant les groupes phénotypiques 6, 7, 23 et 46) et *Pseudomonas aeruginosa* (profil 3, regroupant les groupes phénotypiques 10, 11, 12, 16 et 38). Au niveau du genre seulement, les identifications sont les mêmes dans le cas de 8 profils (4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 et 15) regroupant 34 groupes phénotypiques. Les morphologies sur gélose et en microscopie optique d'un représentant de chacun des profils sont présentées à la figure 4.

Le profil 1 (isolat 8:2), un coque Gram positif (figure 4a) qui n'avait pu être identifié par le système API, est identifié comme étant *Staphylococcus succinus* avec une certitude élevée lorsque le séquençage de l'ADNr 16S est utilisé. Dans le cas du profil 4 l'identification par le système API mène à un pourcentage d'identité élevé (99,9% pour *P.*

Tableau 7 : Comparaison des résultats d'identification obtenus avec le système API et avec la séquence de l'ADNr 16S

Système API			Séquence d'ADNr 16S			
Identification	Groupe	Pourcentage d'identification	Identification	Profil	Pourcentage d'identité [1]	Pourcentage d'identité [2]
Bacillus cereus	6	66,5	*Bacillus cereus*	2	100	99,606
Bacillus cereus	7	66,5	*Bacillus cereus*	2	100	99,606
Bacillus cereus	23	95,5	*Bacillus cereus*	2	100	99,606
Bacillus cereus	46	66,5	*Bacillus cereus*	2	100	99,606
Bacillus licheniformis	22	86,4	*Bacillus megaterium*	6	99,346	100
Bacillus pumilus	21	99,9	*Bacillus* sp.	5	- [3]	-
Bacillus pumilus	25	99,9	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus pumilus	26	99,9	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus pumilus	43	99,9	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus pumilus	44	99,9	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus sphaericus	35	83,0	*Streptomyces somaliensis*	14	99,634	99,649
Bacillus stearothermophilus	30	99,9	*Bacillus* sp.	7	-	-
Bacillus stearothermophilus	39	99,1	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus stearothermophilus	42	91,5	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	1	99,0	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	2	97,8	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	4	95,9	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	5	98,9	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	8	99,5	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	14	95,2	*Bacillus* sp.	5	-	-
Bacillus subtilis	24	99,8	*Bacillus* sp.	5	-	-
Kocuria varians	27	79,6	*Kocuria palustris*	11	100	99,443
Lactococcus lactis lactis	34	48,7	*Enterococcus mundtii*	10	99,650	99,844
Micrococcus sp.	31	99,1	*Dietzia natronolimnae*	13	99,029	99,180

1 = séquence 1, 2 = séquence 2, 3 = pourcentage d'identité non défini

Tableau 7 : Comparaison des résultats d'identification obtenus avec le système API et avec la séquence de l'ADNr 16S (suite)

Système API			Séquence d'ADNr 16S			
Identification	Groupe	Pourcentage d'identification	Identification	Profil	Pourcentage d'identité [1]	Pourcentage d'identité [2]
Pseudomonas aeruginosa	10	99,5	*Pseudomonas aeruginosa*	3	99,824	100
Pseudomonas aeruginosa	11	99,5	*Pseudomonas aeruginosa*	3	99,824	100
Pseudomonas aeruginosa	12	99,5	*Pseudomonas aeruginosa*	3	99,824	100
Pseudomonas aeruginosa	16	99,5	*Pseudomonas aeruginosa*	3	99,824	100
Pseudomonas aeruginosa	38	99,1	*Pseudomonas aeruginosa*	3	99,824	100
Pseudomonas fluorescens	32	99,9	*Pseudomonas* sp.	4	- [3]	-
Pseudomonas fluorescens	33	99,9	*Pseudomonas* sp.	4	-	-
Ralstonia pickettii	47	95,1	*Pseudomonas* sp.	4	-	-
Staphylococcus epidermidis	45	80,8	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus hominis	41	3,7	*Staphylococcus aureus*	8	96,716	98,783
Staphylococcus lugdunensis	36	85,4	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus saprophyticus	9	88,7	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus saprophyticus	13	15,3	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus saprophyticus	15	88,7	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus saprophyticus	19	46,6	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus saprophyticus	28	88,7	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus warneri	3	95,0	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus warneri	18	95,0	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus warneri	37	96,5	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus warneri	40	46,8	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus xylosus	17	99,8	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883
Staphylococcus xylosus	20	19,5	*Staphylococcus* sp.	15	-	-
Staphylococcus xylosus	29	19,5	*Staphylococcus aureus.*	9	96,910	98,883

1 = séquence 1, 2 = séquence 2, 3 = pourcentage d'identité non défini

Figure 4 : Bactéries isolées

Photographies prises sur gélose et en microscopie optique (agrandissement 1000 X) suite à une coloration Gram.

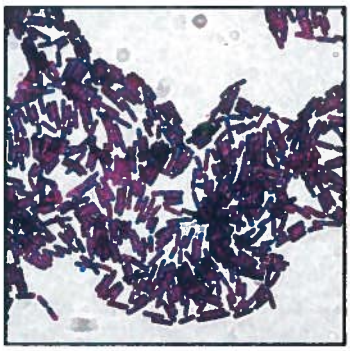
a) *Staphylococcus succinus*
Bacillus cereus
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas sp.

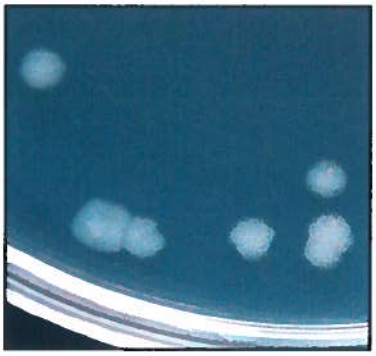
b) *Bacillus* sp.
Bacillus sp.
Bacillus megaterium
Bacillus sp.

c) *Staphylococcus aureus*
Staphylococcus sp.
Enterococcus mundtii
Kocuria palustris

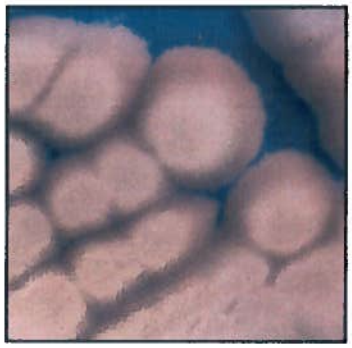
d) Bactérie non identifiée
Dietzia natronolimnae
Streptomyces somaliensis
Staphylococcus sp.

nd

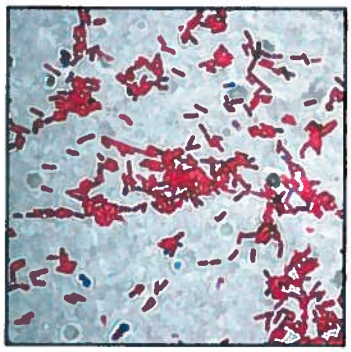


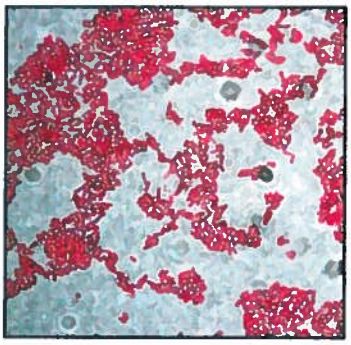


Profil 1
Isolat 8:2
Staphylococcus succinus



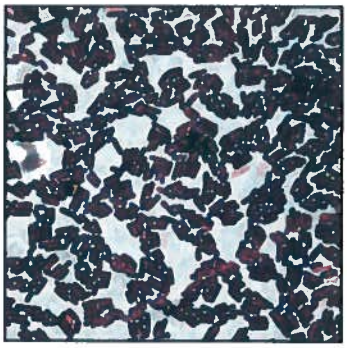
Profil 2, groupe 7
Isolat 1
Bacillus cereus

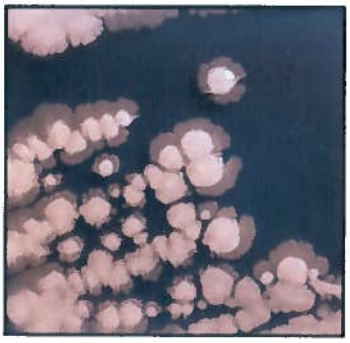




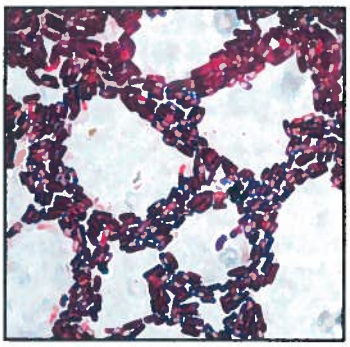
Profil 3, groupe 11
Isolat 3:3
Pseudomonas aeruginosa

Profil 4, groupe 32
Isolat 7:3
Pseudomonas sp.

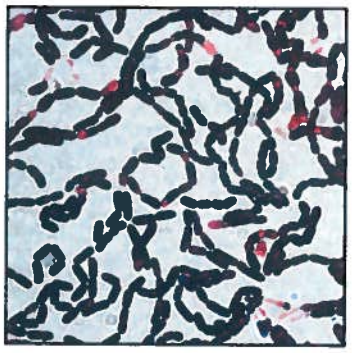


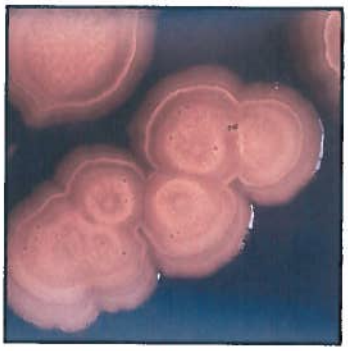


Profil 5b, groupe 25
Isolat 6:15
Bacillus sp.

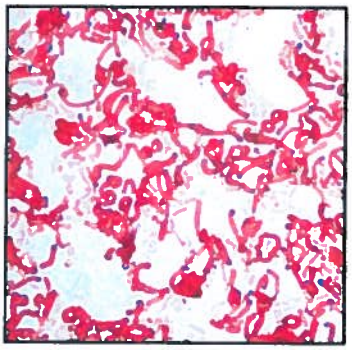


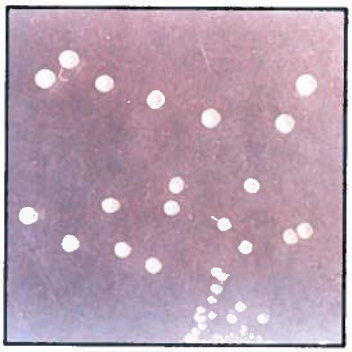
Profil 5a, groupe 2
Isolat 5
Bacillus sp.



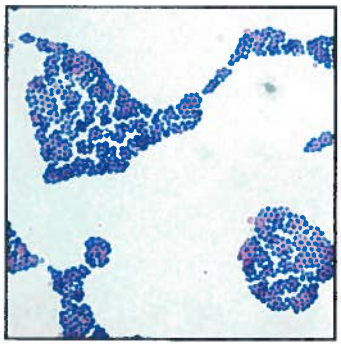


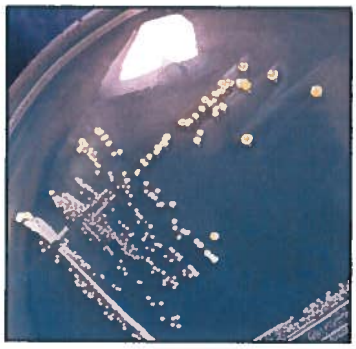
Profil 6, groupe 22
Isolat 1:1
Bacillus megaterium



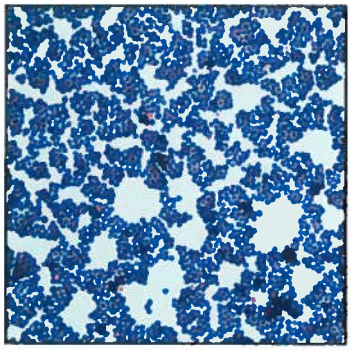


Profil 7, groupe 30
Isolat 6:21
Bacillus sp.

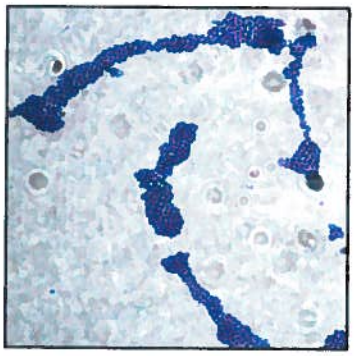




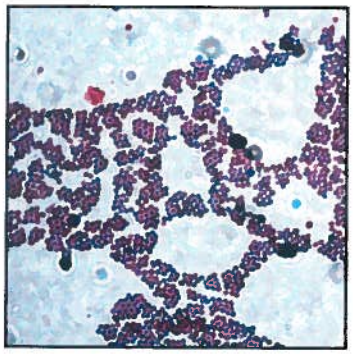
Profil 8, groupe 41
Isolat 11:5
Staphylococcus aureus



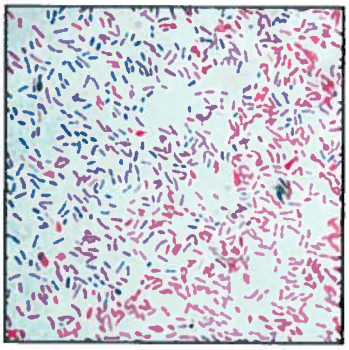
Profil 9, groupe 37
Isolat 11:1
Staphylococcus sp.



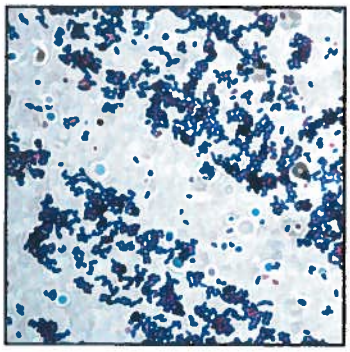
Profil 10, groupe 34
Isolat 8:3
Enterococcus mundtii



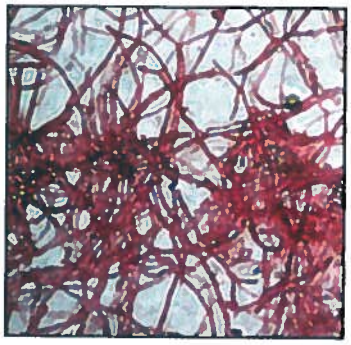
Profil 11, groupe 27
Isolat 6:18
Kocuria palustris

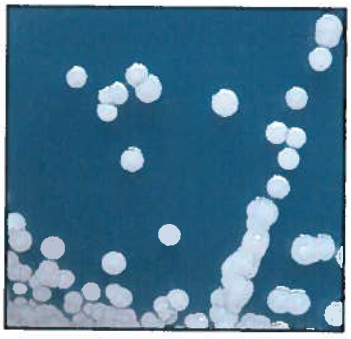


Profil 12
Isolat 7:5
Non identifiée

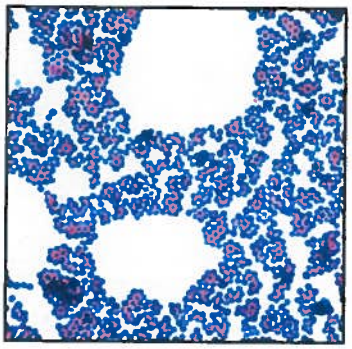


Profil 13, groupe 31
Isolat 6:22
Dietzia natronolimnae





Profil 14, groupe 35
Isolat 9:3
Streptomyces somaliensis



Profil 15, groupe 17
Isolat 5:4
Staphylococcus sp.

fluorescens). Cependant, lorsque la séquence de l'ADNr 16S est comparée avec les séquences de la base de données, il est impossible de déterminer l'espèce. Le genre seul est donc retenu. Le profils 5, contient 14 groupes phénotypiques identifiés *B. subtilis*, *B. pumilus* ou *B. stearothermophilus* par le système API. À la figue 4b, on voit clairement que deux des groupes contenus dans ce profil ont des morphologies très différentes. La technique de RFLP regroupant tous ces groupes sous le même profil, et la séquence d'ADNr 16S menant à l'identification du genre seulement, c'est *Bacillus* sp. qui a été retenu pour ce profil. Le profil 9 regroupe quant à lui 13 groupes phénotypiques. L'identification de ces groupes par le système API mène à 5 espèces différentes. La comparaison de la séquence de deux représentants du profil 9 mène à l'identification de *S. aureus*. Cependant, puisque plusieurs isolats identifiés différemment par le système API sont regroupés dans ce profil, et que pour certains d'entre eux, un test de coagulase négatif contredit l'identification de *S. aureus*, seul le genre a été retenu pour ce profil.

Dans le cas du profil 6, le pourcentage d'identification API étant inférieur au pourcentage d'homologie de l'ADNr 16S, l'identification retenue est *Bacillus megaterium*. Le même phénomène se produit dans le cas des profils 8, 10, 11 et 13 dont les identifications retenues sont respectivement : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus mundtii*, *Kocuria palustris* et *Dietzia natronolimnae*.

Le profil 7 est identifié par le système API comme appartenant à l'espèce *B. stearothermophilus*. Bien que la réaction de Gram semble négative, (figure 4b), le test de KOH est négatif et la production d'endospores est positive ce qui a pu mener à l'identification d'un *Bacillus*. La comparaison de la séquence de l'ADNr 16S avec les séquences de la littérature n'a pas permis de déterminer une espèce pour cet isolat. Cependant, puisque l'isolat a pu être cultivé à 37°C, tandis que *B. stearothermophilus* pousse à des températures supérieures à 40°C (Sneath, 1984), et que cette identification n'a pas été confirmée par des homologies de l'ADNr 16S, seul le genre a été retenu.

Le profil 12 quant à lui n'est pas identifié par l'une ou l'autre des deux techniques. Dans le cas du profil 14, la morphologie cellulaire s'apparente à celle du genre

Streptomyces (Figure 4). Cependant, ce genre n'est pas inclus dans la clé d'identification (figure 2) utilisée pour sélectionner le type de galerie API. Ceci a donc conduit à une identification erronée par cette approche. L'identification par la comparaison de l'ADNr 16S mène à l'identification de *Streptomyces somaliensis*, qui a été retenue. Dans le cas du profil 15 l'identification de *S. xylosus* par le système API n'a pas été confirmée par la comparaison de l'ADNr 16S. Le genre seul est donc retenu pour ce profil.

3.5.2 Synthèse des identifications

Le tableau 8 est une synthèse des résultats d'identification obtenus par le système API et le séquençage de l'ADNr 16S. Il présente les espèces bactériennes identifiées par catégorie de traitement (sans antibiotique, avec antibiotique et non infectés) ainsi que le pourcentage des lots dans lesquels celles-ci ont été retrouvées. On remarque que *B. cereus* est la seule espèce bactérienne qui se retrouve dans les trois traitements. Cette bactérie est retrouvée dans 85% des lots étudiés (11 lots sur 13) et n'est pas éliminée par l'ajout d'antibiotique dans la nourriture de l'insecte. L'ajout d'auréomycine mène à l'élimination de *Bacillus* sp. et de *P. aeruginosa* puisque celles-ci sont retrouvées seulement dans les lots sans antibiotiques (infectés et non-infectés). Les bactéries *E. mundtii*, *S. somaliensis* et *S. succinus* ont été retrouvées seulement en présence d'auréomycine. La présence du virus dans la diète artificielle des larves favorise l'apparition des bactéries suivantes : *B. megaterium*, *D. natronolimnae* et *K. palustris*, puisque celles-ci ne sont pas retrouvées dans les lots non-infectés et sont retrouvées dans les lots infectés sans antibiotique.

3.6 Isolement et identification des mycètes

A partir de tous les lots de production, 28 isolats ont été cultivés. Les isolats du lot initial sont numérotés de C1 à C3 et les isolats suivants sont numérotés de la façon suivante : numéro de lot C numéro de la souche. Parmi les 28 isolats, 20 ont pu être identifiés de sorte que 9 différentes espèces appartenant à trois genres ont été retrouvées.

Tableau 8 : Fréquence d'apparition des différentes espèces bactériennes identifiées selon les traitements

Espèce	Fréquence d'apparition (% des lots)		
	Sans antibiotique n=7	Avec antibiotique n=4	Non infectés n=2
Bacillus cereus	85,7	100	50,0
Bacillus megaterium	28,6	0	0
Bacillus sp.	71,4	0	100
Dietzia natronolimnae	14,3	0	0
Enterococcus mundtii	0	25,0	0
Kocuria palustris	14,3	0	0
Pseudomonas aeruginosa	71,4	0	50,0
Pseudomonas sp.	0	25,0	50,0
Staphylococcus aureus	0	0	50,0
Staphylococcus sp.	71,4	25,0	100
Staphylococcus succinus	0	25,0	0
Streptomyces somaliensis	0	25,0	0

Pour huit mycètes, il a été impossible d'obtenir, sur les milieux de culture utilisés, des structures de différentiation permettant l'identification.

3.6.1 Détermination du groupe et du genre

À l'aide de la clé de détermination des groupes, il a été établis que le groupe dont font partie les mycètes identifiés est le groupe des Deuteromycètes. Trois genres ont été identifiés à l'aide de la clé de détermination, soient *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*.

3.6.2 Détermination de l'espèce

Les espèces de champignons microscopiques identifiées de même que le nombre de lots dans lesquels elles ont été retrouvées sont présentés au tableau 9. L'espèce la plus fréquemment rencontrée est *Aspergillus japonicus* (46% des lots). Deux espèces semblent favorisées par la présence de l'antibiotique soient *Cladosporium sphaerospermum* et *Penicillium cyclopium*. Auncun mycète n'a été isolé des lots non infectés. La figure 5 présente les thalles sur gélose Sabouraud ainsi que les structures de reproduction caractéristiques des trois genres identifiés.

Tableau 9 : Fréquence d'apparition des différentes espèces mycéliennes identifiées selon les traitement

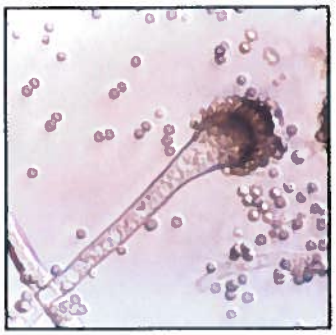
Espèce	Fréquence d'apparition (pourcentage des lots)		
	Sans antibiotique n = 7	Avec antibiotique n = 4	Non infecté n = 2
Aspergillus japonicus	71,4	25,0	0
Aspergillus parasiticus	14,3	0	0
Cladosporium cladosporioides	14,3	0	0
Cladosporium herbarum	14,7	0	0
Cladosporium sphaerospermum	0	25,0	0
Penicillium brevicompactum	14,3	0	0
Penicillium citrinum	14,3	0	0
Penicillium chrysogenum	14,3	0	0
Penicillium cyclopium	0	50,0	0
Penicillium simplicissimum	14,3	0	0

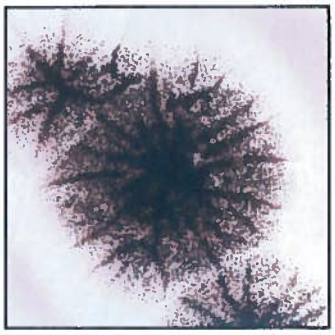
Figure 5 : Structures caractéristiques des trois genres de mycètes identifiés

Photographies prises sur gélose et en microscopie optique (agrandissement 400 X)

Penicillium
Aspergillus
Cladosporium

Penicillium





Aspergillus

Cladosporium

Chapitre 4
Discussion

4.1 Décompte viral

La production virale *in vivo* est le seul moyen de production du ChfuGV puisqu' aucune lignée cellulaire permissive n'est disponible pour sa multiplication. Cependant cette procédure mène à une grande variabilité dans la quantité de virus produits puisque celle-ci dépend de plusieurs facteurs difficiles à contrôler. Nos résultats supportent cet énoncé puisqu'une variabilité significative entre les lots (décompte viral) ($p \leq 0{,}0001$) a été observée. Cette variabilité peut être attribuable à l'état des insectes lors de leur réception (santé, infection par d'autres micro-organismes), à la rapidité de leur croissance ou à la quantité de virus utilisée pour l'infection. En effet, la suspension de ChfuGV utilisée pour l'infection doit être agitée régulièrement afin de maintenir les granules en suspension. Puisque cette opération a été effectuée par différents manipulateurs, la moindre différence dans la fréquence de resuspension peut devenir une source de variabilité importante.

Une différence de 13% sépare les lots sans antibiotique et avec antibiotique pour le décompte viral. Les analyses statistiques ont démontré que cette différence n'est pas significative ($p = 0{,}4017$). Au niveau de la production virale, l'utilisation d'un antibiotique pour le contrôle des contaminants microbiens n'a donc pas d'effet négatif.

4.2 Décompte des micro-organismes

La production de virus *in vivo* mène à un haut niveau de contamination par d'autres micro-organismes. En effet, sur les milieux agar nutritif, agar Sabouraud et agar R2A, les concentrations des micro-organismes pour les lots sans antibiotique sont de $6{,}87 \times 10^9$ UFC/ml, $5{,}09 \times 10^9$ UFC/ml et $6{,}32 \times 10^9$ UFC/ml, respectivement. Ces valeurs sont plus élevées que celles retrouvées dans le cas de *Spodoptera littoralis* ($2{,}49 \times 10^7$

UFC/ml) (Grzywacz *et al.*, 1997). La contamination du produit peut être, entre autres, liée à la flore microbienne des insectes. Comme l'insecte utilisé par Grzywacz *et al.* (1997) n'est pas le même que celui de la présente étude, la différence rapportée s'avère peu surprenante.

Nos résultats ont démontré une différence significative du décompte des micro-organismes sur milieux de culture entre les différents lots ($p \leq 0{,}0001$). Par exemple, pour les lots sans antibiotique, les valeurs du décompte des micro-organismes sur agar nutritif varient de $2{,}62 \times 10^7$ UFC/ml à $3{,}94 \times 10^{10}$ UFC/ml. Cette variabilité peut-être attribuée à l'état des larves lors de leur arrivée au laboratoire et/ou aux conditions de l'environnement de travail. Également, les manipulateurs peuvent transporter une flore transitoire qui peut être une source de variation dans la contamination du produit (Sikorowski et Lawrence, 1994).

Une différence significative est observée entre les différents milieux de culture utilisés ($p = 0{,}0004$). Cette différence est attendue puisque ces milieux sont conçus pour la croissance de différents groupes de micro-organismes (Atlas, 1997). Cependant, les analyses statistiques démontrent que seul le milieu R2A dans les lots avec antibiotiques varie significativement en comparaison aux deux autres milieux. Dans ce cas, les valeurs du décompte sont plus élevées sur le milieu R2A que sur les deux autres milieux. Ce milieu, dont le contenu en carbone organique est plus faible que dans le cas de l'agar nutritif, est conçu pour la croissance de bactéries dont les besoins sont moins élevés et qui sont inhibées par la présence de trop grandes quantités d'éléments nutritifs (Atlas, 1997). Par exemple, pour les échantillons d'eau, il est reconnu que le milieu R2A permet la croissance d'un plus grand nombre de bactéries que les milieux plus riches (American public health association, American water works association et Water environment federation, 1998).

Ces résultats indiquent également que le nombre de micro-organismes ayant poussé sur agar nutritif est similaire au nombre de micro-organismes ayant poussé sur agar Sabouraud. La gélose Sabouraud, conçue pour l'isolement des moisissures (Difco

laboratories, 1985), possède un pH de 4 ainsi qu'une haute concentration en sucre qui devraient empêcher la croissance de la majorité des bactéries (Atlas, 1997). Cependant, nos résultats indiquent que certaines bactéries sont capables de croître sur la gélose Sabouraud. En effet, la croissance de bactéries, particulièrement *Pseudomonas aeruginosa*, a été observée sur cette gélose. Il est reconnu que cette espèce peut croître à un pH pouvant atteindre 5,6 (Prescott, Harley et Klein, 1995). Nos résultats démontrent cependant que certaines souches de *P. aeruginosa* peuvent croître à des pH inférieurs.

Nos résultats ont également démontré que le nombre de micro-organismes diminue d'un même ordre de grandeur pour les milieux agar nutritif et agar Sabouraud lorsqu'un antibiotique est ajouté à la nourriture artificielle (Agar nutritif : diminution de $6,87x10^9$ UFC/ml à $3,3x10^6$ UFC/ml ; Agar Sabouraud : diminution de $5,09x10^9$ UFC/ml à $3,41x10^6$ UFC/ml). En effet, puisque des bactéries ont pu croître sur la gélose Sabouraud, il est normal que le nombre de micro-organismes diminue lorsqu'on ajoute un antibiotique. De plus, bien que l'auréomycine n'ait pas d'effet direct sur la croissance des moisissures, il est probable qu'il ait un effet indirect. En effet, il est possible qu'un insecte infecté par plusieurs micro-organismes soit plus susceptible d'être infecté par d'autres contaminants comme des moisissures. Il se peut également que la présence des bactéries accélère la mort des insectes laissant ainsi le champ libre aux moisissures opportunistes.

Les lots non infectés ne varient pas significativement avec les lots infectés (avec et sans antibiotique) bien qu'une différence de 99,7% soit observée entre les valeurs moyennes. Ce résultat est probablement dû au petit nombre de lots utilisés (deux lots) et à la grande variabilité observée entre les lots et entre les milieux de cultures pour ce même traitement. S'il fallait expliquer cette diminution des contaminants en absence de virus, ont pourrait penser que les insectes affaiblis par l'infection virale sont plus susceptibles d'être surinfectés par des bactéries ou mycètes. Il est également possible que des micro-organismes opportunistes se multiplient chez les insectes morts à la suite de l'infection virale (Ignoffo et Shapiro, 1978).

4.3 Comparaison des deux techniques d'identification des bactéries

L'identification des bactéries par le système API nécessite la croissance de la souche bactérienne isolée, la réalisation de tests préliminaires, l'inoculation de la galerie avec une suspension de la bactérie, la croissance de celle-ci dans la galerie et l'utilisation de réactifs pour l'identification correcte de la souche. Ces étapes sont effectuées dans une période de 72 à 144 heures tout dépendant de la souche à identifier. Dans certains cas, des tests supplémentaires ou la reprise de l'identification sur galerie sont nécessaires, augmentant le temps d'une période supplémentaire de 24 à 48 heures. Cependant, il faut noter que les résultats préliminaires ont réduit le nombre de profils de 124 à 47. L'identification par le séquençage du 16S nécessite l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S, la digestion des fragments par plusieurs enzymes de restriction, le clonage et le séquençage du gène. Bien que l'étape du clonage ne soit pas nécessaire, elle élimine la possibilité d'avoir plusieurs séquences différentes dans le mélange de PCR suite à une contamination. Ces étapes sont réalisées en 48 heures à l'exception du séquençage qui a été réalisé par une autre institution. Cette méthode offre l'avantage de pouvoir réaliser jusqu'à 96 réactions de PCR à la fois ce qui diminue le délai en comparaison des galeries API. De plus, le criblage par digestion enzymatique a diminué le nombre d'isolats de 124 à 15 ce qui représente une économie de temps au niveau du clonage et du séquençage.

Lorsqu'on observe les résultats d'identification par le système API et les identifications par le séquençage (tableau 7) il est possible de remarquer que dans le cas des profils 4, 5 et 9, plusieurs espèces différentes ont été identifiées par le système API alors que le RFLP décelait un seul profil. Puisque deux représentant des profils 5 et 9 ont été soumis au séquençage, une comparaison des séquences a été possible dans ces deux cas. Dans le cas du profil 5, les pourcentages d'homologie entre les séquences de 5a et 5b sont de 97,69% (pA) et de 94,98% (pH). Dans le cas du profil 9, l'homologie entre 9a et 9b est de 98,14% (pH). Ces résultats suggèrent une relation au niveau de l'espèce pour le profil 9 mais pas dans le cas du profil 5 (homologie inférieure à 97%). Dans ce cas, il est possible que malgré l'utilisation de trois enzymes qui reconnaissent des sites de 4 bases,

le criblage n'ait pas été suffisant pour discriminer entre deux espèces rapprochées. En effet, deux espèces différentes d'un même genre peuvent différer de seulement 45 bases au niveau de l'ADNr 16S regroupées dans des régions hypervariables (Stackebrandt et Goebel, 1994). Si les enzymes de restriction utilisées ne reconnaissent pas de bases au niveau des sites de variabilité, les deux isolats sont reconnus comme étant une seule et même bactérie. D'autres méthodes pour séparer les isolats auraient pu mener à un meilleur résultat comme la technique du DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) qui sépare des fragments de même longueur sur la base de leur contenu en acides nucléiques par un gradient de dénaturation et qui peut détecter une différence d'un seul nucléotide (Muyzer, 1999).

Parmi les 47 isolats repérés par les tests préliminaires, 34 ont été identifiés à l'espèce, par différentes galeries API, suite à l'incubation initiale, neuf ont été identifiés au genre et quatre ont démontré une faible discrimination. Il est intéressant de noter que des études ont déjà été effectuées pour l'identification de souches types par une galerie API (20E) et celles-ci ont démontré que cette galerie identifie correctement 74% des souches après la période d'incubation initiale (Robinson, McCarter et Tetreault, 1995). Parmi les 15 profils dont l'ADNr 16S a été séquencé, 10 profils ont été identifiés à l'espèce, quatre profils ont été identifiés au genre et un seul profil n'a pas été identifié.

Malgré les différences, les deux systèmes ont été mis à profit pour l'identification finale des isolats. Dans la majorité des cas, la technique du séquençage de l'ADNr 16S a fourni de meilleures indications quant à l'identité des bactéries.

Un des désavantages du système API se situe au niveau de la quantité de temps et de travail nécessaire pour arriver à une identification. Du côté de la technique moléculaire, le désavantage se situe au niveau de la technique de discrimination entre les isolats (RFLP). Une autre technique devra être utilisée si d'autres études de ce genre sont envisagées. De plus, peu de séquences parmi celles ayant le plus d'homologie avec nos séquences étaient publiées dans la littérature. Le caractère incomplet de la base de données représente une faiblesse de cette stratégie d'identification. Il faut cependant

souligner que la situation est pire dans le cas du système API puisque sa base de données contient principalement des souches cliniques. Peu de souches environnementales peuvent être identifiées par ce système. Par exemple, les bactéries *S. succinus* et *D. natronolimnae* retrouvées dans nos échantillons ne sont pas incluses dans la base de donnée API. Cet aspect, en particulier, fait en sorte que le séquençage de l'ADNr 16S est une méthode plus adaptée à l'identification de bactéries provenant d'échantillons d'insectes que le système API.

4.4 Souches bactériennes isolées

Deux espèces de *Bacillus* ont été identifiées dans nos produits viraux soient *B. cereus* et *B. megaterium* de même que certains isolats de *Bacillus* identifiés au genre seulement. *Bacillus cereus* est le micro-organisme le plus fréquemment isolé à partir de notre produit. Il a également été isolé en grande quantité dans des préparations virales provenant d'autres insectes (Belkosky, 1994; Grzywacz *et al.*, 1997; Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983). Cette bactérie, pathogène de *C. fumiferana* (Strongman *et al.*, 1997) pourrait provenir de la flore des insectes utilisés pour la production virale. Cette bactérie est également retrouvée dans différents environnements comme le sol, le lait, les céréales et autres aliments séchés (Sneath, 1984). La majorité des autres espèces de *Bacillus* sont des habitants du sol (Prescott, Harley et Klein, 1995). Plusieurs espèces de *Bacillus* ont également été isolées à partir d'insectes morts ou vivants (Inglis, Lawrence et Davis, 2000). *Bacillus subtilis*, qui a possiblement été isolé de nos lots (tableau 7, identifications API) a également été isolé dans des préparations virales produites chez la spongieuse (Belkosky, 1994; Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983). Puisque certains constituants de la nourriture artificielle de la spongieuse sont également utilisés pour la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Belkosky, 1994), on peut penser que cette bactérie serait introduite dans le produit via la nourriture artificielle.

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce bactérienne qui vient en second rang quant à la fréquence de sa présence dans nos lots de production. Elle est retrouvée particulièrement dans les lots sans antibiotique. Cette bactérie n'a pas été retrouvée dans

d'autres études sur la contamination de virus produits *in vivo* ce qui porte à croire qu'elle proviendrait de l'insecte lui-même ou des manipulateurs. En effet, *P. aeruginosa* fait partie de la flore transitoire de la peau chez l'humain (Swartz, 2000). Elle est aussi rencontrée comme pathogène facultatif chez plusieurs insectes tant en milieu naturel qu'en insectarium (Banerjee et Dangar, 1995). Il semble que sa présence ne peut être attribuable plus à l'une ou à l'autre de ces sources. D'autre *Pseudomonas* ont été isolés dans les lots avec antibiotique et non infectés. Différentes espèces de *Pseudomonas* ont également été isolées dans des préparations de NPV de la spongieuse (Belkosky, 1994, Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983) particulièrement du groupe de *P. fluorescens*. Comme dans le cas de la production du NPV de la spongieuse (Belkosky, 1994), ces espèces pourraient provenir de certains constituants de la nourriture artificielle notamment le germe de blé, l'eau, la caséine et l'agar.

Plusieurs staphylocoques ont été isolés dans différents lots. Parmi ceux-ci, deux espèces ont été identifiées : *S. aureus* et *S. succinus*. La majorité des staphylocoques sont isolées à la surface de la peau chez les humains (Swartz, 2000). Ceux-ci représentent également 85-90% des bactéries isolées de l'air (Stetzenbach et Buttner, 2000). *Staphylococcus succinus* pour sa part a été isolée pour la première fois en 1998 à partir de résine de conifères durcie au cours du temps, nommée ambre, et est biochimiquement le plus semblable à *S. xylosus* (Lambert *et al.*, 1998). Aucune autre étude ne mentionne l'isolement de *S. succinus* à partir de virus produit *in vivo*. *Staphylococcus epidermidis* est le staphylocoque le plus fréquemment isolé dans les préparations de NPV provenant de la spongieuse ou du ver du cotonnier (Belkosky, 1994; Grzywacz, 1997; Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983).

Les autres espèces rencontrées ont été isolées une seule fois dans des lots différents. Elle comprennent *Dietzia natronolimnae*, *Enterococcus mundtii*, *Kocuria palustris*, et *Streptomyces somaliensis*. La bactérie *D. natronolimnae* a été isolée pour la première fois dans un lac alcalin, qu'on nomme lac de soda, en Afrique. Sa présence dans un de nos échantillons est inexpliquée bien qu'elle pourrait provenir de l'intestin de l'insecte où le pH est alcalin. *Enterococcus mundtii* a été découverte pour la première fois

en 1988 et depuis a été isolée chez des ruminants, dans les récoltes de fourrage et chez des patients hospitalisés et non hospitalisés (Cai, 1999; Kaufhold et Ferrieri, 1991; Laukova et Koniarova, 1995; Van Horn et Rodney, 1998). Cependant cette bactérie n'est pas reconnue comme ayant causé des épidémies nosocomiales (Van Horn et Rodney, 1998). Bien que cette bactérie n'aie jamais été isolée à partir d'insectes, plusieurs entérocoques sont retrouvés chez des lépidoptères particulièrement *E. faecalis* et *E. faecium* (Martin et Mundt, 1972) ce qui porte à croire que cette bactérie proviendrait de la flore normale des insectes. *Kocuria palustris* est une bactérie qu'on retrouve chez les plantes des milieux humides. Des bactéries du genre *Kocuria* ont déjà été retrouvées dans les aérosols d'environnement intérieurs (Gorny et Dutkiewicz, 2002). Cette bactérie pourrait s'être retrouvée dans un de nos lots via l'air du laboratoire. Le genre *Streptomyces* compte un seul organisme pathogène : *S. somaliensis*. Cette espèces, qui a été retrouvée dans un de nos lots, est responsable des actinomycétomes, une infection des tissus sous-cutanés responsables de lésions qui provoques des gonflements, des abcès et parfois une destruction osseuse en absence de traitement. Cependant, *S. somaliensis* ne fait pas partie des espèces ciblées par la réglementation de l'ARLA. Sa présence dans un de nos lots est inexpliquée.

4.5 Identification des mycètes

L'identification des moisissures nécessite beaucoup de travail et représente un défi que nous avons voulu relever pour augmenter nos connaissances de la microflore de notre produit. Cependant, huit mycètes qui ont été isolés de nos lots de production virale n'ont pu être identifiés. C'est pourquoi la liste présentée au tableau 9 n'est que partielle. La raison pour laquelle certaines espèces n'ont pu être identifiées est qu'il a été impossible d'obtenir des organes de différentiation, nécessaires à l'identification. Bien que différents milieux de cultures aient été utilisés, le manque de temps a fait en sorte qu'une partie seulement des moisissures a pu être correctement identifiées.

Parmi les espèces retrouvées, deux espèces ont été isolées dans plus d'un lot soit *Aspergillus japonicus* dans 6 lots et *Penicillium cyclopium* dans 2 lots. Les autres espèces ont été isolées seulement une fois dans différents lots.

Les deux espèces d'*Aspergillus* identifiées sont *A. japonicus* et *A. parasiticus*. Plusieurs espèces d'*Aspergillus* sont habituellement retrouvées dans l'environnement intérieur (Stetzenbach et Buttner, 2000). *Aspergillus parasiticus* est productrice d'aflatoxine, une substance cancérogène pour l'homme (Stetzenbach et Buttner, 2000). Certaines souches d'*A. japonicus* productrices d'aflatoxine ont également été isolées à partir de grains de riz (Begum et Samajpati, 2000). *Aspergillus niger*, une espèce très proche d'*A. japonicus* a été retrouvée dans des préparations de NPV chez la spongieuse (Podgwaite, Bruen et Shapiro, 1983). Il se pourrait que *A. japonicus* provienne du coton fromage utilisé pour le transport des larves de 2e stade. En effet, des structures similaires à celles retrouvées chez *A. japonicus* ont été observées sur le coton à fromage à la réception des larves. Quant à *A. parasiticus*, sa présence dans un de nos échantillons est inexpliquée.

Cinq espèces de *Penicillium* ont été isolées dans nos échantillons. Celles-ci sont : *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. cyclopium* et *P. simplicissimum*. Ces moisissures sont retrouvées dans des endroits très variables particulièrement dans l'environnement intérieur et les aliments (Sautour *et al.*, 2002; Verhoeff *et al.*, 1994 ; Vujanovic, Smoragiewicz et Krzysztyniak, 2001). L'isolement de ces moisissures dans nos échantillons pourrait être dû à leur présence dans l'environnement du laboratoire ou dans certains constituants de la nourriture artificielle.

Trois espèces de *Cladosporium* ont été isolées de nos échantillons. Il s'agit de *C. cladosporioides*, *C. herbarum* et *C. sphaerospermum*. Le genre *Cladosporium* est le plus commun des genres de moisissures retrouvés dans l'air et dans des systèmes de climatisation (Stetzenbach et Buttner, 2000). Il est probable que les différentes espèces de *Cladosporium* dans nos échantillons proviennent de l'air ambiant.

Afin d'identifier les huit isolats restants, des milieux de culture spéciaux favorisant l'apparition de structures différentiées et différentes températures de croissance pourraient être utilisés. De plus il est possible d'utiliser la même stratégie que dans le cas des bactéries c'est-à-dire l'amplification par PCR du gène de la petite sous-unité ribosomale (ARNr 18S) à l'aide d'amorces universelles pour les eucaryotes suivi du séquençage et de la comparaison des séquences avec les séquences disponibles dans la littérature.

4.6 Risques associés à l'utilisation d'un insecticide à base de ChfuGV

Le décompte des particules virales nécessite une purification qui passe par plusieurs étapes de centrifugation. Cependant, ces étapes étant fastidieuses et dispendieuses, elles sont peu intéressantes dans une optique de production à grande échelle d'un insecticide. Afin de pouvoir estimer la quantité de virus qui seraient présents dans un insecticide produit à grande échelle, le résultat du décompte viral doit être transformé en tenant compte du fait que 5 ml de virus purifié provient de 1 litre de broyat larvaire filtré. C'est d'ailleurs à partir de ce broyat larvaire que le décompte des bactéries a été effectué. Ainsi, le décompte viral dans le produit sans antibiotique a donné une valeur moyenne de $5{,}13 \times 10^{11}$ granules/ml qu'il convient de transformer pour obtenir la valeur de $2{,}56 \times 10^{9}$ granules/ml. Tel que mentionné plus tôt, dans les lots sans antibiotique, la quantité moyenne de micro-organismes contaminants est de $6{,}87 \times 10^{9}$ UFC/ml. La quantité de virus qui doit être appliquée dans l'environnement pour un contrôle efficace de la tordeuse des bourgeons de l'épinette est de 10^{8} granules/hectare (Guertin, communication personnelle). Ceci signifie que moins d'un millilitre par hectare de notre broyat doit être appliqué. La quantité de micro-organismes obtenue par hectare serait de moins de 7×10^{9} ce qui est bien peu en comparaison avec la quantité de micro-organismes présents dans l'environnement. Malgré le petit nombre de micro-organismes qui serait déposé dans l'environnement lors d'un traitement, il est essentiel de vérifier qu'aucun micro-organisme pathogène ne soit présent dans le produit (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 1998).

Toutes les bactéries isolées au cours de cette étude appartiennent au groupe de risque 1 de Santé Canada à l'exception de *B. cereus*, *P. areuginosa* et *S. aureus*. Ces bactéries appartiennent au groupe 2 qui comprend des organismes qui peuvent causer une maladie mais qui dans des conditions normales ne sont pas susceptibles de constituer un danger sérieux pour la collectivité et pour l'environnement (Santé Canada, 1996). Ces trois même bactéries sont réglementées par l'ARLA dans un produit antiparasitaire microbien (International commission on microbiological specification for foods, 1978).

Bacillus cereus peut causer des gastro-entérites lorsqu'elle est présente en grandes quantité dans la nourriture (Sneath, 1984). De plus, cette bactérie n'est pas éliminée de notre produit lorsque l'auréomycine est ajoutée à la nourriture artificielle. Une méthode alternative de contrôle devra être utilisée pour s'assurer l'absence de cette bactérie dans un insecticide à base de ChfuGV. Parmi les autres espèces de *Bacillus*, aucune ne représente un danger pour la santé à l'exception de *Bacillus subtilis*, qui peut être responsable de gastro-entérites, (Turnbull et Kramer, 1995). Cependant, cette espèce n'est pas réglementée par l'ARLA. *Pseudomonas aeruginosa*, pour sa part, peut être responsable d'infection de la peau, des voies respiratoires et des voies urinaires particulièrement chez les personnes donc l'immunité est affaiblie (Prescott, Harley et Klein, 1995). Cette bactérie est éliminée de nos lots par l'utilisation d'antibiotique. Parmi les espèces de *Staphylococcus* isolées, seule *S. aureus* est potentiellement pathogène. Elle peut être responsable d'empoisonnements alimentaires, d'infections de plaies, d'infections respiratoires, d'endocardite, de méningites et d'autres infections (Prescott, Harley et Klein, 1995). Cependant, cette bactérie a été retrouvée à une seule reprise dans nos lots de production et a été testée négativement pour la production de coagulase, une enzyme qui est responsable du pouvoir pathogène invasif. Les bactéries ne synthétisant pas de coagulase ne sont généralement pas considérées comme étant pathogènes (Prescott, Harley et Klein, 1995). Ceci dit, il faudra malgré cela développer une méthode pour s'assurer de l'absence de *Staphylococcus* coagulase positifs dans une production à grande échelle.

Certaines espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Cladosporium* peuvent causer des réactions allergiques (Stentzenbach et Buttner, 2000). Il a été également rapporté dans la littérature que certaines espèce d'*Aspergillus* et de *Penicillium* peuvent produire des toxines néfastes pour l'humain (Sage *et al.*, 2002). Certains *Cladosporium* sont également retrouvés dans des cas de nourriture gâtée et d'eau embouteillée contaminée (Cabral et Fernandez, 2002; Sautour *et al.*, 2002). Cependant, parmi les espèces de mycète retrouvées dans nos différents lots, aucune n'est considérée comme pouvant potentiellement causer une maladie chez l'humain par l'ARLA (International commission on microbiological specification for foods, 1978). Ils font tous partie du groupe de risque 1 de Santé Canada (Santé Canada, 1996).

La présente étude dresse un portrait des micro-organismes dominants présents dans des lots de virus produits *in vivo* chez la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Avant l'homologation d'un tel produit comme insecticide biologique, il faudra rechercher spécifiquement la présence de pathogènes par l'utilisation des méthodes utilisant des milieux spécifiques pour chacun des micro-organismes pathogènes recherchés. Ainsi, il pourra être prouvé hors de tout doute que ces pathogènes ne sont pas présents dans les lots de virus.

Bien qu'un grand nombre de bactéries aient été isolées et identifiées, il est probable que certaines bactéries ne pouvant pas pousser sur les milieux de culture utilisés aient été ignorées. Afin de dresser un portrait plus complet des espèces microbiennes en présences, il serait possible d'utiliser une stratégie d'identification qui ne serait pas dépendante de la croissance sur milieu de culture. Il s'agit d'une stratégie d'identification utilisant l'ADN total retrouvé dans le broyat larvaire à partir duquel le gène de l'ARNr 16S est amplifié par PCR à l'aide des amorces universelles. Il serait par la suite possible de construire une banque de clones contenant chacun un gène différent correspondant aux bactéries présentes même en quantités infimes. Les séquences de ces gènes pourraient fournir de nouvelles indications quant aux espèces présentes mais non viables sur milieux de culture. Cependant, contrairement à la recherche spécifique de pathogènes sur milieu

de culture spécifique, ce travail n'est pas requis du point de vue de la réglementation pour l'homologation d'un produit antiparasitaire microbien.

4.7 Méthodes de contrôle des contaminants

Tel que démontré par nos résultats, il existe des contaminants potentiellement pathogènes qui peuvent être présents dans une préparation de ChfuGV produite *in vivo*. En plus de ceux-ci, d'autres contaminants, qui ne sont pas pathogènes, sont présents. Les deux procédures utilisées lors de nos expériences (avec et sans antibiotique) ont entraîné des variations au niveau de la composition spécifique des bactéries. La présence d'auréomycine diminue de beaucoup le nombre et la variété de micro-organismes présents. Elle mène cependant à l'apparition d'espèces bactériennes qui profitent des éléments nutritifs rendus disponibles par l'absence des bactéries sensibles à l'auréomycine. Parmi celles-ci on compte *E. mundtii*, *S. succinus* et *S. somaliensis*. Il est important de souligner que l'auréomycine est insuffisant pour le contrôle des micro-organismes pathogènes puisque *B. cereus*, une des bactéries possiblement pathogène, est retrouvée dans les lots contenant de l'auréomycine. De plus, dans le contexte actuel où la résistance aux antibiotiques devient de plus en plus préoccupante, il convient de se questionner sur le bien fondé de l'utilisation d'un tel produit dans une production à grande échelle.

Une des stratégies à privilégier dans l'élimination des micro-organismes indésirables est le contrôle à la source de ces contaminants. En effet, si leur provenance est découverte, il pourrait être aisé de les éliminer par une simple étape de stérilisation ou par un changement dans la procédure de production *in vivo*. Une étude devrait donc être entreprise pour identifier la provenance de certains des micro-organismes indésirables afin de pouvoir les éliminer de cette façon.

Dans ce sens, des bactéries appartenant à l'espèce *B. cereus* ont été isolées à partir du coton à fromage utilisé pour la filtration du broyat larvaire (résultats non présentés). Sans prétendre éliminer complètement *B. cereus*, une simple stérilisation de ce matériel

pourrait diminuer la quantité de cette bactérie à un niveau acceptable. Des constituants de la nourriture artificielle qui peuvent contenir un certain niveau de contamination pourraient être stérilisés avant leur utilisation, diminuant ainsi les risques de contamination par les micro-organismes dans le processus de production virale. Afin de diminuer la contamination lors des manipulations, le port d'équipement approprié ainsi que le travail dans un environnement contrôlé pourrait être envisagés.

Malgré des efforts pour contrôler à la source la présence de micro-organismes dans le produit, il est possible que certains contaminants pathogènes provenant par exemple de la microflore de l'insecte soit tout de même présents. Dans un tel cas, il faudra penser à utiliser des méthodes alternatives pour éliminer ces micro-organismes. Des résultats ont démontré qu'une simple centrifugation des préparations virales était inefficace pour éliminer certains contaminants (Grzywacz, 1997). Cette méthode ne peut donc pas être envisagée. Une étape de filtration à travers un filtre de porosité laissant passer le virus mais retenant une certaine partie des contaminants pourrait être envisagée. Une telle procédure pourrait être envisageable à grande échelle mais pourrait également entraîner des pertes de virus.

Conclusion

Le manque d'informations sur les contaminants microbiens associés à une production virale *in vivo* chez *Choristoneura fumiferana* représente un sérieux problème pour le processus d'homologation de ce produit. En effet, cette information est essentielle afin de vérifier que l'utilisation d'un tel produit n'entraînera pas de problèmes de santé chez les humains, les animaux et l'environnement. Pour pallier à ce manque d'information, notre étude portait sur le dénombrement et l'identification des contaminants dominants présents dans différents lots de ChfuGV produits *in vivo*.

Nos résultats ont démontré une contamination importante des différents lots de ChfuGV. De plus, trois bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme ont été isolées de nos échantillons soient : *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Il est probable que les sources de contamination par ces trois micro-organismes soient le matériel utilisé lors de la production virale, les manipulateurs ou l'insecte lui-même. L'utilisation d'un antibiotique, l'auréomycine, communément utilisé dans l'élevage d'insectes en laboratoire mène à une diminution de la quantité et de la variété des contaminants présents sans affecter significativement la production virale. Cet antibiotique mène à l'élimination de *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, cet antibiotique ne parvient pas à éliminer *Bacillus cereus*. Pour cette raison et à cause de la possibilité que cette pratique mène à l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques, nous ne recommandons pas l'utilisation d'auréomycine afin de diminuer la présence de contaminants dans les lots de virus.

Dans les lots non infectés qui ont été utilisés comme témoins, une bactérie potentiellement pathogène a été retrouvée soit *Staphylococcus aureus*. Comme cette bactérie a été isolée à une seule reprise dans les lots non infectés, sa présence est moins préoccupante. Cependant, il faudra veiller à ne pas retrouver l'un ou l'autre de ces trois contaminants dans des préparations de virus provenant de larves infectées. Aucun mycète pathogène n'a été retrouvé dans nos lots de virus.

Deux méthodes ont été utilisées pour l'identification des bactéries : le système des galeries API de BioMérieux et le séquençage du gène de l'ARNr 16S amplifié par PCR. Nos résultats ont démontré que le séquençage de l'ADNr 16S est mieux adapté à l'identification de bactéries ne provenant pas d'échantillons cliniques. Le système API est limité par le manque de souches non cliniques dans la base de données.

Pour éliminer les contaminants retrouvés, il serait important d'identifier leur source afin de contrôler leur entrée au début du processus d'amplification virale. Par exemple, la stérilisation du matériel utilisé dans le processus de production virale, le port d'équipement adéquat par les manipulateurs et le travail dans un environnement contrôlé pourraient suffire à éliminer plusieurs contaminants indésirables. Si de telles techniques n'étaient pas suffisantes, il faudrait se tourner vers d'autre méthodes de purification comme par exemple, la filtration du produit.

Suite à ce projet, il sera important d'effectuer un dépistage des principaux pathogènes humains à l'aide de milieux de culture sélectifs. De plus, une vue plus complète des contaminants présents pourrait être fournie par l'utilisation d'une stratégie qui n'est pas dépendante de la croissance sur milieu de culture telle que l'amplification de l'ADNr 16S à partir de l'ADN total. Ces informations pourraient s'ajouter à nos résultats dans le but final de mener à l'homologation du ChfuGV comme insecticide biologique.

Liste des références

AGENCE DE RÉGLEMENTATION DE LA LUTTE ANTIPARASITAIRE. 1998. Lignes directrices sur l'homologaton des agents antiparasitaires microbiens et de leurs produits. PRO98-01. Division de la gestion des demandes d'homologation et de l'information. Ottawa.

AGENCE DE RÉGLEMENTATION DE LA LUTTE ANTIPARASITAIRE. 2001. Directive sur l'homologaton des agents antiparasitaires microbiens et de leurs produits. DIR2001-02. Division de la gestion des demandes d'homologation et de l'information. Ottawa.

AGRICULTURE ET AGRO-ALIMENTAIRE CANADA. 1993. Lignes directrices pour l'homologation des antiparasitaires microbiens. Projet de directive : Pro 93-04. Direction générale, Production et inspection des aliments. Ottawa.

ALAIN, R., L. Berthiaume et M. Trudel. 1989. «Microscopie électronique». Dans P. Payment et M. Trudel, (éd.). Manuel de techniques virologiques. Sillery : Presses de l'Université du Québec, p. 107-119.

ALLEN, D.C., L. Dorais et E.G. Kettela. 1984. «Survey and detection». Dans D.M. Schmitt, D.G. Grimble et J.L Searcy (éd.). Managing the spruce budworm in Eastern North America. Washington : Canusa, p. 21-36.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, American Water Works Association et Water Environment Federation. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20e edition.

ANZAI Y, Y. Kudo, H. Oyaizu. 1997. «The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera». International journal of systematic bacteriology. Vol. 47, numéro 2, p.249-251.

ANZAI Y., H. Kim, J.Y. Park, H. Wakabayashi, H. Oyaizu. 2000. «Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence». International journal of systematic and evolutionary microbiology. Vol 50, Numéro 4, p. 1563-1589.

ARAHAL D.R., M.C. Marquez, B.E. Volcani, K.H. Schleifer, A. Ventosa. 1999. «*Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea». International journal of systematic bacteriology. Vol. 49, numéro 2, p. 521-530.

ARMSTRONG, J.A. 1985. «Tactic and strategies for larval suppression and prevention of damage using chemical insecticides». Dans Sanders, C.J., R.W. Stark, E.J.

Mullins et J. Murphy (éd.). Recent advances in Spruce Budworm Research. Ottawa : Canusa, p. 302-315.

ATLAS, R.M., 1997. Handbook of microbiological media. Boca Raton : CRC Press, Inc. 1706 p.

BABA T, F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, K. Hiramatsu. 2002. «Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA». Lancet. Vol. 359, p. 1819-1827.

BAIDA N., A. Yazourh, E. Singer et D. Izard. 2001 «*Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters». Research in microbiology. Vol. 152, Numéro 5, p. 493-502.

BANERJEE, A. et T.K. Dangar, 1995. «*Pseudomonas aeruginosa*, a facultative pathogen of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*». World journal of microbiology and biotechnology. Vol. 11, p. 618-620.

BANQUE DE DONNÉES AUTOMATISÉE SUR LES MÉDICAMENTS. 2000. Chlortetracycline chlorhydrate. http://www2.biam2.org/www/Sub241.html.

BEGUM, F. et N. Samajpati. 2000. «Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds». Naturwissenschaften. Vol. 87, numéro 6, p. 275-277.

BELKOSKY, D.L. 1994. «Levels and species of aerobic and spore-forming bacteria associated with the *in vivo* production of the gypsy moth nuclear polyhedrosis virus (Dispavirus)». Canadian Forest Service, Forest Pest Management Institute. Sault-Sainte-Marie, Ontario.

BÉRARD, J. et M. Côté. 1996. Manuel de foresterie. Québec : Les presses de l'Université Laval. 1428 p.

BIOMÉRIEUX, 1997, APILAB Plus : Brochure technique. Marcy-l'Étoile : bioMérieux.

BIRD, F.T. 1959. «Polyhedrosis and granulosis causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens». Journal of insect pathology. Vol. 1, p. 406-430.

BLAIS, J.R. 1985. «The ecology of the eastern spruce budworm : A review and discussion». Dans Sanders, C.J., R.W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy (éd.). Recent advances in spruce budworm research. Ottawa : Canusa, p. 49-59.

BLISSARD, G.W. et G.F. Rohrmann. 1990. «Baculovirus diversity and molecular biology». Annual review of entomology. Vol. 35, p. 127-155.

BLISSARD, G.W. 1996. «Baculovirus-insect cell interactions». Cytotechnology. Vol. 20, p. 73-93.

BONNEAU G., C. Bordeleau, B. Boulet, M. Chabot, J.G. Davidson, J. Garneau, D. Moranville, P. Therrien. 1999. La tordeuse des bourgeons de l'épinette: approche de gestion intégrée des épidémies. Québec : Ministère des ressources naturelles. RN99-3072.

BOTTON, B., A. Breton, M. Fevre, S. Gauthier, P. Guy, J.P. Larpent, P. Reymond, J.J. Sanglier, Y. Vayssier et P. Veau. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2e édition. Paris : Masson. 512 p.

BUSSE, H.-J., E.B.M. Denner et W. Lubitz. 1996. «Classification and identification of bacteria : current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics». Journal of biotechnology. Vol. 47, p. 3-38.

CABRAL, D. et P. Fernandez. 2002. «Fungal spoilage of bottled mineral water». International journal of food microbiology. Vol. 30, numéro 72, p. 73-76.

CAI, Y. 1999. «Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation». Journal of dairy science. Vol. 82, numéro 11, p. 2466-2471.

CHARLTON, C.A. et L.E. Volkman. 1993. «Baculoviruses, vertebrate viruses, and cytoskeletons». Dans Beckage N.E., S.N. Thompson et B.A. Federici (éd.). Parasites and pathogens of insects (Volume 2). San Diego : Academic Press. p. 103-125.

CONSIGLI, R.A., D.L. Russel et M.E. Wilson. 1986. «The biochemistry and molecular biology of the granulosis virus that infects *Plodia interpunctella*». Current topics in microbiology and immunology. Vol. 131, p. 69-101.

CUNNINGHAM, J.C. 1985. «Biorationals for control of spruce budworms». Dans Sanders, C.J., R.W. Stark, E.J. Mullins et J. Murphy (éd.). Recent advances in spruce budworm research. Ottawa : Canusa, p. 320-349.

DABBOUSSI F, M. Hamze, M. Elomari, S. Verhille, N. Baida, D. Izard, H. Leclerc. 1999. «*Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters». International journal of systematic bacteriology. Vol. 49, numéro 3, p. 1091-1101.

DIFCO LABORATORIES. 1985. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10e edition. Michigan : Difco laboratories. 1155 p.

DUCKWORTH A.W., S. Grant, W.D. Grant, B.E. Jones et D. Meijer. 1998. «*Dietzia natronolimnaios* sp. nov., a new member of the genu *Dietzia* isolated from an east African soda lake». Extremophiles. Vol. 2, numéro 3, p. 359-366.

EAVES, G.E. et J.O. Mundt. 1960. «Distribution and characterization of *Streptococci* from insects». Journal of invertebrate pathology. Vol. 2, p. 289-298.

ECOBICHON, D.J., 1990. «Chemical management of forest pest epidemics : A case study». Biomedical and environmental sciences. Vol. 3, p. 217-239.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. 2002. http://www.ebi.ac.uk/fasta33/

FORTÉ, A.J., C. Guertin et J. Cabana. 1999. «Pathogenecity of a granulovirus towards *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae)». The canadian entomologist. Vol. 131, p. 725-727.

GORNY, R.L. et J. Dutkiewicz. 2002. «Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries». Annals of agricultural and environmental medecine. Vol. 9, numéro 1, p. 17-23.

GOUVERNEMENT DU CANADA. 1997. Guidelines for the notification and testing of new substances : Organisms. Environnement Canada. Ontario. 109 p.

GRISDALE, D.G. et G.G. Wilson. 1993. Guidelines for rearing spruce budworm. Service Canadien des forêts. Sault-Sainte-Marie, 6 p.

GRZYWACZ, D., D. McKinley, K.A. Jones et G. Moawad. 1997. «Microbial contamination in *Spodoptera litoralis* nucear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt». Journal of invertebrate pathology. Vol. 69, p. 151-156.

GUERTIN, C. 1995. Étude du potentiel insecticide de certains virus, du *Bacillus thuringiensis* et de certaines substances phagostimulantes contre les insectes defoliants de la forêt. Ministère des resources naturelles du Québec. Rapport sur l'avancement des travaux. Projet 10240S.

GURTNER, C., J. Heyrman, G. Pinar, W. Lubitz, J. Swings et S. Roelleke. 2000. «Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis». International biodeterioration and biodegradation. Vol. 46, p. 229-239.

HAIN T., N. Ward-Rainey, R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt, F.A. Rainey. 1997. «Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers». International journal of systematic bacteriology. Vol. 47, numéro 1, p. 202-206.

HAJEK V, W. Ludwig, K.H. Schleifer, N. Springer, W. Zitzelsberger, R.M. Kroppenstedt, M. Kocur. 1992. «*Staphylococcus muscae*, a new species isolated from flies». International journal of systematic bacteriology. Vol. 42, numéro 1, p. 97-101.

HARDIE, J.M. 1989. «Application of chemotaxonomic techniques to the taxonomy of anaerobic bacteria». Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum. Vol. 62, p. 7-14.

HEYRMAN, J.et J. Swings. 2001. «16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain». Systematic and applied microbiology. Vol. 24, Numéro 3, p. 417-422.

HOLMES, B., M. Costas, M. Ganner, S.L.W. On et M. Stevens. 1994. «Evaluation of Biolog system for identification of some Gram-negative bacteria of clinical importance». Journal of clinical microbiology. Vol. 32, Numéro 8, p. 1970-1975.

HOLT, J.G. (éd.), 1984-89. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore : Williams et Wilkins. 4v.

IGNOFFO, C.M. et M. Shapiro. 1978. «Characteristics of baculovirus preparations processed from living and dead larvae». Agriculture research service. p.186-188.

INGLIS, G.D., A.M. Lawrence et F.M. Davis. 2000. «Pathogens associated with Southwestern Corn Borer and Southwestern Stalk Borer (Lepidoptera : Crambidae)». Journal of economic entomology. Vol. 93, Numéro 6, p. 1619-1626.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. 1978. Microorganisms in foods : Their significance and methods of enumeration. ISBN 0-8020-2293-6. Toronto : University of Toronto Press. 434p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. 1986. Microorganisms in foods : Vol. 2. Sampling for microbiological analysis : Principles and specific applications. ISBN 0-8020-5693-8. Toronto : University of Toronto Press. 293 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. 2001. International commission on microbiological specification for foods. http://www.dfst.csiro.au/icmsf.htm.

JOHNSON, K.S., J.M. Scriber, J.K., Nitao et D.R. Smitley. 1995. «Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to three nontarget Lepidoptera in field studies». Environmental entomology. Vol. 24, numéro 2, p. 288-297.

KATTAR M.M., B.T. Cookson, L.D. Carlson, S.K. Stiglich, M.A. Schwartz, T.T. Nguyen, R. Daza, C.K. Wallis, S.L. Yarfitz, M.B. Coyle. 2001. «*Tsukamurella strandjordae* sp. nov., a proposed new species causing sepsis». Journal of clinical microbiology. Vol. 39, numéro 4, p. 1467-1476.

KAUFHOLD, A. et P. Ferrieri. 1991. «Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients». Journal of clinical microbiology. Vol. 29, numéro 5, p. 1075-1077.

KELLY, D.C. 1982. «Baculovirus replication». Journal of general virology. Vol. 63, p. 1-13.

KIM B., A.M. al-Tai, S.B. Kim, P. Somasundaram, M. Goodfellow. 2000. «*Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete». International journal of systematic and evolutionary microbiology. Vol. 50, numéro 2, p. 505-509.

KOVACS, G., J. Burghardt, S. Pradella, P. Schumann, E. Stackebrandt et K. Màrialigeti. 1999 «*Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*)». International journal of systematic bacteriology. Vol. 49, p. 167-173.

KUNNIMALAIYAAN M., D.M. Stevenson, Y. Zhou et P.S. Vary. 2001. «Analysis of the replicon region and identification of an rRNA operon on RT pBM400 of *Bacillus megaterium* QM B1551». Molecular microbiology. Vol. 39, Numéro 4, p. 1010-1021.

KUNST F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M.G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S.C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C.V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N.M. Carter, S.K. Choi, J.J. Codani, I.F. Connerton, N.J. Cummings, R.A. Daniel, F. Denizot, K.M. Devine, A. Dusterhoft, S.D. Ehrlich, P.T. Emmerson, K.D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E.J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B.J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C.R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M.F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S.M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R.P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.H. Park, V. Parro, T.M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A.M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S.J. Seror, P. Serror, B.S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa et A. Danchin. 1997. «The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*». Nature. Vol. 390, p. 249-256.

KURODA M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi et K. Hiramatsu. 2001. «Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*». Lancet. Vol. 357, p. 1225-1240.

LAMBERT, L.H., T. Cox, K. Mitchell, R.A. Rosello-Mora, C. Del Cueto, D.E. Dodge, P. Orkand et R.J. Cano. 1998. «*Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber». International journal of systematic bacteriology. Vol. 48, p. 511-518.

LAUKOVA, A. et I. Koniarova. 1995. «Survey of urease activity in ruminal bacteria isolated from domestic and wild ruminants». Microbios. Vol. 84, numéro 338, p. 7-11.

MARTIN, J.D. et J.O. Mundt. 1972. «*Enterococci* in insects». Applied microbiology. Vol. 24, p. 575-580.

MASSOL-DEYA, A.A., D.A. Odelson, R.F. Hickey et J.M. Tiedje. 1995. «Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis». Molecular microbial ecology manual, Vol. 3.3.2, p. 1-8.

MATTSON, W.J., G.A. Simmons et J.A. Witter. 1988. «The spruce budworm in eastern North America» Dans Berryman, A.A. (éd.). Dynamics of forest insect populations. New York : Plenum Publishing Corporation, p. 309-330.

MILLER, S.G. et R.D. Miller. 1996. «Infectious *Enterococcus* from *Heliotis virescens* x *H. subflexa* backross hybrid (Lepidoptera : Noctuidae)». Annals of the entomological society of america. Vol. 32, Numéro 8, p. 1970-1975.

MORIYA S., N. Ogasawara et H. Yoshikawa. 1985. «Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region». Nucleic acids research. Vol. 13, p. 2251-2265.

MURHAMMER, D.W. 1996. «Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture». Applied biochemistry and biotechnology. Vol. 59, p. 199-216.

MUYZER, G., 1999. «DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems». Current opinion in microbiology. Vol. 2, numéro 3, p. 317-322.

PATEL R., K.E. Piper, M.S. Rouse, J.M. Steckelberg, J.R. Uhl, P. Kohner, M.K. Hopkins, F.R. III Cockerill et B.C. Kline. 1998. «Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates». Journal of clinical microbiology. Vol. 36, Numéro 11, p. 3399-3407.

PODGWAITE, J.D., R.B. Bruen et M. Shapiro. 1983. «Microorganisms associated with production lots of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lep.: *Lymantriidae*)». Entomophaga. Vol. 28, Numéro 1, p. 9-16.

PRESCOTT, L., J.P. Harley et D.A. Klein. 1995. Microbiologie. Traduit de l'anglais par C.-M. Bacq-Calberg, J. Coyette, P. Hoet et M. Nguyen-Distèche. Bruxelles : DeBoeck Université, 1014 p.

PROBST, A.J., C. Hertel, L. Richter, L.Wassill, W. Ludwig, W.P. Hammes. 1998. «*Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. utilis subsp. nov». International journal of systematic bacteriology. Vol. 48, Numéro 3, 651-658.

RAINEY F.A., S. Klatte, R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt. 1995. «*Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*». International journal of systematic bacteriology. Vol. 45, numéro 1, p.32-36.

ROBINSON, A., Y.S. McCarter et J. Tetreault. 1995. «Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter system, API 20E system and Vitek Automicrobic system for identification of Gram-negative bacilli». Journal of clinical microbiology. Vol. 33, p. 364-370.

ROHRMANN, G. F. 1992. «Baculovirus structural proteins». Journal of general virology Vol. 73, p. 749-761.

ROSE, A.H. et O.H. Lindquist. 1994. Insectes des épinettes, du sapin et de la pruche de l'est du Canada. Ottawa : Groupe Communication Canada (éd.). 159 p.

ROYAMA, T. 1984. «Population dynamics of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*». Ecological monographs. Vol. 54, p. 429-462

SAGE, L., S. Krivobok, E. Delbos, F. Seigle-Murandi et E.E. Creppy. 2002. «Fungal flora and ochratoxin a production in grapes and musts from france». Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 50, numéro 5, p. 1306-1311.

SANTÉ CANADA. 1996. Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire. deuxième édition. Direction générale de la santé de la population et de la santé publique. Ottawa.

SANTÉ CANADA. 2001. Au sujet de l'ARLA. http://www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/francais/aboutpmra/about-f.html.

SAUTOUR, M., S.C. Mansur, C. Divies, M. Bensoussan et P. Dantigny. 2002. «Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds». Journal of industrial microbiology and biotechnology. Vol. 28. numéro 6, p. 311-315.

SERVICE CANADIEN DES FORÊTS (SCF). 2002. Lutte contre les ravageurs: biotechnologie au SCF. http://www.glfc.forestry.ca/index-fr/science/research/bactpa99_f.html.

SERVICE CANADIEN DES FORÊTS (SCF). 2000. La tordeuse des bourgeons de l'épinette 100 ans d'expertise au SCF. Ressources naturelles Canada. Québec.

SHAPIRO, M., C.D. Owens, R.A. Bell et H.A. Wood. 1981. «Simplified efficient system for *in vivo* mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus». Journal of economic entomology. Vol. 74, p. 341-343.

SHELTON, A.M., J.L. Robertson, J.D. Tang, C. Perez, S.D. Eigenbrode, H.K. Preisler, W.T. Wilsey et R.J. Cooley. 1993. «Resistance of diamondback moth Lepidoptera : Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field». Journal of economic entomology. Vol. 86, p. 697-705.

SIKOROWSKI, P.P. et A.M. Lawrence. 1994. «Microbial contamination and insect rearing». American entomologist. Vol. 40, Numéro 4, p. 240-253.

SLY L.I., M. Taghavi, M. Fegan. 1999. «Phylogenetic position of *Chitinophaga pinensis* in the *Flexibacter-Bacteroides-Cytophaga* phylum». International journal of systematic bacteriology. Vol. 49, numéro 2, p. 479-481.

SNEATH, P.H.A. 1984. «Endospore-forming Gram-Positive rods and cocci». Dans Holt, J.G. (éd.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore : Williams et Wilkins. p. 1104.

STACKEBRANDT, E. et B.M. Goebel. 1994. «Taxonomic note : A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology». International journal of systematic bacteriology. Vol. 44, numéro 4 p. 846-849.

STACKEBRANDT E, C. Koch, O. Gvozdiak, P. Schumann. 1995. «Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend». International journal of systematic bacteriology. Vol. 45, numéro 4, p. 682-692.

STACKEBRANDT E, P. Schumann, J. Swiderski, N. Weiss. 1999. «Reclassification of *Brevibacterium incertum* (Breed 1953) as *Desemzia incerta* gen. nov., comb.

nov». International journal of systematic bacteriology. Vol. 49, numéro 1, p. 185-188.

STETZENBACH, L.D. et M.P. Buttner. 2000. «Airborne microorganisms and indoor air quality». Dans Lederberg, J. (ed.). Encyclopedia of microbiology, volume 4. Californie : Academic press p. 116.

STOVER C.K., X.Q.T. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrener, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R.M. Lim, K.A. Smith, D.H. Spencer, G.K.S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S. Lory, M.V. Olson. 2000. «Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen». Nature. Vol. 406, p. 959-964.

STRONGMAN, D.B., E.S. Eveleigh, K. van Frankenhuyzen et T. Royama. 1997. «The occurrence of two types of entomopathogenic bacilli in natural populations of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*». Canadian journal of forest research. Vol. 27, p. 1922-1927.

SUSLOW, T.V., M.V. Schroth et M. Isaka. 1982. «Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining». Phytopathology. Vol. 72, p. 917-918.

SUUTARI, M., E. Ronka, U. Lignell, H. Rintala et A. Nevalainen. 2002. «Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from water-damaged buildings». FEMS Microbiology ecology. Vol. 39, Numéro 1, p. 77-84.

SWARTZ, M.N. 2000. «Skin microbiology». Dans Lederberg, J. (ed.). Encyclopedia of microbiology. volume 4. Californie : Academic press p. 271.

TAKEUCHI T., H. Sawada, F. Tanaka et I. Matsuda. 1996. «Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences». International journal of systematic bacteriology. Vol. 46,p. 476-479.

TALERICO, R.L. 1984. «General biology of the spruce budworm and its hosts». Dans Schmitt, D.M., D.G. Grimble et J.L. Searcy (éd.). Managing the spruce budworm in Eastern North America. Washington : Canusa. p. 1-10.

TANADA, Y. et R.T. Hess. 1991. «Baculoviridae. Granulosis viruses». Dans Adams, J.R. et J.R. Bonami (éd.). Atlas of invertebrate viruses. Boca Raton : CRC Press Inc, p. 227-257.

TICKNOR, L.O., A.B. Kolsto, K.K. Hill, P. Keim, M.T. Laker, M. Tonks, et P.J. Jackson. 2001 «Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates». Applied and environmental microbiology. Vol. 67, numéro 10, p. 4863-4873.

TOMPKINS, G.J. 1991. «Purification of invertebrate viruses». Dans Adams, J.R. et J.R. Bonami (éd.). Atlas of invertebrate viruses. Boca Raton : CRC Press Inc, p. 31-40.

TURNBULL, P.C.B. et J.M. Kramer. 1995. «*Bacillus*». Dans Murray, P.R. (éd.). Clinical microbiology. 6e edition. Washington : ASM Press, p. 349-356.

ULRIKE, E., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, et E.C. Bottger. 1989. «Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA». Nucleic acid research. Vol. 17, p. 7843-7853.

VAN HORNE, K.G. et K.M. Rodney. 1998. «Colonization and microbiology of the motile enterococci in a patient population». Diagnostic microbiology and infectious disease. Vol. 31, numéro 4, p. 525-350.

VERHILLE S., N. Baida, F. Dabboussi, M. Hamze, D. Izard, H. Leclerc. 1999. «*Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters». International journal of systematic bacteriology. Vol. 49, numéro 4, p. 1559-1572.

VERHOEFF, A.P., J.H. van Wijnen, E.S. van Reenen-Hoekstra, R.A. Samson , R.T. van Strien et B. Brunekreef. 1994. «Fungal propagules in house dust. II. Relation with residential characteristics and respiratory symptoms». Allergy. Vol. 49, numéro 7, p. 540-547.

VINCENT, P. 2000. «Quantification par PCR quantitative compétitif et détection par hybridation *in situ* du ChfuGV chez les larves de *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera : Tortricidae)». Mémoire de maîtrise. Québec. INRS-Institut Armand-Frappier.

VUJANOVIC V, W. Smoragiewicz et K. Krzysztyniak. 2001. «Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air». Environmental toxicology. Vol. 16, numéro 1, p. 1-8.

WATANABE K., M. Teramoto et S. Harayama. 1999. «An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process». Applied and environmental microbiology. Vol. 65, p. 2813-2819.

WOESE, C.R., O. Kandler et M.L. Wheelis. 1990. «Towards a natural system of organisms : proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 87, p. 4576-4579.

Appendices

Appendice A

Ingrédients entrant dans la composition de la nourriture artificielle pour l'élevage des larves de *Choristoneura fumiferana*

Ingrédients entrant dans la composition de la nourriture artificielle pour l'élevage des larves de *Choristoneura fumiferana* (Grisdale-Wilson, 1993)

Ingrédient	Compagnie	Numéro de catalogue	Numéro de lot	Quantité
Solution d'agar				
agar	Sigma	A-9915	49H02471	60g
eau distillée				2201ml
Solide				
caséine	BioServ	1100	3489.09	126g
cellulose	BioServ	3425	3276.04	18g
mélange de sels	BioServ	E8680	43050	36g
saccharose	épicerie			126g
germe de blé	épicerie			108g
choline chloridrique	Aldrich	C7,970-0	05930JY	3.6g
acide ascorbique	Sigma	A-0278	79H1131	14.4g
éthyl paraben	Sigma	H-2128	62H3467	5.4g
auréomycine*	BioServ	7120	1870.02	20g
Solution de vitamines				36.0ml
acide nicotinique	Aldrich	N 785-0	08002MZ	0.1g
pantothénate de calcium	Aldrich	25,972-1	06326KY	0.1g
riboflavine	Aldrich	R170-6	09419MZ	0.05g
thiamine hydrochloride	Aldrich	10,917-7	13131AZ	0.025g
pyridoxine hydrochloridrique	Aldrich	11,280-1	05230CZ	0.025g
acide folique	Sigma	F-7876	13H0408	0.025g
biotine	Sigma	B-4501	83H1095	0.002g
vitamine B-12	Sigma	V-2876	83H0186	0.0002g
eau distillée				100ml
Solution de KOH 4M				18ml
KOH	Sigma	P-6310	35H0249	22.4g
eau distillée				100ml
eau distillée				791ml

Appendice B

Ingrédients entrant dans la composition des milieux de cultures utilisés pour le dénombrement et l'identification des micro-organismes

Ingrédients entrant dans la composition des milieux de cultures utilisés pour l'isolement et l'identification des micro-organismes

Milieu de culture	Compagnie	Ingrédients	Concentration
Agar nutritif	Becton Dickinson	Digestion pancréatique de gélatine	5,0g/L
		Extrait de bœuf	3,0g/L
		Agar	15,0g/L
Agar R2A	Difco	Extrait de levure	0,5g/L
		Protéose peptone	0,5g/L
		Acides casaminés	0,5g/L
		Dextrose	0,5g/L
		Amidon soluble	0,5g/L
		Pyruvate de sodium	0,3g/L
		Phosphate de potassium dibasique	0,3g/L
		Sulfate de magnésium	0,05g/L
		Agar	15,0g/L
Agar Sabouraud dextrose	Becton Dickinson	Digestion pancréatique de caséine	5,0g/L
		Digestion peptique de tissus animaux	5,0g/L
		Dextrose	40,0g/L
		Agar	15,0g/L
Bouillon BHI (Brain Heart Infusion)	Becton Dickinson	Infusion de coeur de boeuf	250g/L
		Infusion de cerveau de veau	200g/L
		Protéose peptone	10g/L
		NaCl	5,0g/L
		$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,5g/L
		Glucose	2,0g/L

Ingrédients entrant dans la composition des milieux de cultures utilisés pour l'isolement et l'identification des micro-organismes

Milieu de culture	Compagnie	Ingrédients	Concentration
Agar MacConkey	Becton Dickinson	Digestion pancréatique de gélatine	17,0g/L
		Digestion pancréatique de caséine	1,5g/L
		Digestion peptique de tissus animaux	1,5g/L
		Lactose	10,0g/L
		Sels biliaires	1,5g/L
		Chlorure de sodium	5,0g/L
		Rouge neutre	0,03g/L
		Crystal violet	0,001g/L
		Agar	13,5g/L
Bouillon nutritif	Becton Dickinson	Digestion pancréatique de gélatine	5,0g/L
		Extrait de boeuf	3,0g/L
Milieu 2xYT	Difco	Digestion pancréatique de caséine	16,0g/L
		Extrait de levure	10,0g/L
		Chlorure de sodium	5,0g/L
Milieu SOC	Invitrogen	tryptone	2%
		Extrait de levure	0,5%
		NaCl	10 Mm
		KCl	2,5 Mm
		$MgCl_2$	10 Mm
		$MgSO_4$	10 Mm
		Glucose	20 Mm

Appendice C

Galerie API : Tests disponibles et réactifs nécessaires

Tests disponibles et réactifs nécessaires pour l'identification des *Staphylococcus* et *Micrococcus* par la galerie API Staph (BioMérieux)

Test	Réactifs (BioMérieux)
Acidification à partir du	
D-Glucose D-fructose D-Mannose Maltose Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Mélibiose	Aucun
Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 et NIT 2
Mise en évidence de la phosphatase alcaline	ZYM A et ZYM B
Production d'acétyl méthyl-carbinol	VP 1 et VP 2
Acidification à partir du	
Raffinose Xylose Saccharose α-méthyl-D-glucoside N-acétyl-glucosamine	Aucun
Mise en évidence de l'arginine dihydrolase	Aucun
Mise en évidence de l'uréase	Aucun

Tests disponibles et réactifs nécessaires pour l'identification des *Streptococcus* par la galerie API Strep (BioMérieux)

Test	Réactifs (BioMérieux)
Production d'acétoïne	VP 1 et VP 2
Hydrolyse	NIN
Mise en évidence de la β-glucosidase	Aucun
Mise en évidence de la pirrolidonyl arylamidase	ZYM a et ZYM B
Mise en évidence de l'α-galactosidase	Aucun
Mise en évidence de la β-glucoronidase	Aucun
Mise en évidence de la β-galactosidase	Aucun
Mise en évidence de la phosphatase alcaline	Aucun
Mise en évidence de la leucine arylamidase	Aucun
Mise en évidence de l'arginine dihydrolase	Aucun
Acidification à partir du	
Ribose L-Arabinose Mannitol Sorbitol Lactose Trehalose Inulin Raffinose Amidon Glycogène	Aucun

Composition de la galerie API 50 CH (BioMérieux) servant à l'identification des bactéries du genre *Bacillus*

Cupule 0-24	Cupules 25-49
Témoin	Esculine
Glycérol	Salicine
Erythriol	Cellobiose
D-Arabinose	Maltose
L-Arabinose	Lactose
Ribose	Melibiose
D-Xylose	Saccharose
L-Xylose	Trehalose
Adonitol	Inuline
B-Méthyl-D-Xyloside	Mélézitose
Galactose	Raffinose
Glucose	Amidon
Fructose	Glycogène
Mannose	Xylitol
Sorbose	Gentiobiose
Rhamnose	D-Turanose
Dulcitol	D-Lyxose
Inositol	D-Tagatose
Mannitol	D-Fucose
Sorbitol	L-Fucose
α-Méthyl-D-Mannoside	D-Arabitol
α-Méthyl-D-Glucoside	L-Arabitol
N-Acétyl-Glucosamine	Gluconate
Amygdaline	2-Céto-Gluconate
Arbutine	5-Céto-Gluconate

Tests disponibles et réactifs nécessaires pour l'identification des bactéries du genre *Bacillus* par la galerie API 20E (BioMérieux)

Test	Réactifs (BioMérieux)
Mise en évidence de la β-galactosidase	Aucun
Mise en évidence de l'arginine dihydrolase	Aucun
Mise en évidence de la lysine décarboxylase	Aucun
Mise en évidence de l'ornithine décarboxylase	Aucun
Utilisation du citrate	Aucun
Production d'H_2S	Aucun
Mise en évidence de l'uréase	Aucun
Mise en évidence de la triptophane désaminase	TDA
Production d'indole	JAMES
Production d'acétoïne	VP 1 et VP 2
Mise en évidence de la gélatinase	Aucun
Fermentation du glucose	Aucun

Tests disponibles et réactifs nécessaires pour l'identification des bacilles Gram négatifs non entérobactéries par la galerie API 20 NE (BioMérieux)

Test	Réactifs (BioMérieux)
Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 et NIT 2
Réduction des nitrates en azote	Zn
Formation d'indole	JAMES
Fermentation du glucose	Aucun
Mise en évidence de l'arginine dihydrolase	Aucun
Mise en évidence de l'uréase	Aucun
Hydrolyse de l'esculine	Aucun
Hydrolyse de la gélatine	Aucun
Mise en évidence de la β-galactosidase	Aucun
Assimilation du	
Glucose Arabinose Mannose Mannitol N-acétyl-glucosamine Maltose Gluconate Caprate Adipate Malate Citrate Phenyl-acétate	Aucun
Mise en évidence de la cytochrome-oxydase	OX

Appendice D

Composition des tampons utilisés lors de l'identification des bactéries par séquençage de l'ADNr16S

Composition des tampons utilisés pour l'identification des bactéries par l'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Tampon	Compagnie	Composition
Tampon *Taq* polymerase 10X	Stratagene	Tris-HCl 100 mM KCl 500 mM $MgCl_2$ 15 mM
NEBuffer 1 10X (Rsa 1)	New England BioLabs	Bis Tris Propane HCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM dithiothreitol 1 mM pH de 7,5
NEBuffer 2 10X (Hinp1I et Alu 1)	New England BioLabs	NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM dithiothreitol 1 mM pH de 7,9
NEBuffer *Eco*R1 10X	New England BioLabs	NaCl 50 mM Tris-HCl 100 mM $MgCl_2$ 10 mM Triton X-100 0,025% pH de 7,5
Tampon de ligation 10X	Invitrogen	Tris-HCl 60 mM pH de 7,5 $MgCl_2$ 60 mM NaCl 50 mM BSA 1mg/ml β-mercaptoethanol 70 mM ATP 1 mM dithiothreitol 20 mM spermidine 10 mM

Appendice E

Résultats des tests préliminaires à l'identification par le système API des bactéries isolées

Résultats des tests préliminaires à l'identification des bactéries isolées (système API et séquençage de l'ADNr 16S)

Souche	Gram	Morphologie	KOH	Catalase	Oxydase	Spores	fermentation du lactose	Utilisation du manitol	Groupe phénotypique	Profil RFLP
1[b]	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	7	2
2[b]	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	1	5a
3[a]	incertain	bâtonnets	-	-	n/a	nd	n/a	n/a	1	5a
4	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
5[a]	incertain	bâtonnets	-	-	n/a	+	n/a	n/a	2	5a
6	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	1	5a
7[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	3	9a
8[a]	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	4	5a
9[a]	incertain	bâtonnets	-	-	n/a	nd	n/a	n/a	5	5a
10[a]	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
11	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	1	5a
12	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	1	5a
13	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
14[a]	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	7	2
15	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	1	5a
16[a]	+	bâtonnets	n/a	-	n/a	+	n/a	n/a	8	5a
1:1	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	22	6
1:2[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	n/a	9	9a
2:1	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	11	3
2:2	+	bâtonnet	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	7	2
3:1	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
3:2[a,b]	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3
3:3[a]	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	11	3
3:4	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
3:5	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2

a = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe phénotypique, b = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe génotypique

Résultats des tests préliminaires à l'identification des bactéries isolées (système API et séquençage de l'ADNr 16S)

Souche	Gram	Morphologie	KOH	Catalase	Oxydase	Spores	fermentation du lactose	Utilisation du manitol	Groupe phénotypique	Profil RFLP
3:6	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	4	5a
3:7	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	1	5a
4:1	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
4:2[a]	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	12	3
4:3[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	13	9a
4:4	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	1	5a
4:5	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
4:6[a]	incertain	bâtonnets	-	-	n/a	nd	n/a	n/a	14	5a
4:7	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3
4:8[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	15	9a
5:1[a]	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	16	3
5:2	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3
5:3	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
5:4[a,b]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	17	15
5:5[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	18	9a
5:6	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
5:7[a,b]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	19	9a
5:8[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	20	9a
6:1	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	11	3
6:2	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	11	3
6:3	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3
6:4[a,b]	+	bâtonnets	n/a	+	-	nd	n/a	n/a	21	5b
6:5	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	11	3
6:6	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3
6:7	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3

a = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe phénotypique, b = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe génotypique

Résultats des tests préliminaires à l'identification des bactéries isolées (système API et séquençage de l'ADNr 16S)

Souche	Gram	Morphologie	KOH	Catalase	Oxydase	Spores	fermentation du lactose	Utilisation du manitol	Groupe phénotypique	Profil RFLP
6:8	-	bâtonnets	n/a	+	+	n/a	-	n/a	10	3
6:9[a,b]	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	22	6
6:10	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
6:11	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
6:12	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
6:13[a]	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	23	2
6:14[a]	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	24	5a
6:15[a]	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	25	5b
6:16[a]	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	26	5b
6:17	incertain	bâtonnets	-	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	1	5a
6:18[a,b]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	-	27	11
6:19[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	28	9a
6:20[a]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	+	29	9a
6:21[a,b]	-	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	30	7
6:22[a,b]	+	coques	n/a	+	-	n/a	n/a	-	31	13
7:1	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
7:2	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
7:3[a,b]	-	bâtonnets	n/a	n/a	nd	n/a	-	n/a	32	4
7:4[a]	-	bâtonnets	n/a	n/a	nd	n/a	-	n/a	33	4
7:5[b]	-	bâtonnets	n/a	n/a	-	+	n/a	n/a		12
7:6	-	bâtonnets	n/a	n/a	+	n/a	-	n/a	32	4
7:7	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	32	2
7:8	-	bâtonnets	n/a	n/a	nd	n/a	-	n/a	32	4
7:9	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
7:10	-	bâtonnets	n/a	n/a	+	n/a	-	n/a	32	4

a = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe phénotypique, b = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe génotypique

Résultats des tests préliminaires à l'identification des bactéries isolées (système API et séquençage de l'ADNr 16S)

Souche	Gram	Morphologie	KOH	Catalase	Oxydase	Spores	fermentation du lactose	Utilisation du manitol	Groupe phénotypique	Profil RFLP
7:11	-	bâtonnets	n/a	n/a	nd	n/a	-	n/a	32	4
8:1	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
8:2	+	coques	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a		1
8:3[a,b]	+	coques	n/a	-	nd	n/a	n/a	aucune croissance	34	10
8:4	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
8:5	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
8:6	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
8:7	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
8:8	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
8:9	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
8:10	+	coques	n/a	-	nd	n/a	n/a	aucune croissance	34	10
8:11	+	coques	n/a	-	nd	n/a	n/a	aucune croissance	34	10
8:12	+	coques	n/a	-	nd	n/a	n/a	aucune croissance	34	10
8:13	+	coques	n/a	-	nd	n/a	n/a	aucune croissance	34	10
9:1	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
9:2	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
9:3[a,b]	-	mycelium	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	35	14
9:4[a,b]	+	coques	n/a	+	nd	n/a	n/a	+	36	9b
9:5	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
9:6	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
10:1	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2

a = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe phénotypique, b = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe génotypique

Résultats des tests préliminaires à l'identification des bactéries isolées (système API et séquençage de l'ADNr 16S)

Souche	Gram	Morphologie	KOH	Catalase	Oxydase	Spores	fermentation du lactose	Utilisation du manitol	Groupe phénotypique	Profil RFLP
10:2	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
10:3	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
10:4	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
10:5	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
10:6	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
10:7	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
10:8	variable	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
10:9	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	6	2
11:1[a]	+	coques	n/a	+	nd	n/a	n/a	+	37	9a
11:2[a]	-	bâtonnets	n/a	n/a	+	n/a	-	n/a	38	3
11:3[a]	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	39	5b
11:4[a]	+	coques	n/a	+	nd	n/a	n/a	+	40	9a
11:5[a,b]	+	coques	n/a	+	n/a	n/a	n/a	+	41	8
11:6[a]	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	42	5b
11:7	-	bâtonnets	n/a	n/a	nd	n/a	-	n/a	38	3
12:1[a]	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	43	5b
12:2[a]	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	44	5b
12:3	+	bâtonnets	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a	43	5b
12:4[a]	+	coques	n/a	+	nd	n/a	n/a	–	45	9a
12:5	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
12:6[a]	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	46	2
12:7	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	+	n/a	n/a	6	2
12:8	+	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	nd	n/a	n/a	46	2
12:9[a]	-	bâtonnets	n/a	n/a	+	n/a	-	n/a	47	4
12;10	-	bâtonnets	n/a	n/a	+	n/a	-	n/a	32	4
12:11	-	bâtonnets	n/a	n/a	n/a	n/a	-	n/a	32	4

a = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe phénotypique, b = souche ayant été utilisée comme représentant du groupe génotypique