

Université de Montréal

**Mode d'action moléculaire de la toxine anti-tumorale
PS1Aa2 du bacille de Thuringe**

par
Gabriel Narvaez

Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en physiologie
Option biophysique

Janvier 2014

© Gabriel Narvaez, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Mode d'action moléculaire de la toxine anti-tumorale PS1Aa2 du bacille de Thuringe

Présenté par :
Gabriel Narvaez

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nazzareno D'Avanzo, président-rapporteur
Jean-Louis Schwartz, directeur de recherche
Jean-Charles Côté, membre du jury

Résumé

Les parasporines sont des toxines Cry du bacille de Thuringe actives contre des cellules tumorales. Ce travail montre que la parasporine PS1Aa2 (Cry31Aa2) forme des pores dans des membranes artificielles, comme de nombreuses toxines Cry. Ceux-ci ont plusieurs niveaux de conductance dont les plus fréquents étaient de 11, 16 et 21 pS dans une solution de 150 mM KCl. Nos résultats de microspectrofluorométrie avec la sonde Fura-2 montrent que la présence de la PS1Aa2 peut produire des augmentations du calcium intracellulaire, la plupart du temps sous la forme d'oscillations calciques et parfois des augmentations soutenues. Ces réponses ont été observées en présence et en absence de calcium extracellulaire, dans les lignées tumorales HeLa et HepG2 et dans la lignée non tumorale HEK 293. Bien que quelques études aient montré que le calcium semble intervenir dans leur mode d'action, de telles oscillations calciques n'ont jamais été décrites auparavant pour des toxines Cry. Les expériences ont dû être faites à des concentrations beaucoup plus élevées de toxine que prévues sur la base des résultats publiés de cytotoxicité. Malgré la présence des fragments identifiés auparavant comme actifs, sa faible efficacité semble liée à la présence d'ADN dans les préparations qui entraîne la précipitation de la protéine. Les travaux futurs sur cette toxine seraient donc grandement facilités par une amélioration de sa méthode de préparation.

Mots-clés: Toxines, *Bacillus thuringiensis*, protéines Cry, pores, parasporines, calcium intracellulaire.

Abstract

Parasporins are Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* that are active against tumor cells. This work shows that parasporin PS1Aa2 (Cry31Aa2) forms pores in artificial membranes like many Cry toxins. These pores have several levels of conductance; the most frequently seen in 150 mM KCl solutions were of 11, 16 and 21 pS. Our microspectrofluorometric results with the Fura-2 probe showed that the presence of PS1Aa2 can induce changes in intracellular calcium levels, most often in the form of calcium oscillations and sometimes as sustained increases. Such responses were observed in the presence and absence of extracellular calcium, with the tumor cell lines HeLa and HepG2, and with the non-tumorous cell line HEK 293. Calcium oscillations have not been described previously for Cry toxins even though some studies have shown that calcium appears to be involved in their mode of action. Our experiments required the use of much higher concentrations of toxin than suggested from the published cytotoxicity results. Despite the presence of fragments previously identified as active, its low efficacy appears to be related to the presence of DNA in the preparations causing the protein to precipitate. Future work on this toxin would therefore be greatly facilitated by an improvement in its method of preparation.

Keywords: Toxins, *Bacillus thuringiensis*, Cry proteins, pores, parasporins, intracellular calcium.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. Utilisation de toxines bactériennes comme agents anti-tumoraux.....	1
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
1.3. Toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.3.1. Exotoxines.....	5
1.3.2. Endotoxines.....	5
1.4. Nomenclature des toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
1.5. Structure des toxines Cry.....	7
1.5.1. Structure primaire des protoxines.....	7
1.5.2. Structure primaire des toxines activées.....	8
1.5.3. Structures secondaire et tertiaire.....	9
1.6. Mode d'action des toxines Cry.....	11
1.6.1. Récepteurs membranaires.....	11
1.6.1.1. Aminopeptidases.....	12
1.6.1.2. Cadhérines.....	13
1.6.1.3. Phosphatases alcalines.....	14
1.6.1.4. Transporteur ABC.....	14
1.6.1.5. Glycolipides.....	15
1.6.2. Formation de pores transmembranaires.....	15
1.6.2.1. Mise en évidence et propriétés des pores.....	16
1.6.2.2. Mécanisme de formation des pores.....	18

1.6.2.3. Effets des toxines sur la physiologie cellulaire.....	20
1.6.3. Toxines Cry anti-tumorales.....	22
1.6.3.1. Nomenclature.....	22
1.6.3.2. PS1Aa2.....	26
1.7. Objectifs.....	28
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
2.1. Toxines.....	30
2.2. Culture cellulaire.....	31
2.2.1. Observations microscopiques.....	32
2.3. Bicouches lipidiques planes.....	32
2.3.1. Dispositif expérimental.....	32
2.3.2. Lipides.....	33
2.3.3. Prétraitement.....	33
2.3.4. Formation de la membrane.....	34
2.3.5. Incorporation de la toxine.....	35
2.3.6. Acquisition et analyses.....	35
2.4. Microspectrofluorométrie.....	36
2.4.1. Dispositif expérimental.....	36
2.4.2. Microspectrofluorométrie.....	36
2.5. Viabilité cellulaire.....	37
2.5.1. Bleu de trypan.....	37
2.5.2. Homodimère-1 d'éthidium.....	38
2.6. Analyse des résultats.....	39
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	40
3.1. Préparation des parasporines.....	40
3.2. Effets morphologiques des toxines.....	42
3.3. Bicouches lipidiques.....	45
3.4. Microspectrofluorométrie.....	52
3.4.1. Rapport de fluorescence de la sonde.....	52

3.4.2. Réponses calciques à la PS1Aa2.....	53
3.4.2.1. En présence de calcium extracellulaire.....	54
3.4.2.2. En absence de calcium extracellulaire.....	58
3.4.3. Réponses calciques à la PS1Aa1.....	62
3.4.4. Modulation des réponses calciques.....	62
3.5. Viabilité cellulaire.....	63
3.5.1. Bleu de trypan.....	63
3.5.2. Homodimère-1 d'éthidium.....	64
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	73
4.1. Formation de canaux ioniques.....	73
4.2. Réponses calciques à la toxine.....	76
4.3. Viabilité cellulaire.....	80
4.4. Perspectives.....	82
4.5. Conclusions.....	85
BIBLIOGRAPHIE.....	86

Liste des tableaux

Tableau I. Quelques caractéristiques de la toxine type de chacune des classes de parasporines.	23
Tableau II. Compilation des niveaux principaux de conductance observés au cours de l'ensemble des expériences faites avec la PS1Aa2.....	50

Liste des figures

Figure 1.	Micrographie de contraste de phase d'une culture de <i>B. thuringiensis</i> souche M15 en cours de sporulation.....	3
Figure 2.	Structure tridimensionnelle élucidée de la toxine activée Cry1Aa.....	10
Figure 3.	Schéma de la structure de la PS1Aa2.....	27
Figure 4.	Schéma du montage d'un système de bicouche.....	34
Figure 5.	Analyse sur gel de polyacrylamide d'une préparation de parasporines.....	40
Figure 6.	Analyse sur gel de polyacrylamide des préparations de parasporines utilisées au cours de ce travail.....	41
Figure 7.	Effets de la PS1Aa2 sur la morphologie des cellules tumorales HeLa et HepG2...43	
Figure 8.	Comparaison des effets de la PS1Aa2 et de la Cyt1Aa sur la morphologie des cellules HeLa.	44
Figure 9.	Effets de la PS1Aa2 sur la morphologie des cellules non tumorales HEK 293.....	44
Figure 10.	Activité canal observée dans deux expériences réalisées avec la PS1Aa2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution symétrique de KCl (150 mM) à +20 mV	46
Figure 11.	Activité canal de la PS1Aa2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution symétrique de KCl (150 mM).....	46
Figure 12.	Activité canal de la PS1Aa2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution symétrique de KCl (450 mM).....	47
Figure 13.	Activité canal de la PS1Aa2 (3 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution asymétrique de KCl 450/150 mM (cis/trans) à +80 mV.....	48
Figure 14.	Activité canal de la PS1Aa2 (3 $\mu\text{g/ml}$) à différents voltages dans une solution symétrique de KCl (150 mM).....	49
Figure 15.	Courbes courant-voltage établies à partir des sauts de courants les plus fréquents observés au cours de l'expérience illustrée dans la Figure 13 réalisée avec la PS1Aa2 en présence de 150 mM de KCl.	50
Figure 16.	Comparaison des niveaux de conductance observés avec chacune des préparations de toxine utilisées pour les expériences de bicouches lipidiques.....	51
Figure 17.	Rapport de fluorescence dans des cellules chargées avec la sonde Fura-2 AM (5 μM) en présence de Ca^{++} (1.8 mM).....	52

Figure 18. Fluorescence moyenne des cellules et leur rapport de fluorescence 350/380 nm.....	53
Figure 19. Réponses calciques des cellules tumorales à la PS1Aa2	54
Figure 20. Réponse calcique à l'ajout de la PS1Aa2 en présence de calcium (1.8 mM)	55
Figure 21. Effet de la PS1Aa2 en présence de calcium (1.8 mM)	56
Figure 22. Différentes réponses calciques des cellules HeLa en présence de calcium (1.8 mM)	57
Figure 23. Distribution du nombre d'oscillations calciques observées en réponse à l'ajout de PS1Aa2 dans deux lignées cellulaires en présence ou en absence de calcium.	58
Figure 24. Réponses calciques des cellules à la PS1Aa2.....	60
Figure 25. Réponses calciques des cellules tumorales à la PS1Aa2	61
Figure 26. Réponse calcique des cellules HepG2 à la PS1Aa1.....	62
Figure 27. Effet du lanthane sur l'activité de la PS1Aa2 dans une cellule HepG2.....	63
Figure 28. Effet de la PS1Aa2 sur la viabilité des cellules HepG2 estimée avec le bleu de trypan.....	64
Figure 29. Fluorescence de l'homodimère d'éthidium en présence de trois lignées cellulaires	66
Figure 30. Fluorescence de l'homodimère d'éthidium en présence de cellules HeLa.....	67
Figure 31. Fluorescence de l'homodimère d'éthidium en présence ou en absence de cellules HeLa (A) ou HepG2 (B).	67
Figure 32. Fluorescence mesurée en présence de PS1Aa1, PS1Aa2, Cyt1Aa et d'homodimère d'éthidium en absence de cellules.	68
Figure 33. Spectre d'absorbance du tampon carbonate utilisé pour les préparations de PS1Aa1 et PS1Aa2.....	69
Figure 34. Observation de suspensions de la PS1Aa2 et PS1Aa1 (20 µg/ml) par microscopie de fluorescence (400 X) en présence d'homodimère d'éthidium (6 µM), mais sans cellules.....	70
Figure 35. Observation au microscope (400 X) des toxines dans un hemacytomètre.....	71
Figure 36. Effet du suc intestinal sur le contenu en ADN d'une préparation de PS1Aa2.....	72

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
EGTA	éthylène glycol-bis (2-aminoéthyléther)- <i>N,N,N',N'</i> - tétraacétate
HEPES	acide 4- (2-hydroxyéthyl)-1-piperazineethanesulphonique
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle
SDS	dodécylsulfate de sodium
Tris	[Tris(hydroxyméthyl)aminométhane]-HCl
Vip	<i>Vegetative insecticidal protein</i>

À ma famille :

Car vous avez toujours gardé espoir.

Remerciements

Je suis très reconnaissant envers le professeur Jean-Louis Schwartz pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette maîtrise en m'accueillant dans son laboratoire avec mon expérience clinique plutôt que de laboratoire, et pour m'avoir permis de travailler dans ce projet innovateur d'un sujet remarquable. Je le remercie aussi de son encouragement et sa direction dans la recherche même pendant son année sabbatique.

Je tiens à remercier Jean-Charles Côté, du centre de recherche en horticulture d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, de St-Jean-sur-Richelieu, pour sa collaboration dans ce projet, Audrey Claing pour son orientation au début des expériences du projet, Vincent Vachon pour m'avoir aidé à réfléchir sur les sujets concernant cette recherche, pour m'avoir appuyé dans la quête de solutions aux problèmes dans les expériences et pour ses observations visant une meilleure utilisation de la langue française.

Je remercie Dong Xu, du centre de recherche de St-Jean-sur-Richelieu, pour son travail et son dévouement à produire la toxine PS1Aa2, Julie Verner pour ses explications avisées et ses encouragements, Michel Brunette pour son soutien technique au GEPRM, Marc Juteau pour m'avoir initié à la technique de bicouches lipidiques, Léna Potvin pour ses observations afin d'améliorer les techniques de laboratoire, et mes collègues Maxime Huot, Valbona Karabrahimi et James-Christopher Bernard pour leur appui au laboratoire.

Finalement je remercie la faculté de médecine et le GEPRM pour la bourse d'étudiant.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. Utilisation de toxines bactériennes comme agents anti-tumoraux

Il y a plus d'un siècle, le célèbre médecin Paul Ehrlich, prix Nobel de médecine, émit l'idée d'utiliser des toxines pour détruire des cellules tumorales tout en préservant les tissus sains (Fitzgerald, 1996). Les toxines sont de puissants agents cytotoxiques; une seule molécule de la chaîne A de la toxine diphtérique dans le cytosol est létale pour la cellule (Yamaizumi *et al.*, 1978). Dans la recherche de traitements pour le cancer, des toxines protéiques telles que l'exotoxine de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique et la ricine ont été utilisées pour la mise au point de toxines recombinantes ciblant spécifiquement des cellules malignes (FitzGerald et Pastan, 1989; Fitzgerald, 1996). Aujourd'hui, un certain nombre de ces constructions font l'objet d'études animales et cliniques pour le traitements de leucémies et de tumeurs solides (Li et Hall, 2010; Feld *et al.*, 2013; Sapra et Shor, 2013). Les toxines anti-tumorales qui ont été utilisées avec le plus de succès comportent plusieurs domaines. Généralement, il y a un domaine de reconnaissance cellulaire qui concentre la toxine à la surface de la cellule cible; un domaine de translocation, qui permet à la toxine de traverser une membrane pour atteindre le cytosol; et un domaine létal, qui inactive certains processus cellulaires vitaux et tue la cellule (Pastan *et al.*, 2007).

Parce que les toxines sont très meurtrières pour les cellules sensibles, elles doivent être ciblées sur les cellules cancéreuses. Ce processus est accompli en modifiant l'interaction des toxines avec leurs récepteurs, en conjuguant celles-ci à des protéines telles que des anticorps monoclonaux, des cytokines ou des facteurs de croissance. Ces protéines conjuguées vont se

fixer sur des antigènes spécifiques qui sont surexprimés sur la surface des cellules cancéreuses. Contrairement aux agents chimiothérapeutiques classiques, dont l'activité anticancéreuse dépend surtout d'une sensibilité accrue des cellules en division, ces toxines hybrides ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses, qu'elles soient au repos ou en division (Thrush *et al.*, 1996).

Certaines endotoxines de *Bacillus thuringiensis*, appelées parasporines (Ohba *et al.*, 2009), sont spécifiquement létales pour une variété de cellules tumorales. Elles ont l'avantage de pouvoir être ciblées sur des cellules cancéreuses sans qu'il ne soit nécessaire de les modifier. En plus de posséder une efficacité semblable à celle de nombreuses autres toxines bactériennes, ces protéines sont naturellement capables de discriminer entre les cellules tumorales et les cellules normales (Mizuki *et al.*, 1999). Le présent travail vise à comprendre le mécanisme d'action d'une de ces parasporines, la PS1Aa2 (Jung *et al.*, 2007).

1.2. *Bacillus thuringiensis*

Le bacille de Thuringe, *B. thuringiensis*, est bien connu pour ses propriétés insecticides attribuées à sa capacité de produire des toxines formant des pores (Höfte et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2012). Il a été isolé pour la première fois par Ishiwata au Japon en 1901 comme agent de la maladie de sotto du ver à soie, *Bombyx mori* (Entwistle, 1993). Néanmoins, il se retrouve communément dans de nombreuses niches écologiques telles que le sol, la surface des plantes, la poussière des produits stockés, et les insectes (Meadows *et al.*, 1992; Chaufaux *et al.*, 1997; Schnepf *et al.*, 1998; Jara *et al.*, 2006).

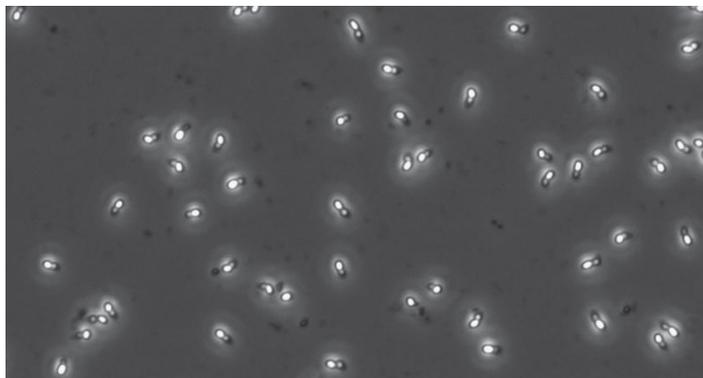


Figure 1. Micrographie de contraste de phase d'une culture de *B. thuringiensis* souche M15 en cours de sporulation. On peut y distinguer, dans chaque cellule, les cristaux parasporaux qui apparaissent comme des petites taches grises à proximité des spores plus brillantes. (Photographie fournie par le Dr. Dong Xu, Agriculture et Agroalimentaire Canada, St-Jean-sur-Richelieu).

Le nom de *B. thuringiensis* provient de la Thuringe, une région du centre de l'Allemagne où cette bactérie a été redécouverte dans des cadavres de larves de la pyrale de la farine (*Ephestia kuehniella*) par Berliner en 1915 (Entwistle, 1993). *B. thuringiensis* est une bactérie aérobie à Gram positif qui forme des spores lorsque les conditions environnementales lui sont défavorables (Figure 1). Il se distingue de la plupart des autres membres du genre *Bacillus* par la synthèse de corps d'inclusion parasporaux lors de la sporulation (Rogoff et Yousten, 1969; Bulla *et al.*, 1980). Ces inclusions ont un aspect cristallin et sont donc souvent appelées “cristaux parasporaux”. Contrairement à ce qu'on observe chez *Bacillus sphaericus* (Yousten et Davidson, 1982), qui produit aussi des corps d'inclusion, la spore de *B. thuringiensis* ne déforme pas la cellule qui conserve sa forme de bâtonnet jusqu'à ce que se produise la lyse de la cellule végétative après que la spore se sera complètement formée.

Bacillus thuringiensis fait partie du “groupe de *Bacillus cereus*”. On y trouve aussi *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* (Vilas-Boas *et al.*, 2007). Ces trois organismes diffèrent

principalement par leurs plasmides (Helgason *et al.*, 2000). Chez *B. thuringiensis*, les plasmides portent les gènes permettant la synthèse des corps d'inclusion parasporaux comprenant la plupart de ses toxines insecticides. Certains plasmides de *B. thuringiensis* peuvent être échangés entre deux souches lors de la croissance en culture mixte (Gonzalez *et al.*, 1982). Si ces plasmides sont perdus, *B. thuringiensis* ne peut plus être distingué de *B. cereus* (Battisti *et al.*, 1985; Kolstø *et al.*, 2009).

Contrairement aux autres membres du genre *Bacillus*, dont plusieurs sont nuisibles à l'être humain, *B. thuringiensis* est un agent fiable pour le contrôle microbien des insectes ravageurs d'importance agricole (Sanchis et Bourguet, 2008; Sauka et Benintende, 2008; Sanahuja, 2011). Traditionnellement, celui-ci est utilisé comme insecticide pulvérisé, mais depuis près de deux décennies, les plantes transgéniques qui expriment directement ses toxines insecticides sont cultivées à très grande échelle (Sanchis et Bourguet, 2008; Sauka et Benintende, 2008; Sanahuja, 2011). Ces toxines ne sont pas seulement des outils importants pour l'agriculture biologique, mais ont également apporté d'importantes contributions à la lutte contre les vecteurs de maladies transmises par des insectes (Lacey et Undeen, 1986; Hougard et Back, 1992; Thiéry *et al.*, 1996; Federici *et al.*, 2010) sans les effets nocifs des insecticides de synthèse (Rahman, 2013).

1.3. Toxines de *Bacillus thuringiensis*

Le bacille de Thuringe est surtout connu pour les toxines insecticides qui composent ses corps d'inclusion, mais il produit aussi plusieurs autres toxines avant la sporulation (Schnepf *et al.*, 1998).

1.3.1. Exotoxines

Les produits toxiques secrétés par les bactéries sont appelés exotoxines. Au cours de la croissance végétative, *B. thuringiensis* produit des facteurs qui contribuent à sa capacité d'infecter certains insectes. Parmi ceux-ci on trouve un groupe de protéines appelées toxines Vip (*Vegetative insecticidal proteins*) étant donné leur toxicité envers de nombreux insectes. La mieux connue de ces toxines est la Vip3Aa1, qui est exprimée à partir du milieu de la phase logarithmique de croissance et possède une forte activité contre certains lépidoptères (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997).

La bactérie produit aussi une variété de facteurs de toxicité qui comprennent différents types d'enzymes hydrolytiques, de protéines cytotoxiques, et d'autres métabolites secondaires (Lereclus *et al.*, 2000). L'un de ces facteurs est la β -exotoxine, ou thuringiensine, une toxine thermostable qui est active non seulement contre les insectes mais aussi contre les autres êtres vivants. C'est un analogue de l'adénosine et un inhibiteur puissant de l'ARN polymérase (de Barjac et Lecadet, 1976). Étant donné sa toxicité pour les mammifères, l'Organisation mondiale de la Santé a recommandé que les produits commerciaux de *B. thuringiensis* soient exempts de β -exotoxine (Bond *et al.*, 1969; Kim et Huang, 1970). Parmi ses facteurs de virulence, cette bactérie produit aussi des protéases, principalement du type métalloprotéase (Andrews *et al.*, 1985; Li et Yousten, 1975).

1.3.2. Endotoxines

Les endotoxines sont des substances qui ne sont pas secrétées, de sorte qu'elles peuvent être trouvées au sein de la cellule plutôt que dans le milieu environnant. Celles qui sont produites par *B. thuringiensis* sont appelées δ -endotoxines et se retrouvent dans les corps

d'inclusion parasporaux. Ceux-ci ont une structure d'apparence cristalline d'environ 1 μm qui résulte de l'assemblage de protoxines de 70 à 135 kDa. La forme de ces cristaux varie selon les δ -endotoxines qui les composent (Höfte et Whiteley, 1989; Knowles, 1994).

Les δ -endotoxines comprennent deux classes de protéines : les protéines Cyt et les protéines Cry. Les protéines Cyt ont une activité hémolytique *in vitro* en plus d'être toxiques pour plusieurs insectes de l'ordre des diptères. Par contre, les protéines Cry n'ont pas d'activité hémolytique, mais comprennent des protéines spécifiquement toxiques pour une variété d'organismes dont les mieux étudiées sont celles agissant sur les insectes (Höfte et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998) et sur les nématodes (Marroquin *et al.*, 2000). Les protéines Cyt et Cry diffèrent structurellement les unes des autres, mais les protéines Cyt interagissent de manière synergique avec certaines protéines Cry pour potentialiser leurs effets contre plusieurs espèces de moustiques et de mouches noires, vecteurs de maladies parasitaires (Butko, 2003; Federici *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2010).

1.4. Nomenclature des toxines de *B. thuringiensis*

La première classification des toxines du bacille de Thuringe était fondée sur l'homologie de séquence de leurs structures primaires (Höfte et Whiteley, 1989), mais elle prenait également en compte les insectes que chaque protéine ciblait principalement dans les ordres des lépidoptères (papillons diurnes et nocturnes), des diptères (mouches et moustiques) ou des coléoptères (scarabées et charançons). Plus tard, le nombre de protéines isolées ayant augmenté rapidement et leurs cibles connues s'étant grandement diversifiées, ce système s'est vite avéré trop complexe. Alors, on a créé une nouvelle nomenclature dans laquelle les toxines

sont classées uniquement selon le degré d'identité de la séquence de leurs acides aminés (Crickmore *et al.*, 1998).

Dans cette classification, les toxines sont regroupées en classes, identifiées par un chiffre; en sous-classes, identifiées par une lettre majuscule; et en sous-sous-classes, identifiées par une lettre minuscule. Un nouveau chiffre est utilisé quand la toxine possède moins de 45% d'identité de séquence avec les autres toxines connues, une nouvelle lettre majuscule est utilisée entre 45 et 75% d'identité, et une nouvelle lettre minuscule est utilisée entre 75 et 95% d'identité (Crickmore *et al.*, 1998). Il y avait, au moment de la dernière mise à jour, le 11 avril 2013, 726 toxines Cry réparties dans 72 classes, 38 toxines Cyt appartenant à trois classes, et 108 toxines Vip comprises dans quatre classes selon le répertoire présenté dans la page web de nomenclature des toxines de *B. thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

1.5. Structure des toxines Cry

1.5.1. Structure primaire des protoxines

Les protéines Cry s'accumulent dans les cristaux parasporaux sous forme de protoxines (Schnepf *et al.*, 1998). Ces protéines sont reliées entre elles par un réseau de ponts disulfure (Bietlot *et al.*, 1990). La structure primaire des protoxines peut se diviser en deux segments. Un segment (du côté N-terminal) correspond à la portion toxique, et l'autre (du côté C-terminal) contribue à la formation du cristal et à sa stabilité structurale (Höfte et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que l'ADN contribue à la formation du cristal. Celui-ci semble en effet être essentiel au maintien de la conformation nécessaire pour

la formation des cristaux et la génération de toxines actives (Bietlot *et al.*, 1993; Clairmont *et al.*, 1998). Les δ -endotoxines de *B. thuringiensis* forment des complexes avec l'ADN même lorsqu'elles sont exprimées chez *Escherichia coli* (Chaturvedi *et al.*, 2000).

Les cristaux de toutes les sous-espèces du bacille de Thuringe sont insolubles dans les milieux aqueux à pH neutre, et les ponts disulfure qui relient les molécules de protoxines sont responsables de cette insolubilité (Nickerson, 1980; Bietlot *et al.*, 1990). C'est pourquoi les cristaux ne deviennent solubles qu'une fois ingérés par l'insecte et exposés aux conditions réductrices de leur intestin moyen. Les liaisons disulfure des protoxines de *B. thuringiensis* sont atypiques en ce sens qu'elles sont déstabilisées à pH élevé (9.5 à 11.5) caractéristique de l'intestin moyen des larves de lépidoptères et de diptères (Dow, 1984; Du *et al.*, 1994). La solubilisation des cristaux est donc également facilitée chez ces insectes par leur milieu intestinal alcalin (Du *et al.*, 1994).

1.5.2. Structure primaire des toxines activées

Une fois solubilisées, les protoxines sont transformées en protéines actives par des protéases qui se trouvent dans l'intestin des organismes cibles. Les protéases coupent les protoxines à des sites spécifiques; elles enlèvent généralement un petit segment de quelques dizaines d'acides aminés à l'extrémité N-terminale et un segment plus ou moins long, selon la taille de la protoxine, à l'extrémité C-terminale (Schnepf *et al.*, 1998). Par exemple, dans le cas de la protoxine de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (Cry1Ac1), dont l'activation a été étudiée de façon particulièrement détaillée, sept clivages spécifiques se produisent dans une séquence ordonnée à partir de l'extrémité C-terminale de la protoxine et allant vers la région N-terminale. À chaque étape, des fragments d'environ 10 kDa sont produits et

rapidement digérés en petits peptides. Cette protéolyse séquentielle d'une protoxine d'environ 130 kDa donne finalement une toxine activée de 67 kDa qui est résistante aux protéases (Choma *et al.*, 1990). Dans certains cas, la spécificité de la toxine peut dépendre des protéases utilisées pour son activation. Par exemple, la Cry1Ab7 de *B. thuringiensis* var. *aizawai* IC1 activée in vitro avec du suc intestinal du moustique *Aedes aegypti* s'est avérée toxique pour une variété de lignées cellulaires provenant de différentes espèces de diptères, mais pour seulement une des lignées testées provenant d'espèces de lépidoptères. Par contre, la même toxine activée avec de la trypsine ou du suc intestinal du lépidoptère *Pieris brassicae* s'est montrée toxique pour toutes les cellules provenant de lépidoptères, mais pour aucune des lignées provenant de diptères (Haider *et al.*, 1986; Haider et Ellar, 1987).

La plupart des toxines Cry sont caractérisées dans leur forme activée par la présence de cinq blocs d'acides aminés hautement conservés (Höfte et Whiteley, 1989). Ces blocs sont séparés par des régions variables. Dans la plupart des toxines Cry dont la protoxine se compose de plus de 1000 résidus, trois blocs conservés supplémentaires se retrouvent dans la partie C-terminale qui sera éliminée pendant l'activation (Schnepf *et al.*, 1998).

1.5.3. Structures secondaire et tertiaire

La structure atomique de plusieurs toxines Cry a été élucidée : Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry1Ac (Li *et al.*, 2001), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Boonsern *et al.*, 2006), Cry4Ba (Boonsern *et al.*, 2005), Cry5B (Hui *et al.*, 2012), Cry8Ea1 (Guo *et al.*, 2009) et Cry46Aa1 (Akiba *et al.*, 2009). À l'exception de cette dernière, toutes ces toxines ont une structure tridimensionnelle remarquablement semblable comportant trois domaines distincts (Figure 2).

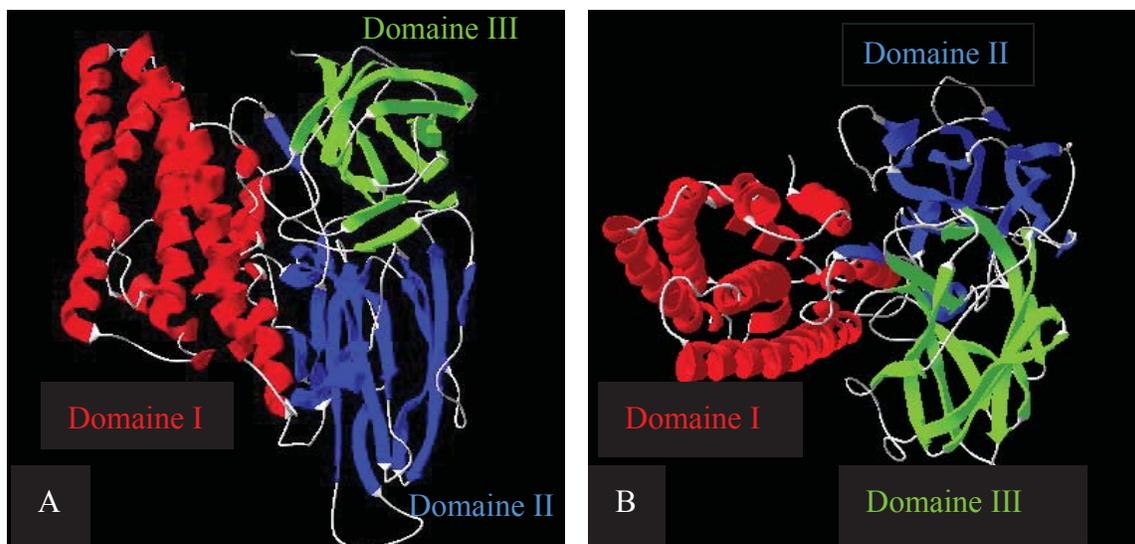


Figure 2. Structure atomique tridimensionnelle élucidée de la toxine activée Cry1Aa. Vue latérale (A) et de dessus (B), résolue à 2.25 Å par diffraction des rayons X (d'après Grochulski *et al.*, 1995).

La présence, mentionnée plus haut, de blocs conservés d'acides aminés dans la structure primaire de ces toxines est généralement considérée comme un facteur qui contribue grandement au fait que ces protéines se replient de façon semblable. Le domaine I est formé par un groupe d'hélices α dans lequel six hélices amphipathiques entourent une hélice centrale hydrophobe. La plupart des hélices ont plus de 30 Å et seraient donc capables de traverser une membrane hydrophobe, en accord avec la conclusion généralement admise que ce domaine est responsable de la formation de pores (Li, 1996; Schnepf *et al.*, 1998; Schwartz et Laprade, 2000). Le domaine II est composé de trois feuillets β antiparallèles et de deux courtes hélices α . Sa séquence varie plus que celle des deux autres domaines. Il est principalement responsable de la spécificité de la toxine et de sa fixation aux récepteurs des membranes cellulaires cibles (Pigott et Ellar, 2007). Le domaine III est composé de deux feuillets β antiparallèles disposés en sandwich β . Il participe aussi à la spécificité et à la fixation de la toxine, en plus de contribuer à sa stabilité (Schnepf *et al.*, 1998).

Bien qu'elle soit aussi constituée de trois domaines, Cry46Aa1, une parasporine, se distingue de toutes les autres toxines Cry dont on connaît la structure atomique par le fait qu'elle est presque exclusivement composée de feuillets β (Akiba *et al.*, 2009). En fait, sa structure ressemble à celle d'une autre protéine de *B. thuringiensis* retrouvée dans des cristaux parasporaux, mais qui n'est pas incluse dans la classification des toxines Cry parce qu'on n'a pas encore identifié d'organisme vivant pour qui elle serait toxique (Akiba *et al.*, 2006). Ces deux protéines ont une structure très analogue à celle de toxines formeuses de pores bien connues, l'aérolysine de *Aeromonas hydrophyla* et la toxine ϵ de *Clostridium perfringens* (Cole *et al.*, 2004). Par ailleurs, la structure des toxines Cry, établie jusqu'à présent, diffère de celle des toxines Cyt. Les seules toxines de cette famille dont la structure atomique est présentement connue, Cyt1Aa (Cohen *et al.*, 2011), Cyt2Aa (Li *et al.*, 1996) et Cyt2Ba (Cohen *et al.*, 2008), ont toutes les trois une structure semblable constituée d'un seul domaine comprenant un feuillet β situé entre deux paires d'hélices α , chaque paire formant une structure en épingle à cheveux.

1.6. Mode d'action des toxines Cry

1.6.1. Récepteurs membranaires

Une fois solubilisées et activées, les toxines Cry interagissent avec des récepteurs spécifiques sur la surface externe de la membrane plasmique à bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin moyen des insectes cibles (Hofmann et Lüthy, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a, b; Van Rie *et al.*, 1989, 1990). La fixation au récepteur est un processus comportant deux étapes, la première réversible (Hofmann *et al.*, 1988a) et la suivante irréversible (Liang

et al., 1995; Rajamohan *et al.*, 1995). On considère généralement que la fixation irréversible correspond à l'insertion de la toxine dans la membrane (Chen *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1995; Rajamohan *et al.*, 1995; Ihara et Himeno, 2008), bien qu'elle puisse aussi résulter d'une interaction étroite et particulièrement stable entre la toxine et le récepteur (Masson *et al.*, 1995).

De nombreuses protéines jouant le rôle de récepteur des toxines Cry dans la membrane à bordure en brosse de l'intestin des insectes ont été identifiées (Pigott et Ellar, 2007; Gómez *et al.*, 2007; Likitvivatanavong *et al.*, 2011). Dans ce groupe, celles qui ont été le mieux étudiées comprennent des aminopeptidases, des cadhérines, des phosphatases alcalines et, plus récemment, un transporteur de type ABC (Gahan *et al.*, 2010).

1.6.1.1. Aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des enzymes ancrées dans la membrane par un groupement glycosyl-phosphatidylinositol. Plusieurs aminopeptidases appartenant à cinq classes différentes ont été décrites comme récepteurs de toxines Cry (Sangadala *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2005; Pigott et Ellar, 2007). Elles ont une taille comprise entre 90 et 170 kDa et sont préférentiellement localisées dans des microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (Brown et London, 1998; Schroeder *et al.*, 1998). Cette localisation des récepteurs semble faciliter l'intoxication de la cellule en concentrant la toxine dans des régions spécifiques de la membrane (Zhuang *et al.*, 2002) comme il a été démontré auparavant pour d'autres toxines bactériennes (Abrami et van der Goot, 1999; Fivaz *et al.*, 2000).

L'incorporation dans des membranes artificielles d'une de ces aminopeptidases, partiellement purifiée à partir de l'intestin de *Manduca sexta* (Sangadala *et al.*, 1994), a permis

de mettre en évidence une augmentation marquée de la perméabilité de liposomes pour le ^{86}Rb , en présence de toxine (Sangadala *et al.*, 1994), et la formation de canaux ioniques dans des membranes lipidiques planes à des concentrations de toxine considérablement plus faibles que dans des membranes ne contenant pas de récepteurs (Schwartz *et al.*, 1997b). De plus, l'expression chez la drosophile, un diptère normalement insensible à la Cry1Ac, d'une aminopeptidase servant de récepteur pour cette toxine chez *M. sexta*, a rendu l'insecte hôte sensible à la toxine (Gill et Ellar, 2002). D'autre part, l'inhibition de l'expression du récepteur de type aminopeptidase de *Helicoverpa armigera* rend cet insecte résistant à la Cry1Ac (Sivakumar *et al.*, 2007).

1.6.1.2. Cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle important dans l'adhérence des cellules et le maintien de la structure des tissus animaux (Shapiro *et al.*, 1995). Des cadhérines de l'intestin moyen des lépidoptères sont des déterminants majeurs de la spécificité des toxines Cry1A. Alors que ces toxines se fixent sur les récepteurs de type cadhérine avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, elles ne se fixent aux récepteurs de type aminopeptidase ou phosphatase alcaline qu'avec une affinité de l'ordre d'environ 100 nM (Pigott et Ellar, 2007).

De nombreuses études ont montré que, comme dans le cas des aminopeptidases, l'expression d'un récepteur de toxine Cry de type cadhérine dans une cellule étrangère peut rendre la cellule hôte sensible à la toxine (Nagamatsu *et al.*, 1998, 1999; Dorsch *et al.*, 2002; Tsuda *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2004a, b; Flannagan *et al.*, 2005; Aimanova *et al.*, 2006; Jurat-Fuentes et Adang, 2006; Zhang *et al.*, 2005).

1.6.1.3. Phosphatases alcalines

La phosphatase alcaline est une autre enzyme ancrée dans la membrane par un groupement glycosyl-phosphatidylinositol. Son implication dans le mode d'action des toxines Cry a été mise en évidence par la découverte d'une corrélation entre la résistance à la Cry1Ac et un niveau réduit de phosphatase alcaline dans la souche YDH2 de *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes et Adang, 2004) et plusieurs autres espèces de lépidoptères (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'isoforme ALP1 de la phosphatase alcaline a été identifiée, en plus d'une aminopeptidase (Chen *et al.*, 2009b) et d'une cadhérine (Chen *et al.*, 2009a), comme étant un récepteur de la Cry11Aa chez *A. aegypti* (Fernandez *et al.*, 2009). L'interaction de cette protéine avec la toxine fait intervenir deux régions capables de fixer respectivement les domaines II et III de la toxine (Fernandez *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été montré que cette même protéine pouvait aussi servir de récepteur pour la Cry4B (Jiménez *et al.*, 2012).

1.6.1.4. Transporteur ABC

La découverte de l'implication d'un membre des transporteurs de type ABC, une famille de protéines membranaires qui effectuent la translocation de petites molécules au travers des membranes biologiques en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, vient de l'étude de certaines souches de *H. virescens* résistantes à la Cry1Ac (Gahan *et al.*, 2010). Malgré cette résistance, due à une mutation dans le gène codant pour un récepteur de type cadhérine, des vésicules de membrane à bordure en brosse isolées de l'intestin de ces insectes résistants ont conservé la capacité de fixer la toxine. Dans le but de résoudre cette énigme, des insectes ayant acquis une résistance supplémentaire et perdu la capacité de fixer la toxine sur leur membrane intestinale ont d'abord été sélectionnés. Par la suite, les auteurs ont

pu démontrer, avec une analyse génétique détaillée, que cette nouvelle résistance était due spécifiquement à une mutation dans le gène codant pour le transporteur ABCC2 (Gahan *et al.*, 2010; Heckel, 2012).

1.6.1.5. Glycolipides

En plus des protéines membranaires mentionnées plus haut, certains glycolipides semblent jouer un rôle important dans la fixation des toxines Cry, au moins chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Griffitts *et al.*, 2005). Plusieurs mutants résistants à la Cry5Ba ont été isolés (Griffitts *et al.*, 2001), et on a pu montrer que leur résistance à la toxine s'expliquait par l'inactivation de l'un ou l'autre de deux gènes codant pour certaines glycosyltransférases, des enzymes qui participent à la biosynthèse de la partie glucidique des glycolipides membranaires (Griffitts *et al.*, 2003).

1.6.2. Formation de pores transmembranaires

On considère généralement que les toxines Cry agissent en formant des pores dans la membrane apicale à bordure en brosse des cellules de l'intestin moyen des insectes sensibles (Knowles et Ellar, 1987; Schnepf *et al.*, 1998; Vachon *et al.*, 2012). Ces pores augmentent la perméabilité de la membrane et déstabilisent les mécanismes de régulation ionique et osmotique. Les cellules gonflent et éventuellement lysent. Ceci perturbe les fonctions intestinales et conduit à la mort de l'insecte par arrêt de l'alimentation ou par septicémie (Gill *et al.*, 1992; Knowles, 1994).

1.6.2.1. Mise en évidence et propriétés des pores

La formation des pores par une variété de toxines Cry a été étudiée avec plusieurs approches expérimentales (Schwartz et Laprade, 2000; Vachon *et al.*, 2004) comprenant, entre autres, des mesures de potentiel membranaire (Peyronnet *et al.*, 1997) ou de courants transépithéliaux (Chen *et al.*, 1993; Liebig *et al.*, 1995) dans des intestins isolés d'insecte, des études de patch-clamp sur des cellules d'insecte en culture (Schwartz *et al.*, 1991) ou des intestins isolés d'insecte (Peyronnet *et al.*, 2004), des études de gonflement osmotique de cellules sensibles (Knowles et Ellar, 1987; Villalon *et al.*, 1998) ou de vésicules de membrane à bordure en brosse intestinales (Carroll et Ellar, 1993 ; Coux *et al.*, 2001; Kirouac *et al.*, 2006), et des mesures de perméabilisation membranaire utilisant différentes sondes fluorescentes dans des cellules (Schwartz *et al.*, 1991; Vachon *et al.*, 1995; Guihard *et al.*, 2000), des vésicules membranaires (Kirouac *et al.*, 2003) ou des liposomes (Butko *et al.*, 1994; Masson *et al.*, 2004). La formation des pores a également été démontrée indirectement en mesurant l'effet inhibiteur des toxines Cry sur le transport d'acides aminés dans des vésicules de membrane à bordure en brosse de l'intestin d'insecte (Sacchi *et al.*, 1986; Wolfersberger *et al.*, 1991). En effet, puisque ce transport, réalisé par des co-transporteurs membranaires, dépend de la présence d'un gradient de cations monovalents, son inhibition par une toxine est indicative de l'abolition de ce gradient résultant de la perméabilisation de la membrane par les pores formés par la toxine.

Finalement, plusieurs études ont mis en évidence la formation, par des toxines Cry, de canaux ioniques dans des membranes artificielles planes (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; English *et al.*, 1994; Grochulski *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 2004; Puntheeranurak *et al.*, 2004; Vachon *et al.*, 2012). Dans ces expériences, la formation de canaux individuels est

détectée par l'apparition de sauts de courant transmembranaire qui sont aisément mis en évidence. La plupart des travaux utilisant cette approche ont été réalisés avec des membranes planes ne contenant pas de récepteurs des toxines. Bien que l'incorporation, dans la membrane plane, de récepteurs purifiés (Schwartz *et al.*, 1997b) ou de fragments de la membrane à bordure en brosse provenant d'un insecte sensible à la toxine (Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001) augmente grandement l'efficacité avec laquelle les pores sont formés, ces expériences sont plus délicates à réaliser et, surtout, requièrent une bonne source des récepteurs que l'on voudrait reconstituer.

L'ensemble de ces techniques, complémentaires les unes aux autres, a permis d'établir que les pores formés par les toxines Cry facilitent la diffusion transmembranaire d'une grande variété de solutés comprenant un grand nombre d'ions inorganiques, d'hydrates de carbone et d'acides aminés (Carroll et Ellar, 1993; Kirouac *et al.*, 2002). Dans les bicouches lipidiques, plusieurs niveaux de conductance sont habituellement observés en présence de toxines Cry. Une étude détaillée des effets de solutés non chargés de différentes tailles sur la conductance mesurée en présence de Cry1C a cependant permis d'établir que cette toxine, insérée dans la membrane, forme des agglomérats comportant un nombre variable de canaux similaires dont le rayon se situe entre 1.0 et 1.3 nm et qui s'ouvrent de façon synchronisée, plutôt que des canaux de plusieurs tailles différentes (Peyronnet *et al.*, 2002). Ces valeurs sont d'ailleurs en accord avec les estimés, publiés auparavant (Carroll et Ellar, 1997), de la taille des pores formés par la Cry1Ac dans des vésicules de membrane à bordure en brosse de *M. sexta*.

Des expériences réalisées avec des bicouches lipidiques planes, montrant un déplacement des courbes courant-voltage en présence d'un gradient transmembranaire de sel, ont mis en lumière le fait que les pores formés par les toxines Cry sont généralement sélectifs

pour les cations (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1995; Puntheeranurak *et al.*, 2004). Cette conclusion a été confirmée avec des expériences réalisées avec des vésicules de membrane à bordure en brosse provenant de l'intestin de *M. sexta* et comparant les vitesses de gonflement osmotique des vésicules, induit par la toxine, en présence d'une variété de solutés chargés (Kirouac *et al.*, 2002). Dans quelques études de bicouches lipidiques, la perméabilité membranaire à l'anion était plus grande que celle du cation. Il faut cependant tenir compte du fait que ces expériences ont été réalisées avec du chlorure de choline (Schwartz *et al.*, 1993) ou du chlorure de N-méthyl-D-glucamine (Peyronnet *et al.*, 2001), c'est-à-dire dans des conditions où le cation était considérablement plus gros que l'anion.

1.6.2.2. Mécanisme de formation des pores

Le mécanisme par lequel la toxine s'insère dans la membrane et forme des pores n'est pas encore bien compris (Vachon *et al.*, 2012). Plusieurs auteurs ont suggéré, depuis longtemps, que ces pores avaient une structure oligomérique (Hodgmann et Ellar, 1990; Gazit et Shai, 1995; Schwartz *et al.*, 1997a). L'architecture des pores ainsi que le nombre de sous-unités de toxine nécessaire à la formation d'un pore ne sont cependant pas encore établis précisément, bien qu'une étude de microscopie à force atomique (Vié *et al.*, 2001) et une étude de fluorescence de molécules uniques (*single-molecule fluorescence*) (Groulx *et al.*, 2011) aient fortement suggéré que les pores sont formés par des tétramères. Il n'est cependant pas clair si l'oligomérisation de la toxine se produit avant ou après son insertion dans la membrane. À l'appui de la possibilité que les toxines Cry puissent s'insérer dans la membrane sous forme de monomères, et donc avant de s'oligomériser, des mutants de la Cry1Ab et de la

Cry1Ac ont été décrits qui sont incapables de former des oligomères ou de perméabiliser des vésicules de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen de *M. sexta* tout en ayant conservé leur pleine capacité à se fixer de façon irréversible sur de telles vésicules (Cooper *et al.*, 1998; Tigue *et al.*, 2001). La possibilité que la toxine s'insère dans la membrane sous forme de monomères est également appuyée par les données de fluorescence de molécules uniques mentionnées plus haut (Groulx *et al.*, 2011). Par contre, l'analyse de l'effet de la Cry1C sur la cinétique d'efflux du potassium de cellules d'insectes avait suggéré que la structure oligomérique pourrait, au contraire, s'assembler à la surface de la membrane avant de s'y insérer (Guihard *et al.*, 2000).

Cette possibilité est d'ailleurs celle qui est défendue depuis plusieurs années par l'équipe de Bravo et Soberón (Bravo *et al.*, 2004; Jiménez-Juárez *et al.*, 2008). Ces auteurs ont mis de l'avant un modèle plutôt élaboré décrivant les étapes possibles du mécanisme de formation des pores par les toxines Cry (Bravo *et al.*, 2007; Bravo et Soberón, 2008; Pardo-López *et al.*, 2013). Selon ce modèle, les toxines Cry interagissent de façon séquentielle avec différents récepteurs. Dans une première étape, la toxine se fixerait sur l'aminopeptidase ou la phosphatase alcaline, ce qui permettrait de concentrer la toxine sur la surface membranaire. La toxine serait ensuite transférée à la cadhérine, où se produirait une étape supplémentaire de protéolyse qui entraînerait l'hydrolyse de l'hélice $\alpha 1$, située à l'extrémité N-terminale de la toxine activée. L'élimination de cette hélice permettrait à la toxine de s'oligomériser pour former un pré-pore. Celui-ci retournerait alors sur l'aminopeptidase ou la phosphatase alcaline, ce qui faciliterait grandement son insertion dans la membrane. Une fois formés, les pores augmentent considérablement la perméabilité de la membrane, ce qui entraîne la

détérioration progressive ou la lyse de la cellule et finalement la mort de l'insecte (Bravo *et al.*, 2007; Bravo et Soberón, 2008; Pardo-López *et al.*, 2013).

Bien que ce modèle ait pris beaucoup d'importance dans la littérature scientifique, il a fait récemment l'objet d'une analyse critique détaillée (Vachon *et al.*, 2012). Il en ressort que, bien qu'elles fournissent des hypothèses intéressantes, chacune des étapes de ce modèle est encore loin d'avoir été démontrée sur des bases expérimentales fermes. Il serait donc plus prudent de présenter ce modèle, non pas comme une description bien établie du mode d'action des toxines Cry, mais comme un outil de travail permettant d'en explorer plus à fond les détails, quitte à le reformuler à la lumière de nouveaux résultats.

1.6.2.3. Effets des toxines sur la physiologie cellulaire

Les pores formés par les toxines entraînent un déséquilibre dans l'homéostasie de la cellule. L'abolition des gradients ioniques transmembranaires va perturber les fonctions de transport qui en dépendent, y compris le maintien du potentiel membranaire, et la concentration cytosolique de nombreuses substances s'en trouvera modifiée. Par exemple, il a été établi que la Cry1C entraîne une augmentation rapide et soutenue de la concentration intracellulaire de Ca^{++} dans les cellules Sf9 (Schwartz *et al.*, 1991). L'efficacité de cette toxine est sensiblement stimulée par le Ca^{++} extracellulaire d'une manière dose-dépendante, et cet effet est lié à une concentration accrue de Ca^{++} intracellulaire (Monette *et al.*, 1997). Par ailleurs, des expériences des bicouches lipidiques planes ont démontré que les pores induits par Cry1Ac, qui sont perméables aux ions K^+ , permettent également le passage des ions Ca^{++} (Potvin *et al.*, 1998). Une élévation soutenue du niveau de calcium dans le cytoplasme est

toxique et peut occasionner la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose (Orrenius *et al.*, 2003).

Bien que la formation, par les toxines Cry, de pores dans leur membrane cible soit établie depuis longtemps, un modèle récent suggère que ceux-ci ne jouent pas un rôle essentiel dans leur mode d'action (Zhang *et al.*, 2005, 2006). Selon ce modèle, la fixation de la toxine sur son récepteur de type cadhérine conduit à la mort cellulaire par un mécanisme faisant intervenir une voie de signalisation dépendante du magnésium et de la sous-unité α d'une protéine G. L'activation de celle-ci stimulerait l'adénylate cyclase, ce qui conduirait à une augmentation de l'AMPc au sein des cellules et, par conséquent, à l'activation de la protéine kinase A qui, à son tour, déclencherait une série d'événements conduisant à la lyse cellulaire (Zhang *et al.*, 2005, 2006). Ce modèle a également été sévèrement critiqué, et les bases expérimentales sur lesquelles il est fondé ont été jugées particulièrement faibles (Vachon *et al.*, 2012). Il reste néanmoins que l'interaction des toxines avec des cellules sensibles, ne serait-ce que par la formation de pores dans leur membrane plasmique, a sans aucun doute des conséquences importantes sur le métabolisme cellulaire et sa régulation (Kao *et al.*, 2011). Plusieurs études ont mis en cause une variété de voies de signalisation intracellulaire dans les mécanismes de défense cellulaire contre des toxines Cry nématocides (Huffman *et al.*, 2004; Bischof *et al.*, 2008; Bellier *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010) et insecticides (Cancino-Rodezno *et al.*, 2010). Bien que plusieurs voies de signalisation intracellulaires semblent être activées par des toxines Cry dans les cellules sensibles, les mécanismes par lesquels ces voies contribuent à la pathogenèse ou protègent contre les effets délétères des toxines restent pratiquement inexplorés (Vachon *et al.*, 2012).

1.6.3. Toxines Cry anti-tumorales

Des efforts considérables ont été consacrés à la recherche de nouvelles souches de *B. thuringiensis* produisant des toxines Cry ayant des propriétés inédites (Meadows *et al.*, 1992; Chaufaux *et al.*, 1997; Schnepf *et al.*, 1998; Jara *et al.*, 2006). Bien que ces recherches aient visé principalement la découverte de souches actives contre des insectes pour lesquelles aucune toxine efficace n'étaient encore connue, la plupart des isolats se sont avérés non toxiques pour les espèces contre lesquelles ils ont été testés (Ohba *et al.*, 1988; Ohba, 1996 ; Roh *et al.*, 1996). Ces travaux ont cependant permis de découvrir plusieurs toxines Cry ayant des propriétés anti-tumorales qu'on a par la suite appelées parasporines (Mizuki *et al.*, 2000; Ohba *et al.*, 2009).

1.6.3.1. Nomenclature

Le terme parasporine désigne des protéines parasporales produites par *B. thuringiensis* qui sont non hémolytiques, mais capables de tuer certaines cellules cancéreuses (Katayama *et al.*, 2005; Ohba *et al.*, 2009). Ce groupe comprend donc des toxines Cry, mais exclut les toxines Cyt. En plus d'être classées selon la nomenclature des toxines Cry, les parasporines ont leur propre nomenclature qui est régie par un comité spécial de classification et de nomenclature (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>). La classification des parasporines suit cependant les mêmes règles que celles qui sont décrites plus haut (Section 1.4.) pour les autres toxines de *B. thuringiensis*. Présentement, dix-neuf parasporines ont été répertoriées et réparties dans six classes. Les principales caractéristiques de la première parasporine à avoir été décrite pour chaque classe sont présentées dans le Tableau I, ainsi que leurs noms équivalents dans la classification des parasporines et celle des toxines Cry. Les protoxines des

parasporines, comme celles de toutes les autres protéines Cry, doivent être solubilisées dans un milieu alcalin et activées par une protéase pour devenir toxiques. Comme les parasporines sont utilisées contre des cellules en culture, elles doivent être activées *in vitro*, avant les essais de cytotoxicité. Leur activité peut aussi différer grandement selon l'enzyme utilisée à cette étape de leur préparation (Mizuki *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004; Hayakawa *et al.*, 2007).

Tableau I. Quelques caractéristiques de la toxine type de chacune des classes de parasporines. Leur activité sur des cellules utilisées dans ce travail (HeLa et HepG2) a été privilégiée dans le tableau mais elles sont actives sur d'autres lignés cellulaires.

Protéine		Poids moléculaire (kDa)		Cytotoxicité		Références
Parasporine	Cry No.	Protoxine	Toxine activée	HeLa	HepG2	Auteurs et date
PS1Aa1	Cry31Aa1	81	15 + 56	+++	++	Mizuki <i>et al.</i> , 2000
PS2Aa1	Cry46Aa1	37	30	-	++++	Ito <i>et al.</i> , 2004
PS3Aa1	Cry41Aa1	88	64	-	++	Yamashita <i>et al.</i> , 2005
PS4Aa1	Cry45Aa1	31	27	-	++	Okumura <i>et al.</i> , 2005
PS5Aa1	Cry64Aa1	75	?	?	?	Ekino et Shin 2009 ¹
PS6Aa1	Cry63Aa1	84	12 + 59	++	+++	Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010

- Très faible/non toxique ; + faible ; ++ modérée ; +++ haute ; ++++ très élevée ;

¹ référence citée dans la page web de parasporines, résultats non disponibles.

1.6.3.1.1. Parasporines-1

Bien que cette famille compte présentement onze membres, dont la PS1Aa2 (Jung *et al.*, 2007) qui fait l'objet du présent mémoire, leur mode d'action a pour le moment surtout été étudié pour la PS1Aa1 (Katayama *et al.*, 2005, 2007). La forme activée de cette toxine est constituée d'un complexe de ses fragments de 15 et 56 kDa, produits par la trypsine, qui demeurent fortement associés l'un à l'autre au cours des étapes subséquentes de chromatographie (Katayama *et al.*, 2005). Le traitement de cellules HeLa (cellules cancéreuses

du col de l'utérus), une lignée particulièrement sensible à la PS1Aa1, avec ce complexe entraîne une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de Ca^{++} libre, une diminution du niveau de synthèse des protéines et de l'ADN, et l'activation de la caspase-3, une enzyme qui joue un rôle central dans le mécanisme de l'apoptose (Katayama *et al.*, 2007). Selon les auteurs de ces expériences, la toxine agirait sans produire de pores dans la membrane plasmique des cellules (Katayama *et al.*, 2007).

1.6.3.1.2. Parasporines-2

Seulement trois membres de la famille des parasporines-2 ont été décrits jusqu'à présent. La plupart des études se limitent à évaluer la toxicité de ces toxines et à décrire les changements morphologiques qu'elles induisent dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 2000; Namba *et al.*, 2003; Hayakawa *et al.*, 2007). Une étude plus poussée a cependant démontré que la PS2Aa1 (Cry46Aa1) entraîne la lyse des cellules HepG2 (hépatocytes cancéreux), mise en évidence par des mesures d'influx d'iodure de propidium et de fuite de lactate déshydrogénase (Kitada *et al.*, 2006). Cependant, cette toxine forme des pores dans des membranes lipidiques artificielles (résultats non publiés, établis au laboratoire Schwartz). De plus, après incubation avec les cellules, la PS2Aa1 se retrouve dans la fraction membranaire correspondant aux radeaux lipidiques, et son interaction avec la membrane plasmique semble être due, comme celle de nombreuses toxines Cry insecticides (Section 1.6.1.), à une fixation spécifique sur une protéine ancrée dans la membrane par un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (Abe *et al.*, 2008; Kitada *et al.*, 2009). Finalement, la PS2Aa1 est la seule parasporine dont on connaît la structure tridimensionnelle (Akiba *et al.*, 2009).

Comme il a été décrit plus haut (Section 1.5.3.), cette structure diffère grandement de celle de toutes les autres toxines Cry pour lesquelles la structure a été établie jusqu'à présent.

1.6.3.1.3. Parasporines-3

Il n'y a présentement que deux membres connus dans la famille des parasporines-3. Bien que ces protéines aient été testées dans plusieurs lignées cellulaires, elles ne se sont avérées toxiques que pour les cellules HL60 (leucémie myéloïde) et HepG2. Leur mécanisme d'action n'a cependant pas encore été étudié de façon détaillée (Yamashita *et al.*, 2005).

1.6.3.1.4. Parasporine-4

L'analyse de la séquence de la seule PS4 décrite jusqu'à présent montre que celle-ci se distingue des autres parasporines, à l'exception des PS2, en ce qu'elle ne possède pas de blocs conservés d'acides aminés (Saitoh *et al.*, 2006). Elle pourrait donc, comme la PS2Aa1, avoir une structure tridimensionnelle complètement différente de celle des autres toxines Cry dont la structure tertiaire est connue (Section 1.5.3). La PS4Aa1 (Cry45Aa1) et les membres de la famille des PS2, ont d'ailleurs en commun une taille, aussi bien pour la protoxine que pour la toxine activée, beaucoup plus petite que celle des autres parasporines (Tableau I). Des expériences d'efflux de lactate déshydrogénase ont montré que la PS4Aa1 entraîne la lyse des cellules Caco-2 sensibles, mais n'a pas d'effet sur les cellules HeLa insensibles (Okumura *et al.*, 2011).

1.6.3.1.5. Parasporine-5

Le site web de classification des parasporines ne mentionne qu'une seule PS5 (Cry64Aa1). Seule sa séquence est disponible.

1.6.3.1.6. Parasporine-6

Une seule parasporine-6 (Cry63Aa1) a été décrite jusqu'à présent. Elle est toxique pour les cellules cancéreuses HeLa, HepG2 et Caco-2 (cancer du côlon), mais aussi pour les cellules normales du foie HC, bien que plus faiblement pour ces deux dernières lignées (Nagamatsu *et al.*, 2010).

1.6.3.2. PS1Aa2

Ayant surtout été étudiées par des chercheurs japonais, la plupart des souches de *B. thuringiensis* qui produisent des parasporines sont d'origine asiatique. Néanmoins, la souche M15 qui produit la PS1Aa2a (Cry31Aa2) a été isolée à partir de cadavres de tétranyques à deux points (*Tetranychus urticae*) dans un verger de pommiers à Frelighsburgh au Québec. Elle n'est cependant pas toxique pour l'espèce d'araignée d'où elle provient (Jung *et al.*, 2007).

Par rapport à la PS1Aa1, on trouve 25 substitutions dans la séquence de la PS1Aa2, en plus d'une insertion de 19 acides aminés aux positions 68-86 (Jung *et al.*, 2007). En absence de digestion enzymatique, la protoxine n'a pas montré de cytotoxicité. Son analyse par électrophorèse laisse voir deux bandes (86 et 79 kDa) mais celles-ci ont la même séquence à l'extrémité N-terminale. Lors de son activation, la trypsine coupe aux positions 97-98, 112-113, et 250-251, ce qui génère deux polypeptides de masse moléculaire de 70 et 55 kDa. À des concentrations plus élevées de trypsine, la digestion produit seulement des polypeptides de 55

et 15 kDa. Le polypeptide de 15 kDa correspond au fragment situé entre le deuxième et le troisième site de clivage de la trypsine (Figure 3) (Jung *et al.*, 2007).

Ces deux parasporines-1 sont actives contre les lignées cancéreuses HeLa, HL60 et HepG2, bien que la PS1Aa2 soit 150 fois plus toxique pour les cellules HepG2 que la PS1Aa1. Contrairement à la PS1Aa1, la PS1Aa2 est toxique pour les cellules leucémiques Jurkat et les cellules UtSMC dérivées de cellules normales du muscle lisse de l'utérus. La PS1Aa2 est également toxique pour les cellules TCS (cancer de l'utérus), mais la PS1Aa1 ne semble pas avoir été testée sur ces cellules (Jung *et al.*, 2007).

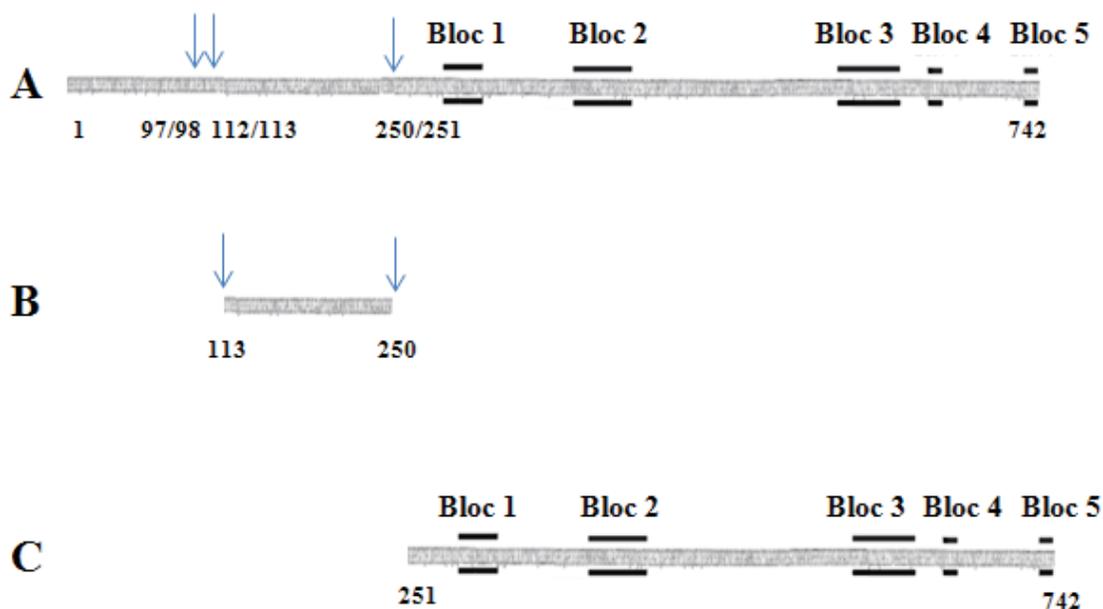


Figure 3. Schéma de la structure de la PS1Aa2. (A) Prototoxine. (B) Segment des acides aminés 113-250 qui correspond au polypeptide de 15 kDa. (C) Segment des acides aminés 251-742 correspondant au fragment actif de 55 kDa. Flèches: sites de coupure de la protoxine par la trypsine. La position des blocs d'acides aminés conservés dans de nombreuses toxines Cry et séparés par des régions variables sont indiqués.

1.7. Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'étudier le mécanisme par lequel la PS1Aa2 tue les cellules cancéreuses pour lesquelles elle est toxique (Jung *et al.*, 2007). Au cours de la dernière vingtaine d'années, la recherche sur le mode d'action des toxines du bacille de Thuringe, et en particulier celui des toxines Cry, a démontré clairement et à maintes reprises qu'elles agissent principalement en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles (Gill *et al.*, 1992; Knowles, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2007; Vachon *et al.*, 2012). La conclusion de Katayama *et al.* (2007) selon laquelle la PS1Aa1 tuerait les cellules sensibles sans former de pores dans leur membrane cellulaire peut donc paraître surprenante. Dans un premier temps, la capacité de la PS1Aa2 à former des pores a donc été explorée en utilisant un système de bicouches lipidiques planes. Ces expériences ont montré que la toxine forme effectivement des canaux ioniques comme les autres toxines Cry étudiées auparavant (Schwartz *et al.*, 1993; Peyronnet *et al.*, 2001).

D'autre part, la PS1Aa1 induit des changements dans la concentration cytoplasmique de Ca^{++} dans les cellules sensibles (Katayama *et al.*, 2007). Bien que des effets semblables aient été démontrés pour quelques toxines Cry insecticides (Schwartz *et al.*, 1991; Monette *et al.*, 1997; Potvin *et al.*, 1998), le mécanisme responsable de ces augmentations dans les cellules cancéreuses n'a pas encore été clairement établi. Les effets de la PS1Aa2 sur les niveaux intracellulaires de Ca^{++} ont donc été analysés dans les cellules HeLa et HepG2. Ces expériences ont mis en lumière l'induction d'oscillations dans les niveaux calciques en présence de PS1Aa2 contrastant avec les augmentations soutenues observées auparavant avec la PS1Aa1 (Katayama *et al.*, 2007).

Finalement, au cours de cette étude, il est devenu clair que les préparations de toxines utilisées étaient beaucoup moins toxiques que prévu sur la base des données publiées (Jung *et al.*, 2007). Cette cytotoxicité modeste s'accompagne d'une faible solubilité qui semble être principalement due à une association étroite de la toxine avec de l'ADN mise en évidence avec une sonde fluorescence spécifique pour cet acide nucléique.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Toxines

Les parasporines PS1Aa1 et PS1Aa2 ont été préparées au Centre de recherche et développement en horticulture d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Saint-Jean-sur-Richelieu selon le protocole décrit par Jung *et al.* (2007). Les clones de *B. thuringiensis* possédant un plasmide qui code pour la protoxine de la souche A1190 (PS1Aa1) ou pour celle de la souche M15 (PS1Aa2) ont été cultivés dans un bouillon composé de 0.5 mM MgCl₂, 0.01 mM MnCl₂, 0.05 mM FeCl₃, 0.05 mM ZnCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 13 mM KH₂PO₄, 26 mM K₂HPO₄, 20 mg/l glutamine, 1 g/l hydrolysate acide de caséine, 1 g/l hydrolysate enzymatique de caséine, 0.4 g/l extrait enzymatique de levure et 0.6 g/l glycérol, à 30°C pendant 4 jours, jusqu'à ce que la plupart des cellules aient sporulé. Les cristaux ont ensuite été purifiés par centrifugation sur gradient de sucrose et solubilisés dans un tampon carbonate de sodium (50 mM, pH 10.5) additionné de 1 mM d'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) et de 10 mM de dithiothréitol (DTT). Après centrifugation à 2900 x g pendant 20 min pour éliminer le matériel insoluble, le pH du surnageant a été ajusté à 8.0 avec du tampon Tris [Tris(hydroxyméthyl)aminométhane]-HCl et incubé avec 0.01-0.02 mg de trypsine/mg de protoxine à 37°C pendant 1 h. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et le produit a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). La concentration finale de la forme activée de la toxine (55 kDa) a été estimée en comparant l'intensité de la bande correspondante avec celle de quantités connues d'albumine sérique de bœuf (BSA). Le spectre

d'absorbance de la toxine aux longueurs d'onde de 220 à 350 nm a été mesuré dans un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

La toxine Cyt1Aa1 du bacille de Thuringe nous a été généreusement fournie, dans sa forme activée, par Marianne P. Carey de la Case Western Reserve University School of Medicine (Cleveland, OH).

Le suc intestinal de *Manduca sexta* a été obtenu à partir de larves du cinquième stade (Fortier *et al.*, 2007). Des intestins moyens ont été disséqués et leur contenu centrifugé à 7500 x g pendant 10 min à 4°C pour enlever le matériel insoluble. Le surnageant a été conservé à -80°C et utilisé avant deux semaines.

2.2. Culture cellulaire

Les expériences ont été réalisées avec des lignées de cellules humaines non tumorales provenant du rein embryonnaire (HEK 293) et des cellules cancéreuses du col utérin (HeLa) et du foie (HepG2) appartenant à la collection de cellules du GÉPROM. L'absence de mycoplasmes a été vérifiée pour chacune d'entre elles. Les cellules ont été cultivées à 37°C sans CO₂, dans des boîtes de Petri de 35 et de 100 mm ou des plaques de 96 puits, avec du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco 12100-046) contenant une concentration élevée (4.5 g/l) de glucose pour les cellules HEK 293, du milieu DMEM (Gibco 31600-034) à faible concentration de glucose (1 g/l) pour les HepG2, et du milieu MEM (Modified Eagle Medium) (Gibco 61100-061) pour les cellules HeLa. Les trois milieux étaient tamponnés à pH 7.3 avec 25 mM d'Hepes [acide 4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonique]/NaOH et 6 mM de bicarbonate de sodium. Ils étaient enrichis

avec 10% (v/v) de sérum fœtal de veau (Gibco), 10 000 U de pénicilline et 10 000 µg/L de streptomycine (Gibco). L'osmolalité des milieux (290 mOsmol/Kg) a été vérifiée avec un osmomètre DigiMatic 3D2 (Advanced Instruments, Needham Heights, MA).

Les cellules ont été repiquées tous les trois ou quatre jours. Les boîtes de Petri ont été rincées avec du milieu PBS (*Phosphate-buffered saline*) (Gibco), pH 7.4, sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ pour les cellules HEK 293 et HeLa, ou avec de la trypsine 0.05% (p/v) (Gibco) pour les cellules HepG2. Les cellules ont été décollées en les incubant avec de la trypsine (0.05%) pendant 5 (cellules HEK 293 et HeLa) ou 15 min (cellules HepG2). L'action de la trypsine a ensuite été arrêtée en ajoutant du milieu de culture. La densité d'une suspension homogène de cellules a été estimée dans un hémacytomètre Bright-Line (Horsham, PA). Les boîtes de Petri de 100 mm ont étéensemencées avec environ 1×10^5 cellules/ml (10 ml/boîte), celles de 35 mm, avec 1×10^4 cellules/ml (2 ml/boîte), et les plaques de 96 puits, avec 2.2×10^4 cellules/ml (100 µl/puits).

2.2.1. Observations microscopiques

Les cellules ont été observées sous un grossissement de 400 X avec un microscope Nikon Diaphot 300 et photographiées avec une caméra Nikon Coolpix E995 3.34 mega pixels.

2.3. Bicouches lipidiques planes

2.3.1. Dispositif expérimental

La capacité de la toxine à former des pores dans une bicouche lipidique plane a été examinée avec la technique de Mueller *et al.* (1962). Le système de bicouche comporte une chambre contenant deux solutions aqueuses de KCl (cis et trans) reliées par un orifice de 250

μm de diamètre dans lequel on forme une bicouche lipidique plane. Des électrodes d'Ag-AgCl sont reliées à chacun des deux compartiments par l'intermédiaire de ponts d'agar (1 M KCl). Une différence de potentiel électrique est appliquée de part et d'autre de la membrane avec le côté trans relié à la terre. Une déflexion positive en réponse à un potentiel positif correspond à un mouvement de charges positives dans les sens cis-trans (Figure 3).

L'ensemble du montage est placé dans une petite cage de Faraday en aluminium et monté sur une table anti-vibration (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA). L'orifice dans la chambre de téflon est observé avec un microscope binoculaire (Nikon) monté horizontalement devant la chambre. Les courants ioniques transmembranaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur de patch-clamp Axopatch-1D (Axon Instruments, Foster City, CA) en configuration de potentiel imposé (Voltage-Clamp).

2.3.2. Lipides

Les lipides utilisés pour former la bicouche lipidique sont constitués d'un mélange de phosphatidylcholine (70%), de phosphatidyléthanolamine (20%) et de cholestérol (10%) naturels provenant de chez Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). Les phospholipides sont dissous dans du n-décane afin d'obtenir une concentration finale de 20 mg/ml et conservés à -20°C .

2.3.3. Prétraitement

Les chambres de téflon sont nettoyées en les plongeant dans du NaOH (1 M). Avant chaque utilisation, elles sont rincées à l'eau, au méthanol et au chloroforme pour éliminer toute trace de toxine et de lipides. L'orifice dans lequel la bicouche sera peinte est préalablement traité avec le mélange de phospholipides utilisé pour la formation de la

membrane et soumis à un jet d'azote afin d'évaporer le décane dans le but de former un anneau lipidique. Ce prétraitement favorise la stabilité et l'étanchéité des membranes qu'on va peindre par la suite.

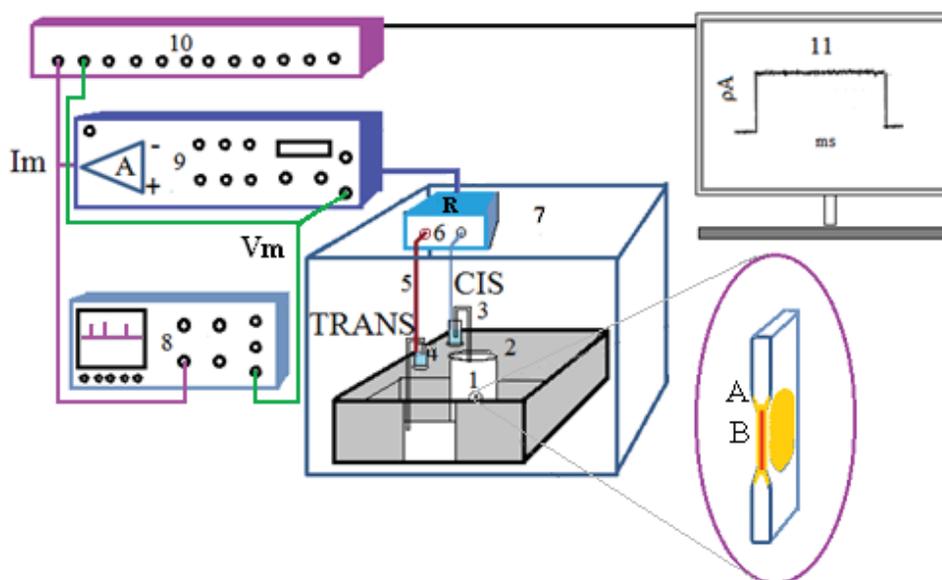


Figure 4. Schéma du montage d'un système de bicouches. 1: chambre en téflon (cis), magnification de l'orifice avec l'anneau (A) et la bicouche lipidique (B); 2: chambre; 3: ponts d'agar; 4: petites chambres; 5: électrodes; 6: préamplificateur; 7: cage de Faraday; 8: oscilloscope; 9: amplificateur; 10: numériseur; 11: ordinateur.

2.3.4. Formation de la membrane

Avant de peindre la membrane, le potentiel de jonction liquide est annulé en appliquant un potentiel équivalent de polarité contraire. Au cours de l'expérience, ce potentiel ne doit pas être réajusté même si les conditions expérimentales dans l'une ou l'autre des deux chambres sont modifiées. La bicouche lipidique est peinte à l'aide d'une pipette de verre dont l'extrémité a été arrondie, en la passant sous une flamme, et plongée dans les lipides.

L'épaisseur de la membrane est vérifiée en appliquant une impulsion triangulaire de courant, et sa capacitance doit se situer entre 120 et 200 pF.

2.3.5. Incorporation de la toxine

Les expériences sont réalisées à température ambiante (20-25°C). Après avoir observé la stabilité de la membrane pendant 15 minutes, on ajoute la toxine du côté cis à une concentration finale de 1 à 10 µg/ml.

2.3.6. Acquisition et analyses

Au moment de l'activité canal en réponse aux différents voltages imposés, le courant transmembranaire est mesuré pendant 1-2 minutes sous la forme d'un potentiel électrique, les données sont filtrées de façon analogique avec le filtre intégré de type Bessel (80 dB/décade) de l'Axopatch-1D à 2 kHz afin de satisfaire au critère de Nyquist (la fréquence d'échantillonnage doit être 2.2 fois supérieure à la fréquence maximale du signal). Elles sont numérisées à l'aide d'un convertisseur Digidata 1440A (Molecular Devices, Union City, CA) et l'échantillonnage est fait à 5 kHz puis, elles sont conservées dans la mémoire de l'ordinateur. Les analyses sont faites sur l'ordinateur à l'aide du logiciel Clampfit version 10.2.0.12 (Molecular Devices). Au moment de l'analyse, les données sont filtrées de façon numérique (filtre gaussien). Les mesures de courant sont faites de façon manuelle avec les curseurs du logiciel; des histogrammes de distribution de fréquence sont utilisés aussi pour la mesure de l'amplitude (automatique) des événements nombreux et rapides. Le temps et les probabilités sont calculés d'après les mesures obtenues à partir de modèles de simulation des événements.

2.4. Microspectrofluorométrie

2.4.1. Dispositif expérimental

La concentration intracellulaire de Ca^{++} a été estimée en utilisant la sonde fluorescente Fura-2 (Molecular Probes, Eugene, OR) et un microscope inversé Olympus IMT-2 couplé à un spectrofluorimètre PTI (Photon Technology International, Birmingham, NJ) équipé d'une lampe à Xénon et d'un objectif Nikon 40 X Neofluor. Les longueurs d'onde d'excitation ont été fixées à 350 et 380 nm, avec échantillonnage chaque seconde, et les fentes à 1.25 mm. Un miroir dichroïque (Nikon 400 DM) a été placé dans la voie d'excitation. L'émission a été suivie à 505 nm avec un filtre passe-bande 500FSI0 (Andover Corporation, Salem, NH). Le détecteur fonctionne en mode compteur de photons. Les données ont été acquises et analysées sur l'ordinateur à l'aide du logiciel FeliX version 1.2 (Photon Technologies).

Au cours de ce travail, l'appareil utilisé pour les mesures de microspectro-fluorométrie a été modifié : la lampe a été remplacée, le trajet optique a été réaligné, et un nouveau logiciel (FelixGx version 4.2.2.5265) a été installé. Cette mise à jour a entraîné des modifications dans les niveaux de base et dans l'amplitude des variations de fluorescence en réponse aux traitements expérimentaux. Comme la plupart des expériences présentées dans ce mémoire ont été réalisées avant ces changements, leurs effets ne portent que sur quelques figures, identifiées dans leurs légendes.

2.4.2. Technique

Des cellules HeLa, HepG2 ou HEK 293 ont été cultivées sur des lamelles de microscope de 25 mm de diamètre dans des boîtes de Petri de 35 mm pendant 1 à 2 jours. Les lamelles ont été placées sur le microscope dans une chambre de perfusion et rincées avec la

solution Earles modifiée (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose et 10 mM Hepes/Tris, pH 7.4). Dans certaines expériences, le calcium de cette solution a été remplacé par 10 mM d'EGTA (éthylène glycol-bis (2-aminoéthyléther)-*N,N,N',N'*-tétraacétate), un chélateur du calcium. Le montage permet de changer rapidement la solution du bain au cours de l'expérience tout en évitant de déplacer les cellules sur la surface de la lamelle. Une première lecture (60 secondes) a été réalisée avant le chargement pour mesurer l'autofluorescence. Les cellules ont ensuite été chargées avec 5 μ M du dérivé acétoxyméthylester du Fura-2 (Fura-2 AM) dans la solution Earles modifiée pendant 30-45 min à température ambiante. Contrairement à la forme acide du Fura-2, le Fura-2 AM peut diffuser au travers des membranes biologiques. Selon les expériences, la solution de chargement pouvait contenir ou non 1.8 mM de calcium. La chambre a ensuite été rincée et incubée pendant 15-20 min pour permettre aux estérases cytosoliques de compléter l'hydrolyse du Fura-2 AM, avant le début des expériences. Celles-ci ont été réalisées en sélectionnant la fluorescence émise par une cellule isolée ou un petit groupe de 8 cellules ou moins.

2.5. Viabilité cellulaire

2.5.1. Bleu de trypan

Les effets de la toxine sur la viabilité des cellules ont été observés avec le bleu de trypan (Sigma). Après avoir été rincées avec du PBS (pH 7.4), sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, les cellules ont été décollées en les incubant avec de la trypsine (0.05%) comme dans le passage de cellules. Les suspensions ont été traitées en ajoutant 10 μ l d'une solution à 0.4% (p/v) de bleu

de trypan par 100 μ l, et les cellules intactes (blanches) et endommagées (bleues) ont alors été comptées dans un hémacytomètre.

2.5.2. Homodimère-1 d'éthidium

La viabilité des cellules a été évaluée avec l'homodimère-1 d'éthidium (Molecular Probes, Eugene, OR, Lot No. 2531-4), une molécule dont la fluorescence est grandement accrue lorsqu'elle s'intercale dans la double hélice de l'ADN des cellules endommagées. Les expériences ont été réalisées dans une solution Earles modifiée et filtrée avec des membranes Millipore dont les pores avaient un diamètre de 0.2 μ m. Pour chaque expérience, une solution de travail est préparée en diluant la solution mère d'homodimère d'éthidium (12 mM dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO)) par un facteur 1000 dans la solution Earles modifiée. Juste avant de mesurer la fluorescence d'un puits, on ajoute 100 μ l de la solution de travail à la culture cellulaire (100 μ l), pour obtenir une concentration finale de réactif de 6 μ M.

La fluorescence a été mesurée à 24°C dans un lecteur de plaques Infinite F200pro de Tecan (Durham, NC) équipé de filtres en mode de lecture par le bas. Les lectures ont été faites aux longueurs d'onde d'excitation de 540 nm et d'émission de 598 nm. Les expériences ont été réalisées avec des plaques en plastique transparent de 96 puits à fonds plats (Sarstedt) et avec couvercle. Les puits utilisés pour la lecture étaient séparés les uns des autres par des puits vides, et les puits situés sur le bord de la plaque n'ont pas été utilisés. Quatre lectures ont été faites avec un faisceau de forme circulaire à 750 nm du bord de chaque puits. Les données ont été acquises et analysées avec le logiciel Tecan i-control version 1.9.17.0.

Les cellules incubées avec l'homodimère d'éthidium, dans les conditions décrites plus haut, ont également été examinées avec un microscope Nikon Diaphot 300 équipé d'une

lampe à Xénon (Nikon), avec une cassette à filtre G-2A comportant un filtre d'excitation (510-560 nm), un miroir dichroïque (580 nm) et un filtre barrière (590 nm), et d'un obturateur Lambda 10 (Sutter Instruments, Novato, CA).

2.6. Analyse des résultats

Les expériences réalisées avec de la toxine et présentées dans ce mémoire ont été répétées au moins trois fois. Le nombre d'expériences réalisées pour chaque condition expérimentale est indiqué dans la légende des figures. Dans le cas où des valeurs moyennes sont présentées, elles sont accompagnées de l'écart-type et du nombre d'expériences à partir desquelles celles-ci ont été calculées.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1. Préparation des parasporines

Les toxines utilisées pour ces expériences proviennent de cristaux concentrés et solubilisés. Les gels d'électrophorèse de la PS1Aa2 montrent la protoxine (86 kDa) et d'autres polypeptides qui peuvent être le résultat d'une digestion partielle de la protoxine par des métalloprotéases provenant de la bactérie (PS1Aa2 colonnes 2 et 4 de la Figure 5). Les échantillons de toxine activée avec la trypsine montrent une protéine de 55 kDa, identifiée auparavant, avec un polypeptides de 15 kDa, comme le fragment actif (Katayama *et al.*, 2005, 2007; Jung *et al.*, 2007), et plusieurs protéines mineures (PS1Aa1 colonnes 3 et 5 de la Figure 5). La proportion de la protéine de 55 kDa par rapport aux autres protéines varie quelque peu parmi les différentes préparations de toxine utilisées (Figure 6).

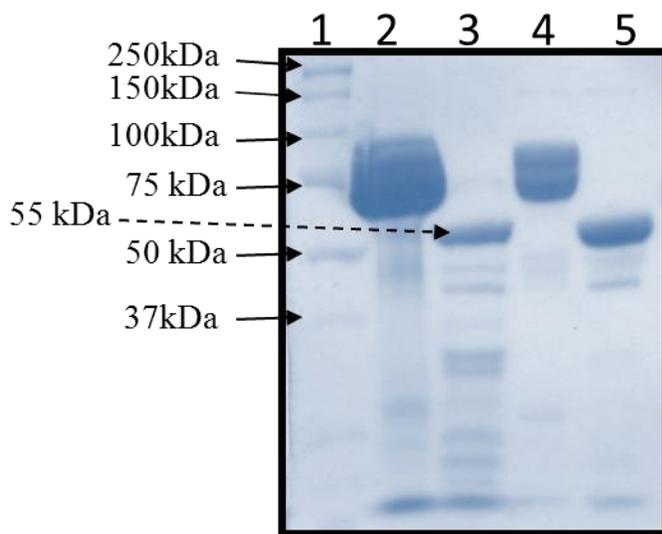


Figure 5. Analyse sur gel de polyacrylamide de préparations de parasporines. Le gel de séparation contenait 10% d'acrylamide. 1 : Marqueurs de poids moléculaire; 2 : Protoxine PS1Aa2; 3 : PS1Aa2 activée; 4 : Protoxine PS1Aa1; 5 : PS1Aa1 activée. Gel représentatif d'une de six préparations de PS1Aa2 et de la seule préparation de PS1Aa1.

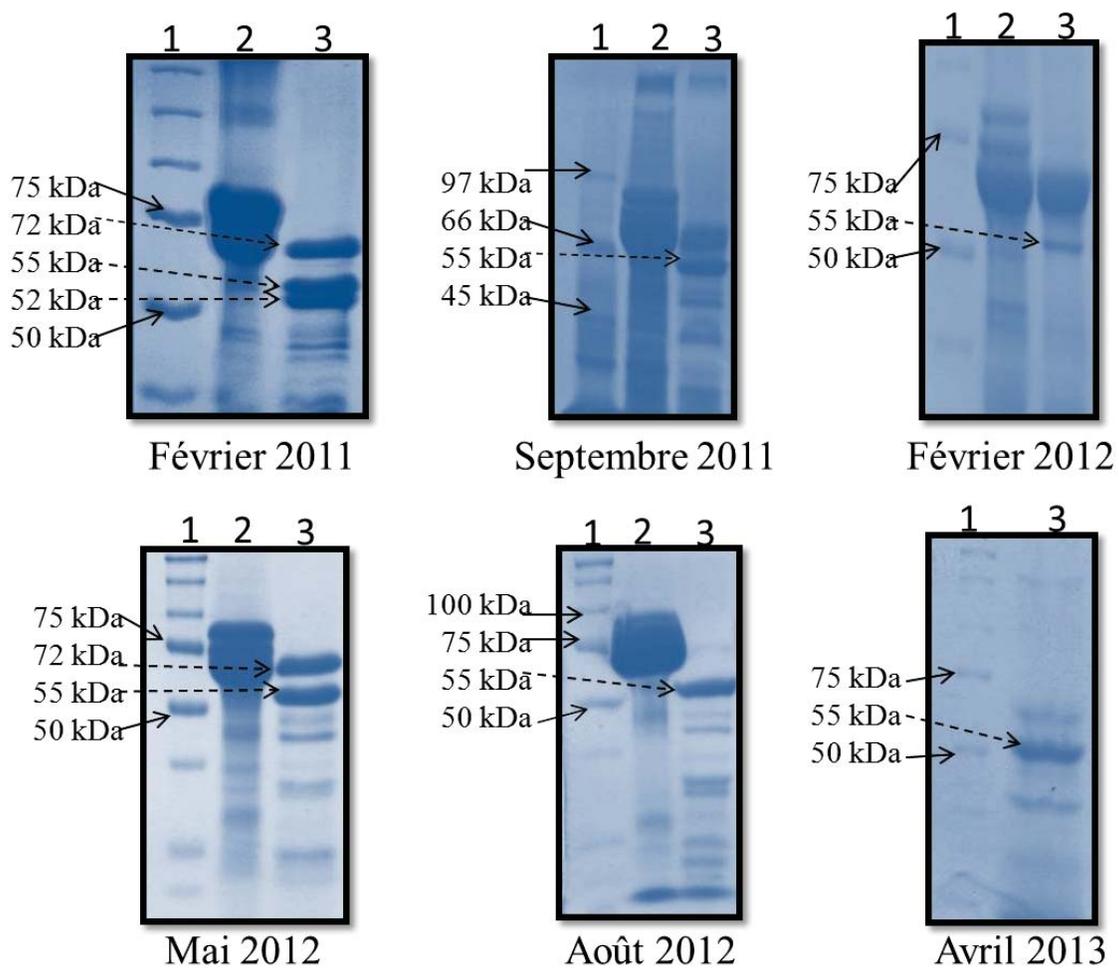


Figure 6. Analyse sur gel de polyacrylamide des préparations de PS1Aa2 utilisées au cours de ce travail. Le gel de séparation contenait 10% d'acrylamide. 1 : Marqueurs de poids moléculaire; 2 : Protoxine PS1Aa2; 3 : PS1Aa2 activée.

3.2. Effets morphologiques des toxines

La capacité des toxines à endommager des cellules sensibles a d'abord été examinée avec des cellules HeLa et HepG2 incubées avec ou sans 10 $\mu\text{g/ml}$ de PS1Aa2, une concentration beaucoup plus élevée que celles qui se sont avérées capables de tuer la plupart des cellules de ces deux lignées (Jung *et al.*, 2007). Contrairement aux cellules non traitées, qui ont conservé leur apparence normale et une morphologie typique pendant plusieurs heures, les cellules traitées sont devenues progressivement plus rondes et moins bien étalées (Figure 7). Les changements morphologiques sont plus évidents pour les cellules HeLa, étant donné leur forme très allongée, mais sont clairement apparents pour les deux lignées cellulaires. Des essais supplémentaires ont donc été réalisés avec les cellules HeLa en utilisant la toxine Cyt1Aa du bacille de Thuringe comme témoin positif. La sensibilité des cellules HeLa à cette toxine a déjà été démontrée (Katayama *et al.*, 2005). En accord avec ce résultat, les cellules HeLa exposées à 10 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa ont perdu progressivement leur morphologie à peu près aussi rapidement que celles qui étaient incubées avec la même concentration de PS1Aa2 (Figure 8). D'autre part, la PS1Aa2 a également été testée sur des cellules HEK 293, une lignée non tumorale. Malgré la concentration de toxine 10 fois plus élevée que dans les autres expériences, les cellules ont conservé leur morphologie et même augmenté leur nombre pendant les 24 h de l'expérience (Figure 9).

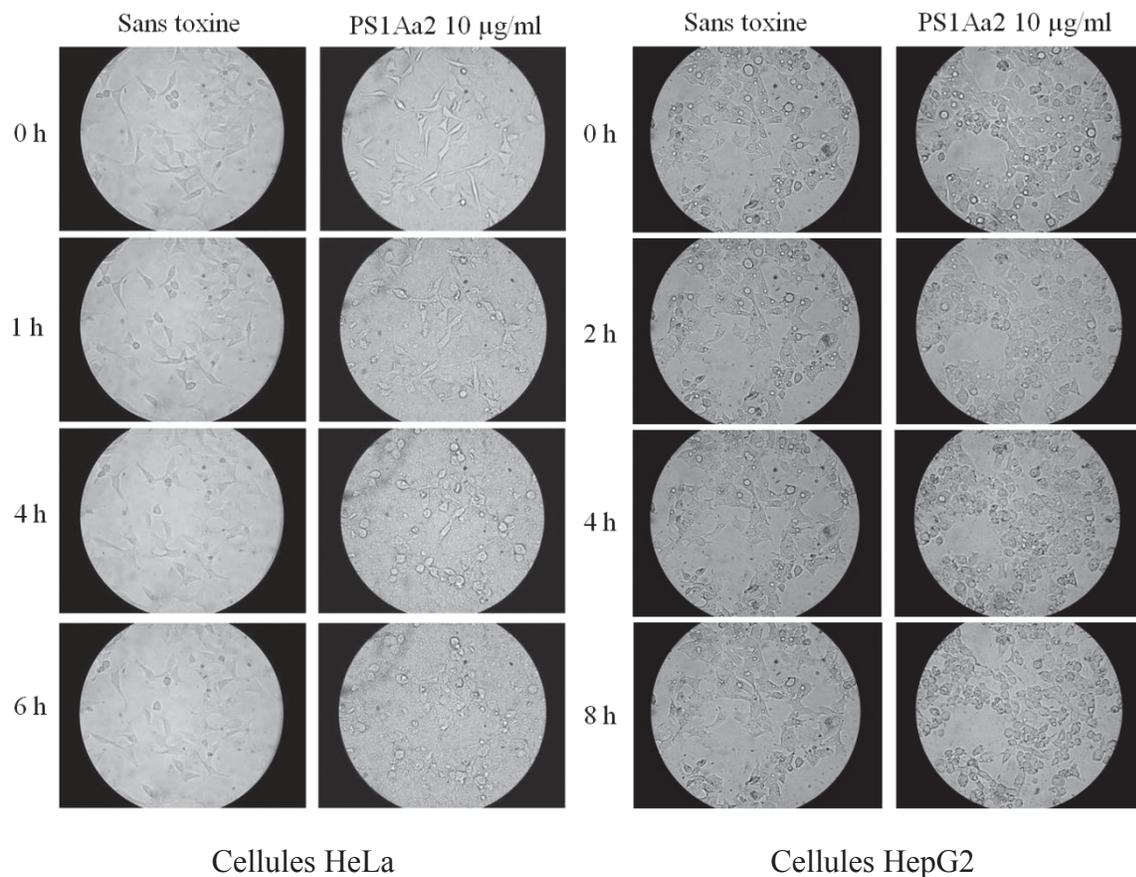


Figure 7. Effets de la PS1Aa2 sur la morphologie des cellules tumorales HeLa et HepG2. Les puits ont étéensemencés avec environ 2.2×10^4 cellules/ml, 24 h avant le début de l'expérience. Pour chaque condition, les observations ont été réalisées au microscope optique (400 X) sur le même champ, aux temps indiqués. Des observations microscopiques semblables à celles qui sont montrées dans la figure ont été réalisées à six reprises.

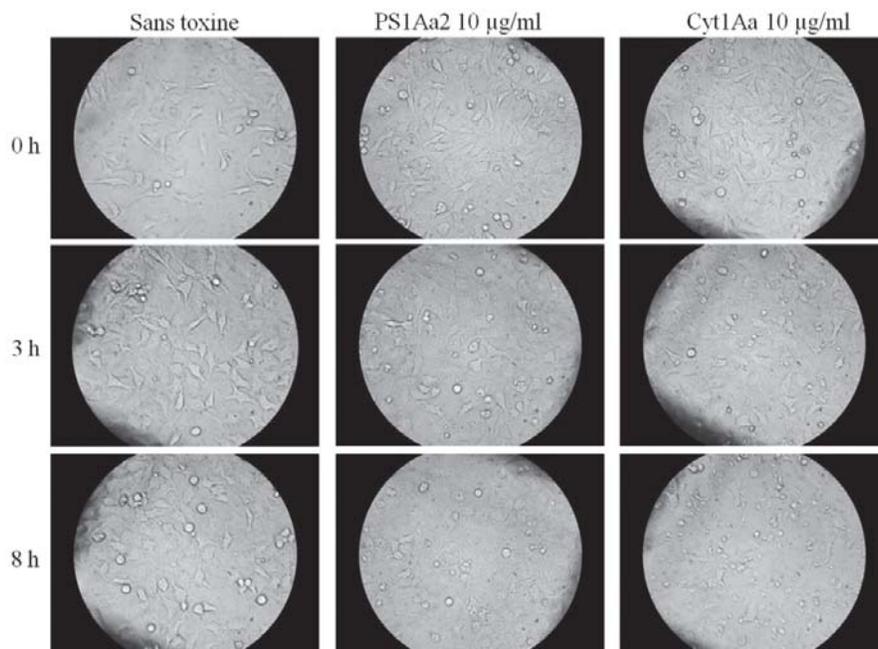


Figure 8. Comparaison des effets de la PS1Aa2 et de la Cyt1Aa sur la morphologie des cellules HeLa. Les conditions expérimentales non spécifiées dans la figure sont semblables à celles qui sont décrites dans la légende de la Figure 7. Les résultats montrés dans la figure sont représentatifs de trois expériences semblables.

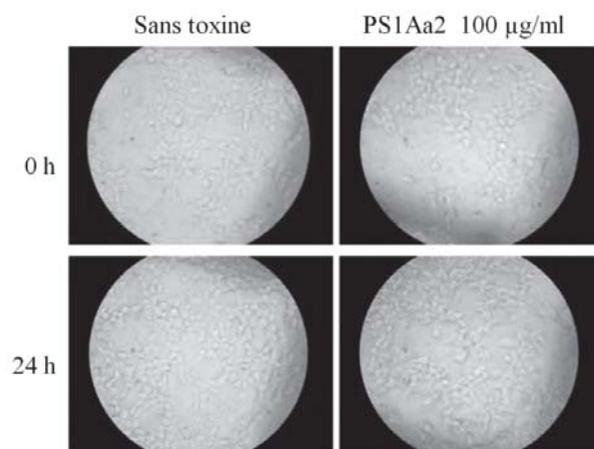


Figure 9. Effets de la PS1Aa2 sur la morphologie des cellules non tumorales HEK 293. Les conditions expérimentales sont semblables à celles qui sont décrites dans la légende de la Figure 7. Résultats représentatifs de trois expériences semblables.

3.3. Bicouches lipidiques

Étant donné que la PS1Aa2 montre un effet cytotoxique sur les cellules HeLa et HepG2 (Figures 7 et 8), sa capacité à former des canaux ioniques a été étudiée dans un montage de bicouches lipidiques.

En général, la toxine a effectivement produit l'activité typique de canaux ioniques. Afin de mieux observer les événements, les traces ont été filtrées à différentes fréquences (15-500 Hz); certaines ont été filtrées pour enlever le bruit qui pourrait cacher des événements; d'autres ont été filtrées à des fréquences plus élevées pour éviter la perte d'information lorsque les sauts de courant étaient très rapides.

L'activité se présente sous la forme de sauts de courant. Certaines expériences comportent de longues périodes d'inactivité avec des ouvertures uniques et d'autres présentent plusieurs ouvertures de courte ou de longue durées (Figure 10). Il y a aussi des expériences avec des rafales d'ouvertures et de fermetures rapides (Figure 11).

Des sauts de courant de différentes amplitudes ont été régulièrement enregistrés pour un même voltage au cours d'une même expérience (Figures 10-12). La présence de plusieurs niveaux de conductance a été observée avec chacune des préparations de toxine et dans plusieurs conditions expérimentales : en présence de 150 (Figure 11) ou 450 (Figure 12) mM de KCl de chaque côté de la membrane et en présence de KCl à 450 mM du côté cis et 150 mM du côté trans (Figure 13).

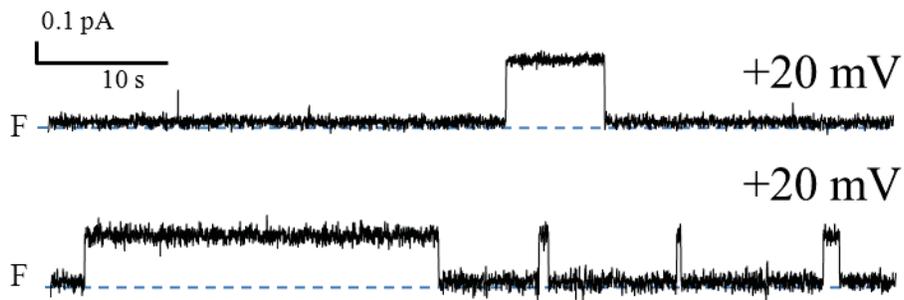


Figure 10. Activité canal observée dans deux expériences réalisées avec la PS1Aa2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution symétrique de KCl (150 mM) à +20 mV (traces filtrées à 15 Hz). F indique l'état fermé de tous les canaux.

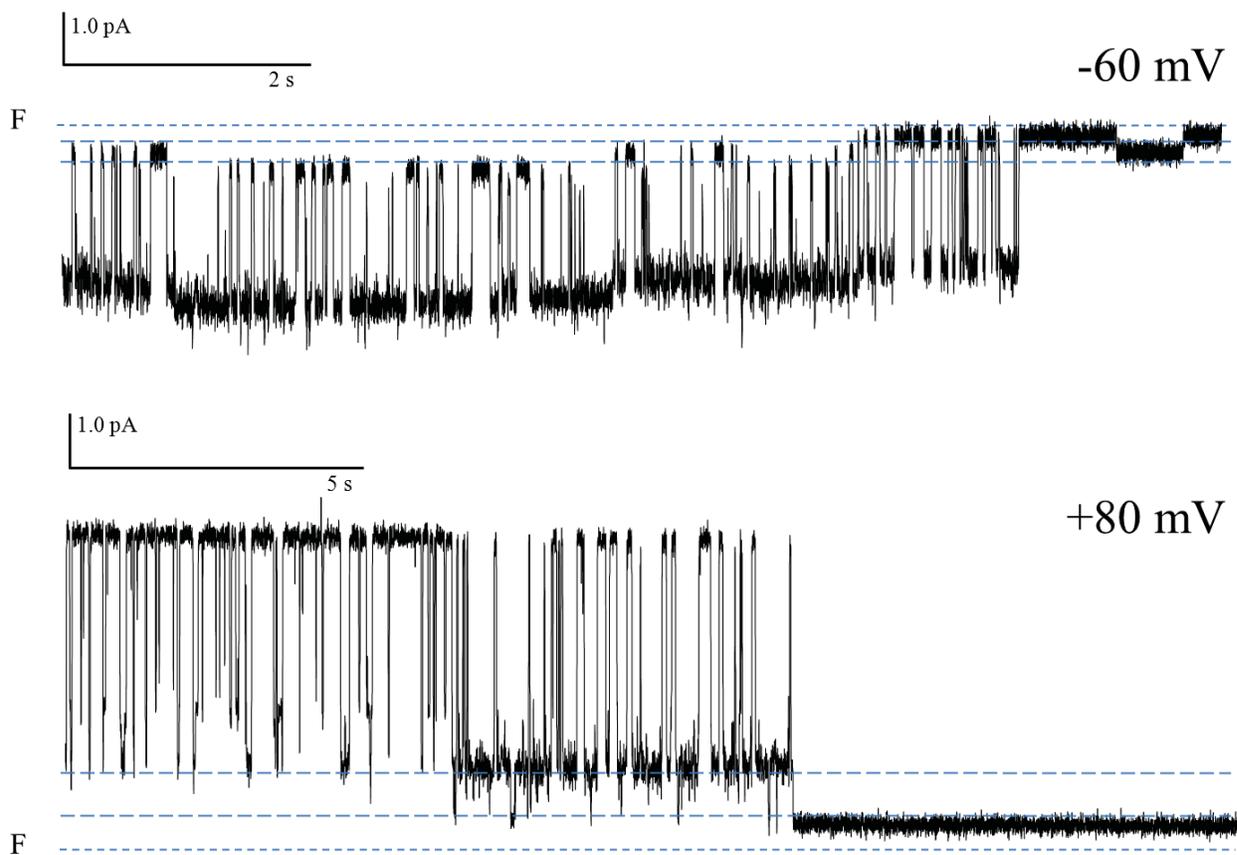


Figure 11. Activité canal de la PS1Aa2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution symétrique de KCl (150 mM). La trace enregistrée à -60 mV a été filtrée à 400 Hz et celle qui a été mesurée à 80 mV a été filtrée à 80 Hz. F indique l'état fermé de tous les canaux.

L'amplitude de certains grands sauts de courant correspond à un multiple simple de celle de sauts plus petits. Par exemple, la Figure 11 montre un premier saut (*) dont le niveau équivaut à la moitié de celui du suivant (**), ce qui pourrait suggérer que ce dernier résulte de l'ouverture simultanée de deux canaux de même taille. Par contre, la même figure montre des sauts beaucoup plus petits correspondant à des fermetures, ce qui pourrait suggérer qu'un canal puisse se présenter dans plusieurs sous-états de conductance.

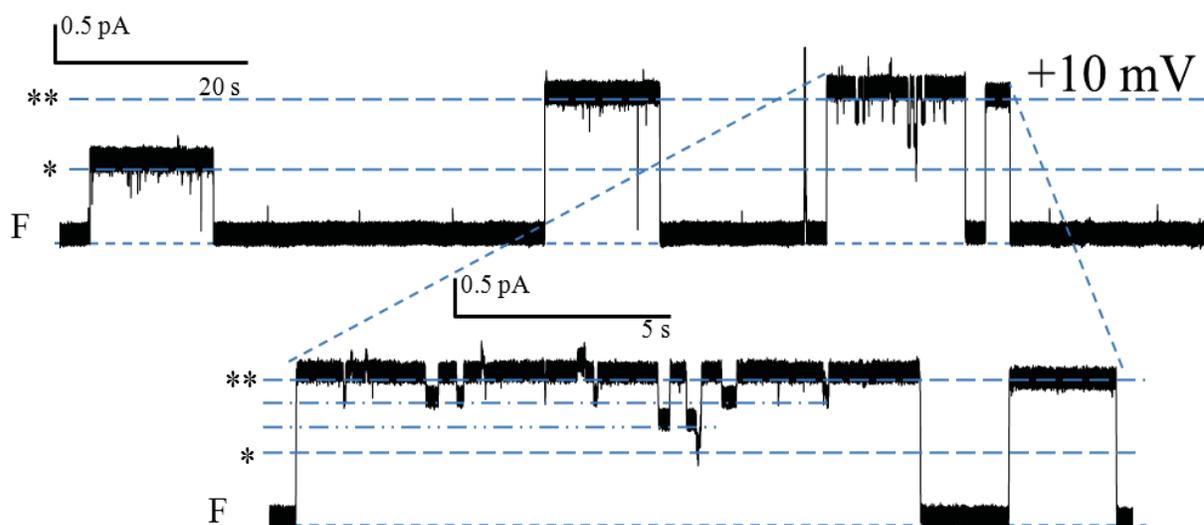


Figure 12. Activité canal de la PS1Aa2 (1.5 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution symétrique de KCl (450 mM) (trace filtrée à 40 Hz.). L'agrandissement sous la trace du haut montre un grand saut correspondant à une conductance de 180 pS qui s'accompagne de fermetures de plus petite amplitude correspondantes à de conductances de 26 et 40 pS. F indique l'état fermé de tous les canaux.

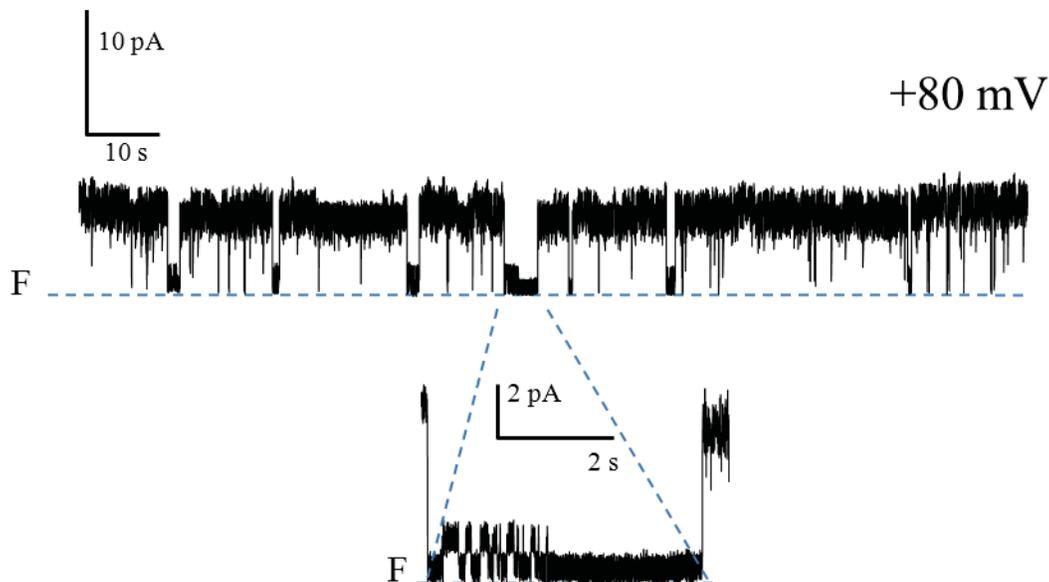


Figure 13. Activité canal de la PS1Aa2 (3 $\mu\text{g/ml}$) dans une solution asymétrique de KCl 450/150 mM (cis/trans) à +80 mV. La trace filtrée à 80 Hz permet de voir mieux l'activité de petits canaux. F indique l'état fermé de tous les canaux.

Afin d'analyser les propriétés électriques des canaux formés par la PS1Aa2, les courants ont été mesurés sur une gamme de voltages appliqués (Figure 14). Ceci a permis de tracer des courbes courant-voltage pour les niveaux de courant les plus fréquents qui ont pu être identifiés aisément dans les traces enregistrées à tous les voltages utilisés au cours d'une expérience (Figure 14). Les graphiques courant-voltage des canaux formés dans les bicouches lipidiques planes donnent des courbes linéaires dont la pente correspond à leur conductance. Ces canaux obéissent donc à la loi d'Ohm puisque leur conductance ne montre pas de rectification (Figure 15). C'est ainsi que les sauts les plus fréquemment observés dans l'expérience illustrée dans la Figure 14 ont montré des conductances proches de 16 et 20 pS. Un grand nombre d'expériences semblables à celle-ci ont été réalisées et les résultats sont résumés dans le Tableau II. Chaque niveau de conductance recensé dans ce tableau a été

observé à plusieurs voltages au cours d'une expérience donnée. La plupart de ces niveaux sont apparus dans plus d'une expérience conduite en présence de 150 mM ou de 450 mM de KCl. De plus, plusieurs niveaux de conductance ont été observés avec chacune des préparations de toxine utilisées au cours de cette étude et les conductances les plus fréquentes, d'environ 11, 16 et 21 pS, ont été détectées avec la plupart des préparations (Figure 16).

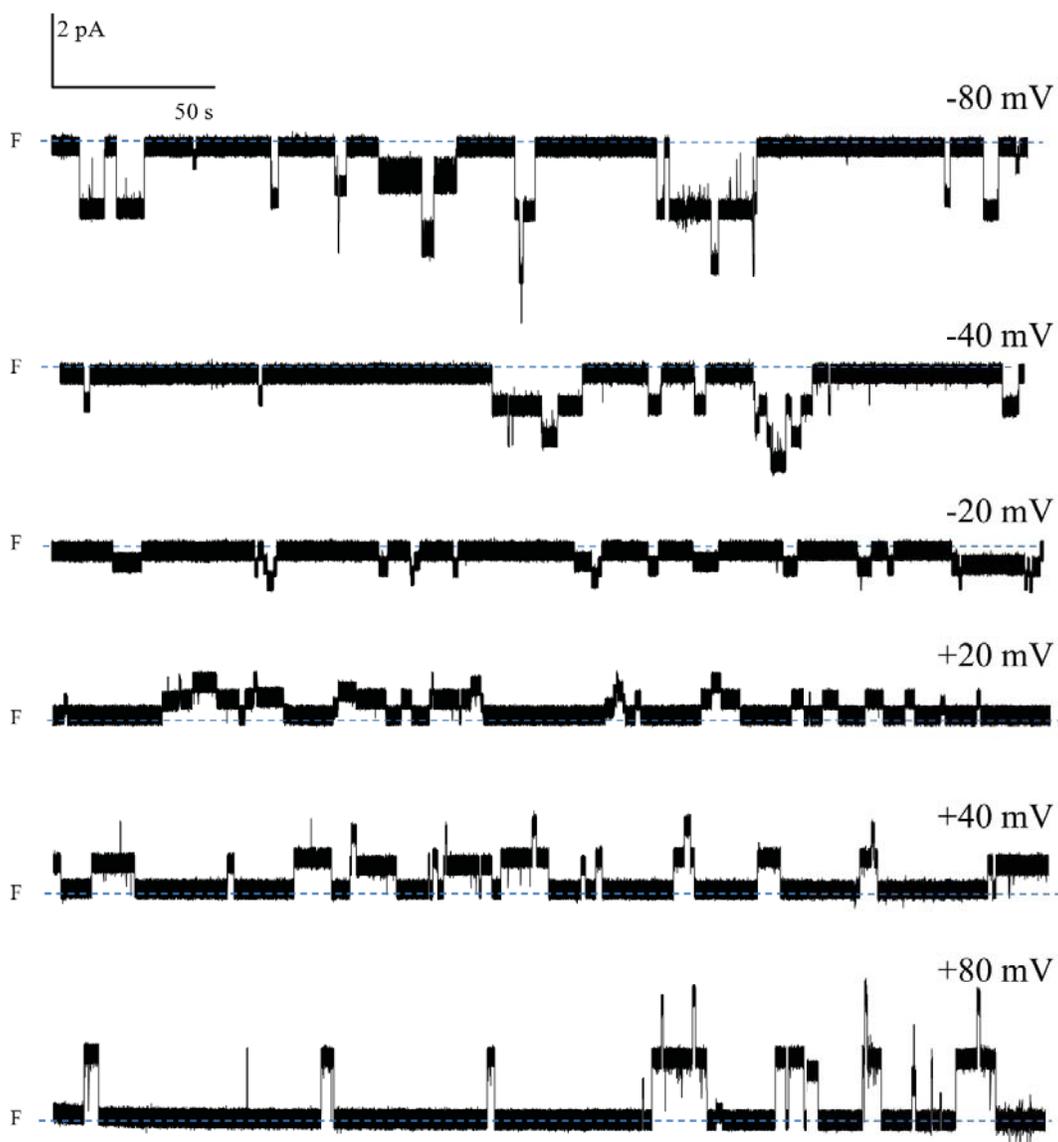


Figure 14. Activité canal de la PS1Aa2 (3 $\mu\text{g/ml}$) à différents voltages dans une solution symétrique de KCl (150 mM); les traces ont été filtrées à 25 Hz.

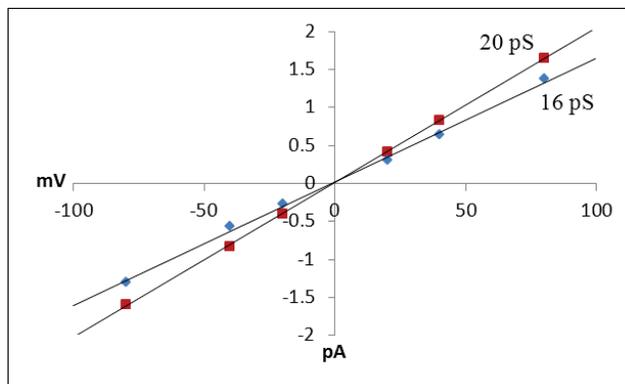


Figure 15. Courbes courant-voltage établies à partir des sauts de courants les plus fréquents observés au cours de l'expérience illustrée dans la Figure 13 réalisée avec la PS1Aa2 en présence de 150 mM de KCl.

Tableau II. Compilation des niveaux principaux de conductance observés au cours de l'ensemble des expériences faites avec la PS1Aa2.

150 mM KCl		450 mM KCl	
$G \pm SD$ (pS)	N	$G \pm SD$ (pS)	N
11 ± 1.2	10	10 ± 2.4	6
16 ± 1.7	9	20 ± 1.7	3
21 ± 1.3	11	32 ± 3.7	4
28 ± 1.6	5	40 ± 2.1	2
44 ± 1.1	2	138	1
50	1		
63 ± 0.1	2		
79	1		
106	1		

G, conductance moyenne ; SD, écart-type; N, nombre d'expériences au cours desquelles un niveau de conductance a été observé.

Un total de 25 expériences a été réalisé en présence de 150 mM de KCl et 8 expériences en présence de 450 mM de KCl de chaque côté de la membrane. Les conductances ont été obtenues à partir de courbes courant-voltage comme celles présentées dans la Figure 15. Plusieurs expériences, utilisant l'une ou l'autre de cinq préparations de PS1Aa2, ont montré plus d'une conductance.

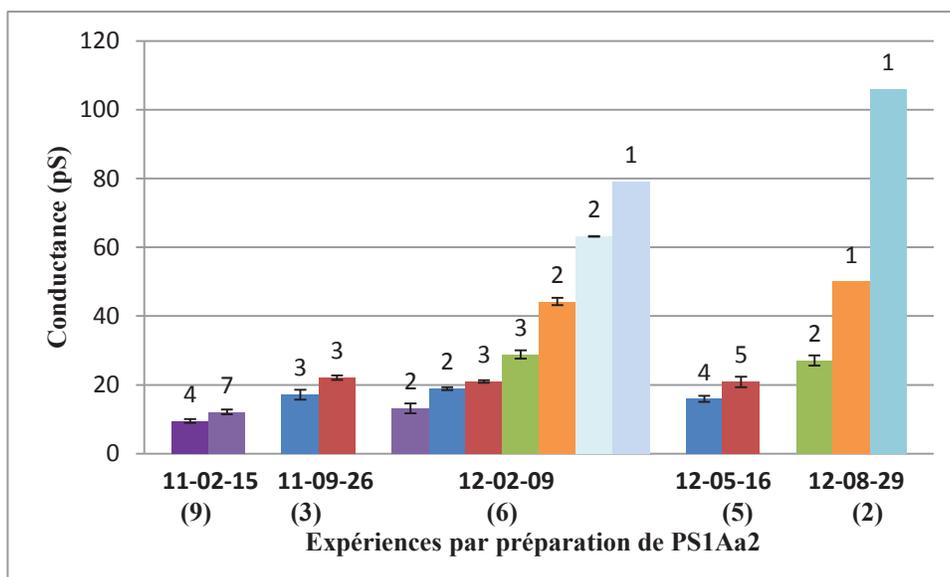


Figure 16. Comparaison des niveaux de conductance observés avec chacune des préparations de toxine utilisées pour les expériences de bicouches lipidiques. Les chiffres en abscisse correspondent aux dates de réception des différentes préparations de toxine et les chiffres entre parenthèses, au nombre total d'expériences réalisées avec chacune des préparations. Le chiffre au-dessus de chaque barre représente le nombre d'expériences au cours desquelles le niveau correspondant de conductance a été observé. Les expériences ont toutes été réalisées en présence de 150 mM de KCl de chaque côté de la membrane.

3.4. Microspectrofluorométrie

3.4.1. Rapport de fluorescence de la sonde

Le rapport de fluorescence du Fura-2 a été mesuré dans les cellules HeLa et HepG2 (Figure 17). Les valeurs maximale et minimale ont été estimées avec et sans Ca^{++} en présence d'ionomycine (Figure 17). Suite à l'ajout d'ionomycine pour perméabiliser la membrane spécifiquement aux ions Ca^{++} , le rapport augmente rapidement à presque 5, et redescend un peu au-dessous de 1 après rinçage du bain avec une solution ne contenant pas de ce cation; ce niveau étant un peu plus faible que celui observé au début de l'expérience.

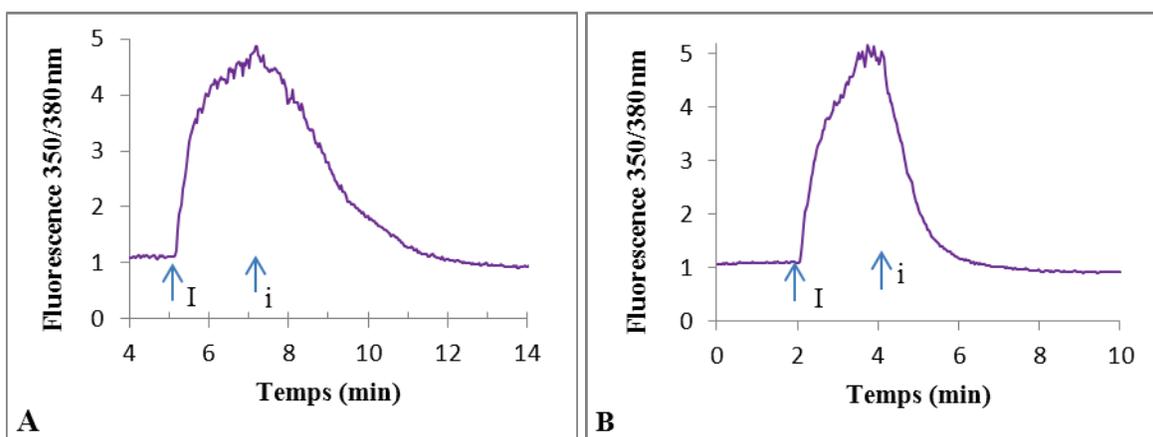


Figure 17. Rapport de fluorescence dans des cellules chargées avec la sonde Fura-2 AM ($5 \mu\text{M}$) en présence de Ca^{++} (1.8 mM). **A.** Cellule HeLa. **B.** Cellule HepG2. Flèche I : ionomycine ($5 \mu\text{M}$) plus Ca^{++} (1.8 mM); Flèche i : ionomycine ($5 \mu\text{M}$) sans Ca^{++} , pH 9.0.

En général, au début des expériences, le niveau de fluorescence était semblable dans les cellules HepG2 et HeLa (Figure 18A). Le rapport de fluorescence (350/380 nm) est légèrement supérieur à 1 pour les cellules HepG2 et légèrement inférieur à 1 pour les cellules HeLa (Figure

18B). Un rapport semblable de fluorescence est observé pour les cellules chargées en présence ou en absence de calcium dans le milieu, ce qui indique que les cellules ont une bonne capacité à réguler leur contenu cytosolique de calcium (Figure 18B).

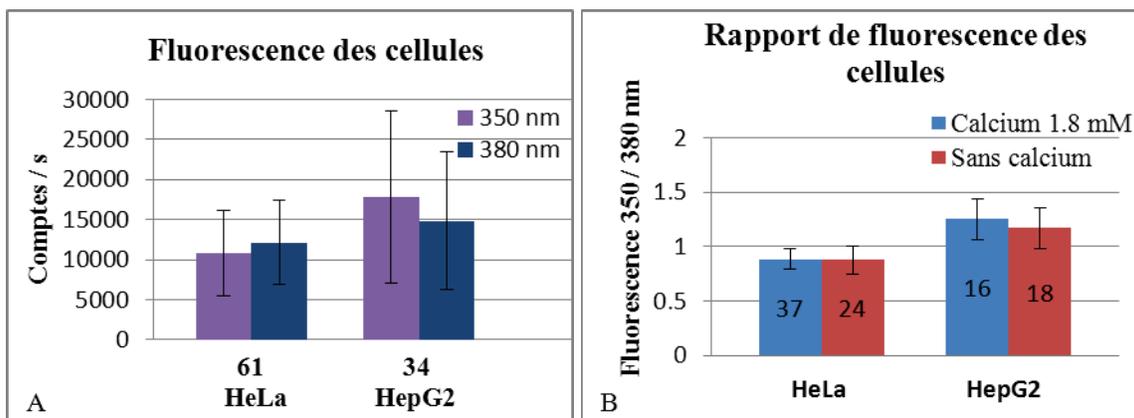


Figure 18. Fluorescence moyenne des cellules et leur rapport de fluorescence 350/380 nm. Les cellules ont été chargées avec le Fura-2 AM, en présence ou en absence de calcium (1.8 mM) dans le bain. **A.** Fluorescence mesurée après rinçage du bain et incubation des cellules pendant 15 min. **B.** Rapport de fluorescence pour les mêmes cellules. Les valeurs portées en graphique correspondent aux moyennes et aux écarts-types. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'expériences réalisées dans chaque condition.

3.4.2. Réponses calciques à la PS1Aa2

Quelques expériences réalisées avec la PS1Aa2 à 0.8 et 1.6 $\mu\text{g/ml}$ et des cellules HeLa et HepG2 ont montré de légères réponses calciques, mais seulement à la dose la plus élevée (Figure 19). Malgré ce résultat positif, la réponse semble faible étant donné que ces concentrations correspondent à 2.6 et 5.3 fois la LC_{50} (dose suffisante pour tuer 50% des cellules) publiée pour les cellules HeLa, et 40 et 80 fois la LC_{50} publiée pour les cellules HepG2 (Jung *et al.*, 2007). Par la suite, la plupart des expériences a donc été réalisée avec une concentration élevée de toxine

(habituellement 10 $\mu\text{g/ml}$) correspondant à 33.3 fois la LC_{50} des cellules HeLa et 500 fois la LC_{50} des cellules HepG2. À cette concentration, l'effet de la toxine s'est avéré plus prononcé et généralement plus facile à détecter (Figure 20).

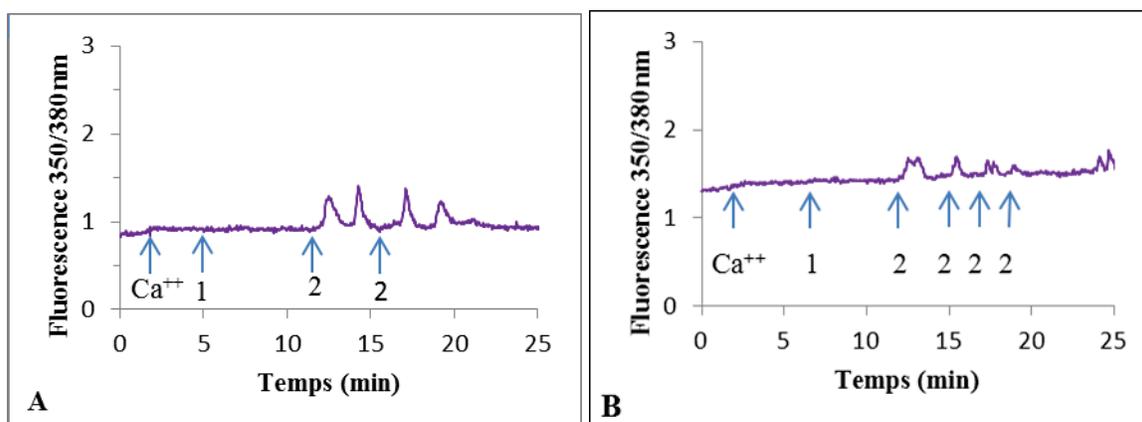


Figure 19. Réponses calciques à la PS1Aa2 **A.** Cellules HeLa; **B.** Cellules HepG2. Le bain a été rincé avec la solution Earles contenant les substances suivantes : Ca⁺⁺: calcium 1.8 mM; 1 : PS1Aa2 0.8 $\mu\text{g/ml}$; 2 : PS1Aa2 1.6 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.2.1. En présence de calcium extracellulaire

En général, les variations du Ca⁺⁺ intracellulaire, enregistrées comme des changements du rapport de fluorescence 350/380 nm, résultent plutôt de diminutions de la fluorescence à 380 nm que d'augmentations de la fluorescence à 350 nm (Figure 20A, C et E). Ceci s'explique facilement par le fait qu'à 350 nm, les mesures sont faites à une longueur d'onde proche du point isobestique (360 nm) où la fluorescence émise est indépendante de la concentration de Ca⁺⁺. Ni le tampon utilisé pour solubiliser la toxine, ni le rinçage du bain avec la solution contenant du calcium, n'ont produit de réponses calciques.

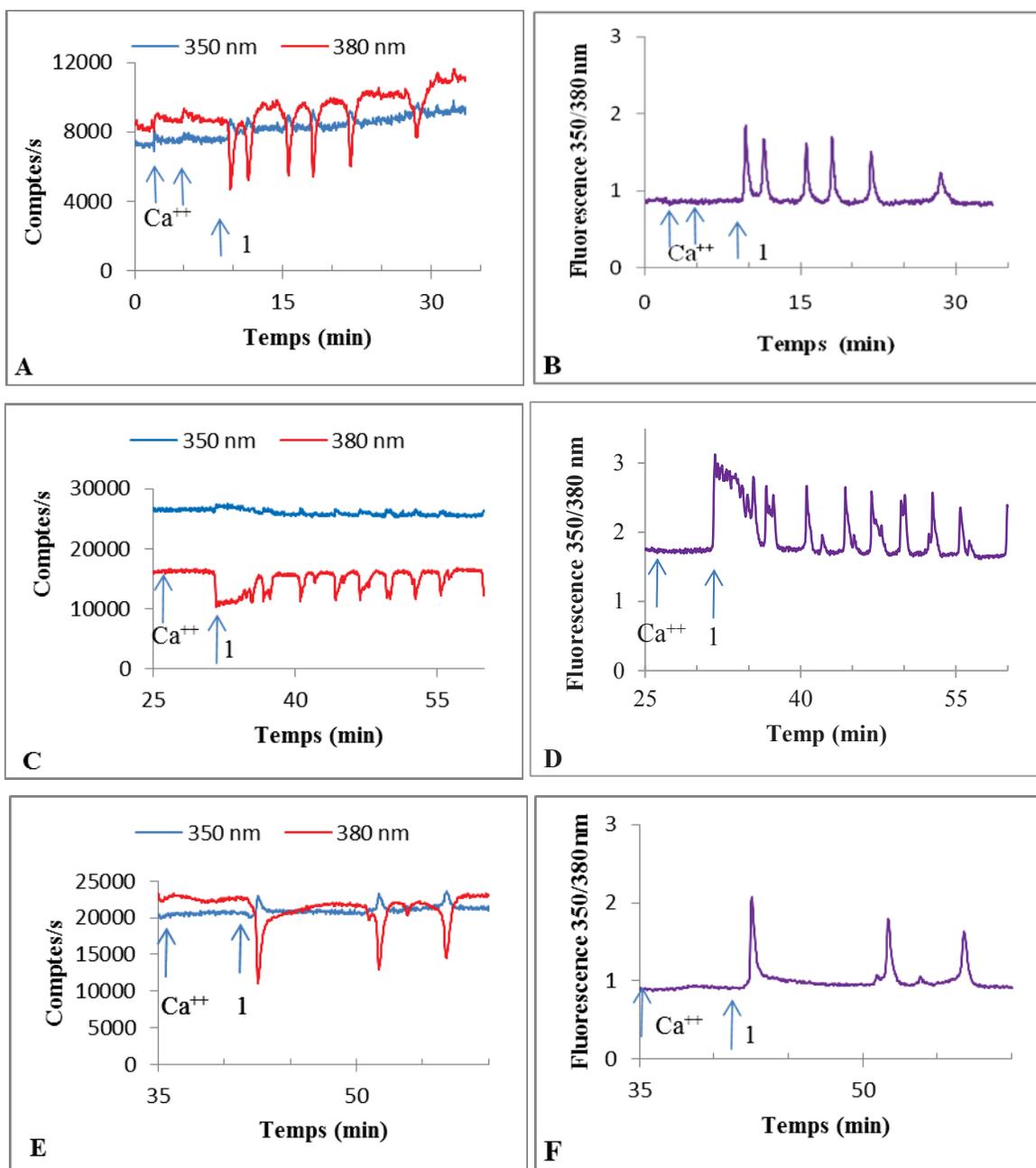


Figure 20. Réponse calcique à l'ajout de la PS1Aa2 en présence de calcium (1.8 mM). **A.** Fluorescence dans une cellule HeLa. **B.** Rapport des fluorescences (350/380 nm) montrées en A. **C.** Fluorescence d'une cellule HepG2. **D.** Rapport des fluorescences montrées en C. **E.** Fluorescence d'une cellule HEK293. **F.** Rapport des fluorescences montrées en E. Ca⁺⁺ : rinçage avec la solution Earles contenant du calcium (1.8 mM); 1 : le milieu a été remplacé par la solution contenant la PS1Aa2 (10 µg/ml) et du calcium (1.8 mM).

Les deux lignées tumorales et la lignée non tumorale examinées ont montré des variations du niveau de calcium intracellulaire en réponse à la toxine. Les variations se sont présentées comme des oscillations (Figure 20) ou comme des augmentations soutenues de la concentration du calcium intracellulaire suivant l'ajout de la toxine (Figure 21). Certaines cellules ont montré une augmentation transitoire suivie d'oscillations du calcium intracellulaire (Figure 20D). Notons que les oscillations se produisent habituellement après une courte période (moins de 2 min) suivant l'ajout de toxine. Elles ne se produisent jamais en absence de toxine, même après plusieurs minutes d'observation (environ 8 min précédant l'ajout de toxine dans les exemples illustrés dans la Figure 20). Par contre, les augmentations soutenues de la concentration du calcium intracellulaire, comme celle illustrée à la Figure 21, ne débutent qu'après une dizaine de minutes suivant l'ajout de toxine.

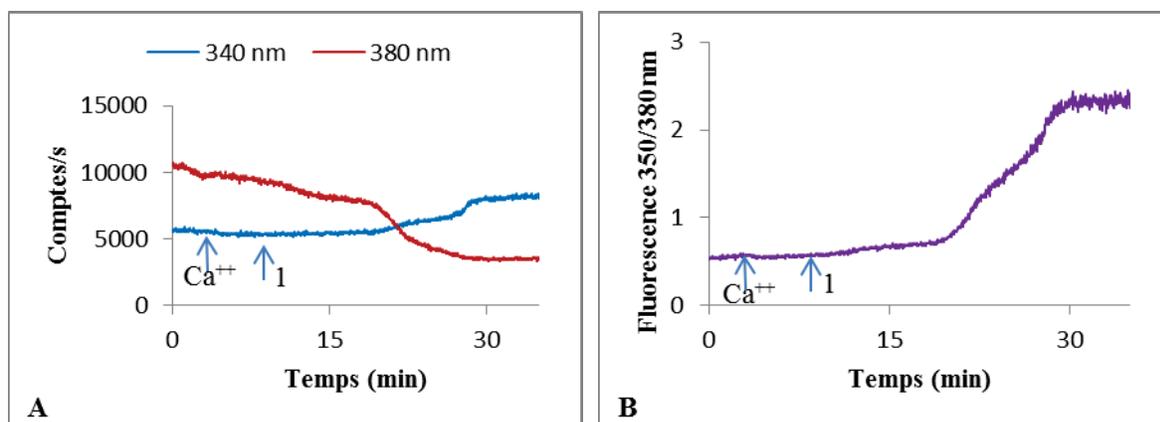


Figure 21. Effet de la toxine en présence de calcium (1.8 mM). **A.** Fluorescence d'une cellule HepG2. **B.** Rapport des fluorescences montrées en A. 1 : ajout de PS1Aa2 (1.6 $\mu\text{g/ml}$). Cette expérience, représentative de trois essais, a été réalisée après la mise à jour de l'appareil.

L'amplitude, la fréquence et la durée des oscillations ont varié d'une expérience à l'autre. Parfois, elles sont rares et de faible amplitude (Figure 22A), alors que d'autres fois, leur fréquence et leur amplitude sont plus élevées (Figure 22B).

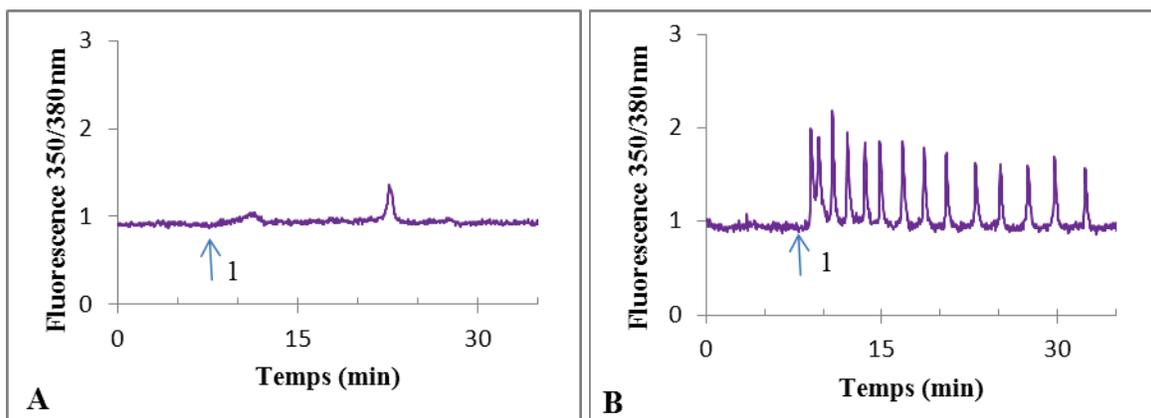


Figure 22. Différentes réponses calciques des cellules HeLa en présence de calcium (1.8 mM). 1 : le milieu a été remplacé par la solution Earles contenant la PS1Aa2 (10 $\mu\text{g/ml}$) et du calcium (1.8 mM).

Des oscillations ont été observées avec les trois lignées cellulaires testées, y compris les cellules non tumorales HEK293 (Figure 20E et F). Dans plusieurs expériences, il n'y a pas eu de réponse des cellules traitées mais, la plupart du temps, elles ont répondu avec des oscillations calciques. Étant donné la variabilité des réponses, un grand nombre d'expériences ont été réalisées avec les deux lignées tumorales et la distribution du nombre d'oscillations calciques observées dans chacune d'entre elles est illustrée dans la Figure 23. Notons cependant que le nombre d'expériences réalisées avec les cellules HeLa est plus élevé qu'avec les cellules HepG2. Tandis que ces dernières ont tendance à se retrouver sous forme d'amas, les cellules HeLa sont plus faciles à trouver isolées sur la lamelle.

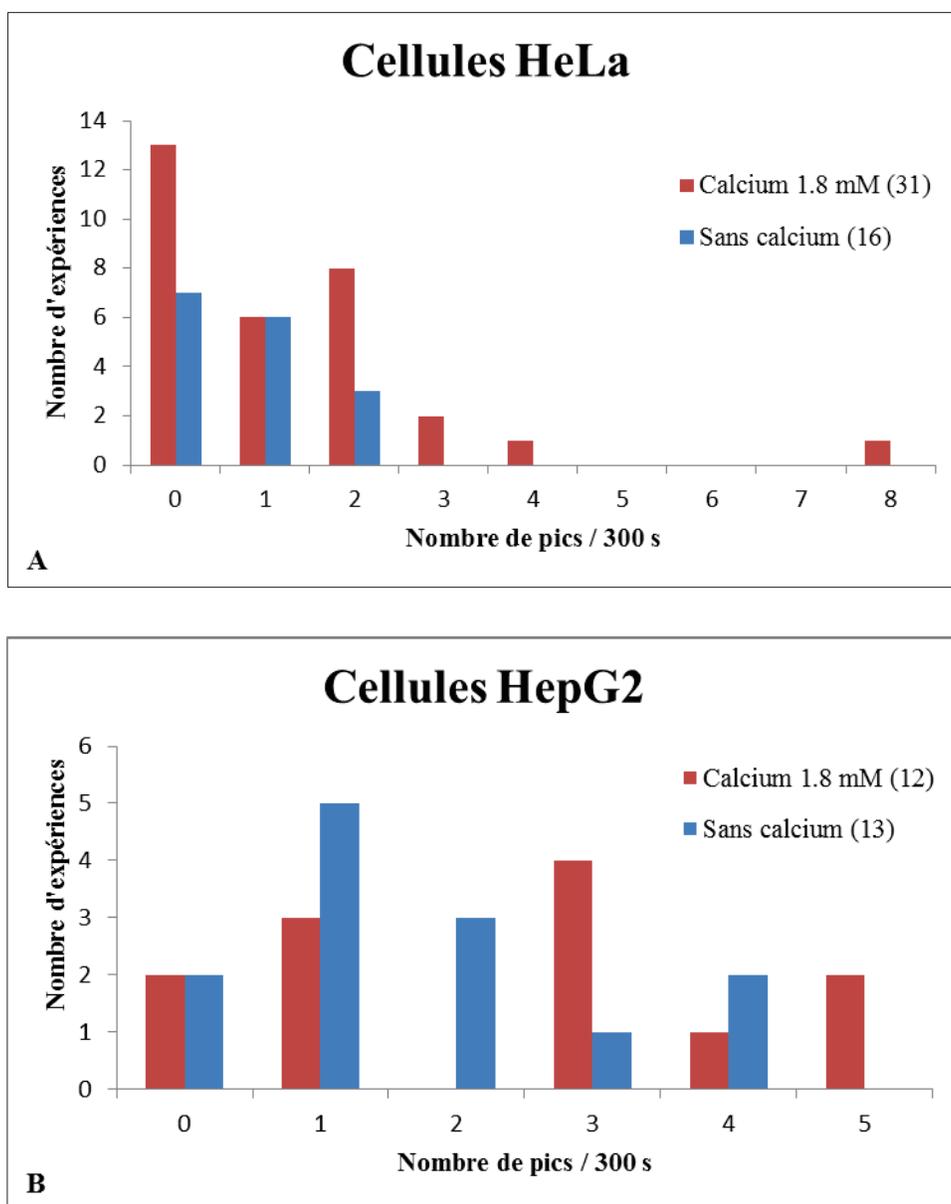


Figure 23. Distribution du nombre d'oscillations calciques observées en réponse à l'ajout de PS1Aa2 dans deux lignées cellulaires en présence ou en absence de calcium. Le nombre total d'expériences analysées dans chaque condition est indiqué entre parenthèses.

3.4.2.2. En absence de calcium extracellulaire

De réponses calciques se sont présentées aussi en absence de calcium extracellulaire. Pour les deux lignées cellulaires tumorales, le nombre d'oscillations observées par unité de

temps suit une distribution relativement semblable lorsqu'elles sont mesurées en présence ou en absence de calcium extracellulaire (Figure 23).

Afin de mieux comprendre les effets de la présence ou de l'absence du calcium sur la réponse à la toxine, des expériences dans les deux conditions ont été faites avec la même cellule (Figure 24). Certaines ont commencé sans calcium et se sont poursuivies après que le milieu eut été remplacé par un milieu contenant du calcium à 1.8 mM. D'autres expériences ont été réalisées en suivant l'ordre inverse. Dans les deux types d'expériences, la toxine a été ajoutée en présence et en absence de calcium extracellulaire, et le nombre d'oscillations suivant l'ajout de toxine a été compté pour chacune des deux conditions. En général, pour chaque cellule, un nombre semblable d'oscillations a été observé en présence et en absence de calcium extracellulaire lorsque celles-ci étaient mesurées d'abord en absence de calcium dans le milieu. Par contre, le nombre d'oscillations observées en absence de calcium extracellulaire était, la plupart du temps, plus faible qu'en présence de calcium dans les cellules qui avaient d'abord été exposés à la PS1Aa2 dans le milieu contenant du calcium (Figure 24).

L'induction d'oscillations calciques par la toxine ne semble donc pas dépendre, de façon importante, de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire. Les cellules semblent cependant consommer au moins une partie de leurs réserves de calcium en produisant ces oscillations, ce qui expliquerait qu'après une série d'oscillations en présence de calcium extracellulaire, leur capacité à induire autant de nouvelles oscillations soit nettement réduite après retrait du calcium du milieu.

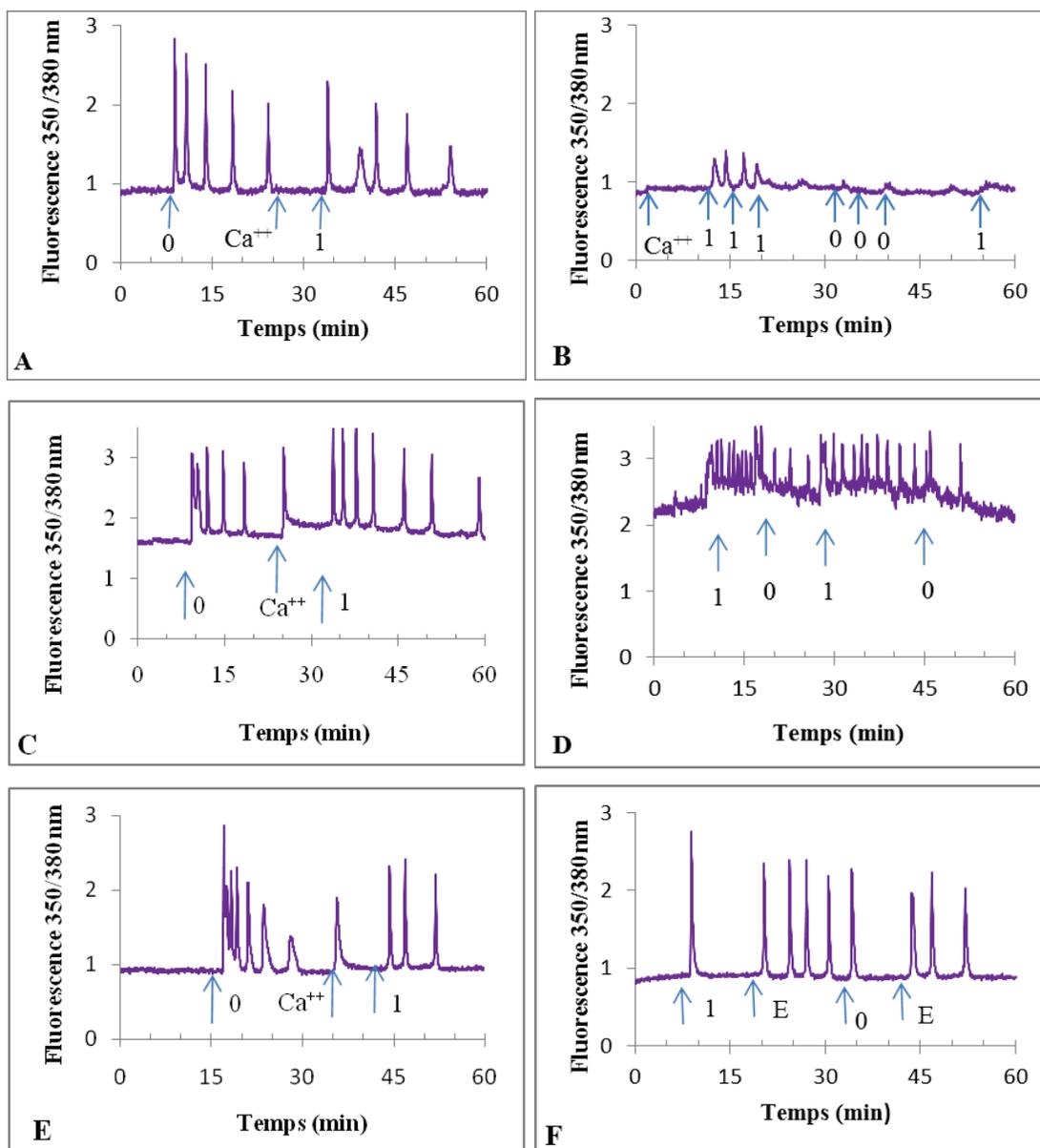


Figure 24. Réponses calciques des cellules à la PS1Aa2. **A et B.** Cellules HeLa. **C et D.** Cellules HepG2. **E et F.** Cellules HEK293. **A, C et E.** La toxine a d'abord été ajoutée en absence de calcium extracellulaire, puis, une seconde fois, après que le milieu eut été remplacé par un milieu contenant du calcium à 1.8 mM. **B, D et F.** La toxine a d'abord été ajoutée en présence de calcium extracellulaire à 1.8 mM, puis, une seconde fois, après que le milieu eut été remplacé par un milieu ne contenant pas de calcium. 0 : PS1Aa2 (10 μ g/ml) en absence de calcium; 1 : PS1Aa2 (10 μ g/ml) en présence de calcium (1.8 mM); Ca⁺⁺ : milieu contenant du calcium 1.8 mM; E : milieu sans Ca⁺⁺ contenant 10 mM d'EGTA. Chaque panneau est représentatif de trois à six expériences indépendantes.

Parfois, en réponse à la toxine, le niveau de calcium augmente pour un certain temps, puis revient plus ou moins rapidement à sa concentration cytosolique initiale (Figure 25). Cette augmentation transitoire est habituellement plus prononcée dans les cellules HepG2 (Figure 25C et D) que dans les cellules HeLa (Figure 25A et B). Elle a cependant été observée en présence (Figure 25A, B et C) et en absence (Figure 25D) de calcium extracellulaire.

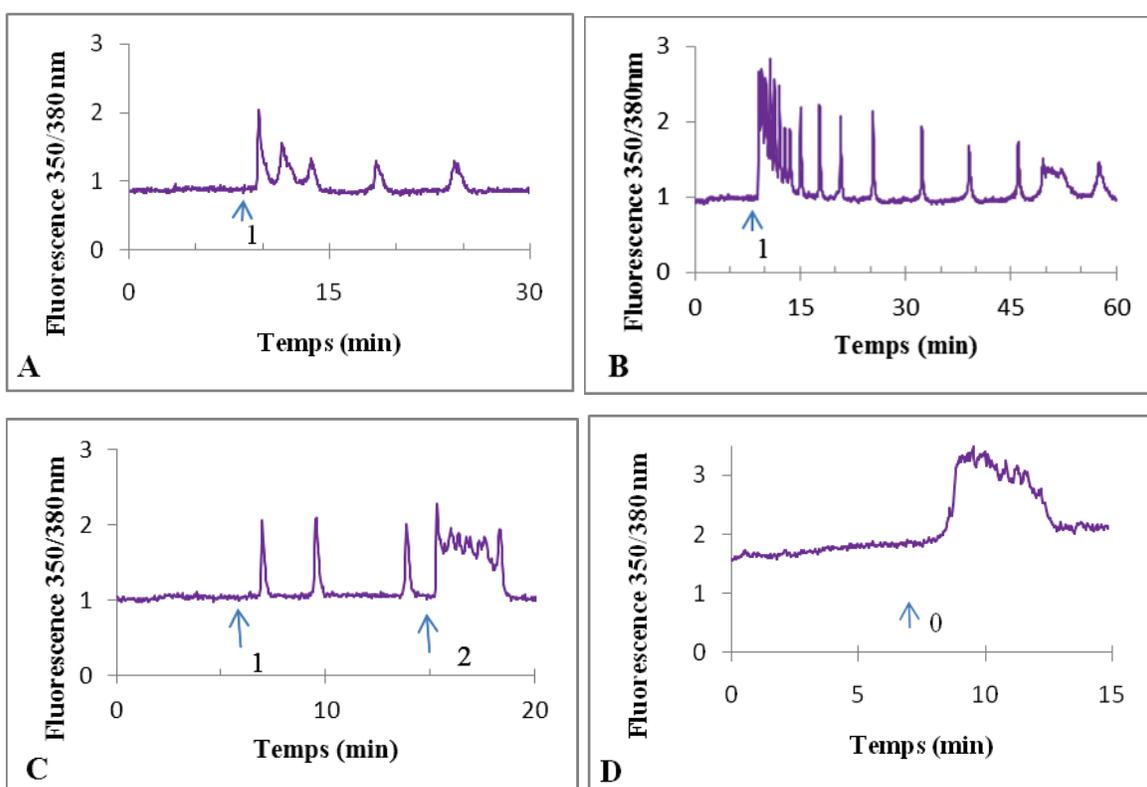


Figure 25. Réponses calciques des cellules tumorales à la PS1Aa2. **A et B.** Cellules HeLa en présence de calcium. **C et D.** Cellules HepG2. **C.** En présence de calcium. 1 : PS1Aa2 (0.4 $\mu\text{g/ml}$); 2 : PS1Aa2 (8 $\mu\text{g/ml}$). **D.** En absence de calcium. 0 : PS1Aa2 (10 $\mu\text{g/ml}$).

3.4.3. Réponse calcique à la PS1Aa1

La PS1Aa1 (Mizuki *et al.*, 2000), comme la PS1Aa2, a produit une réponse sous forme d'oscillations calciques dans les cellules HepG2, tant en présence (Figure 26A) qu'en absence (Figure 26B) de calcium.

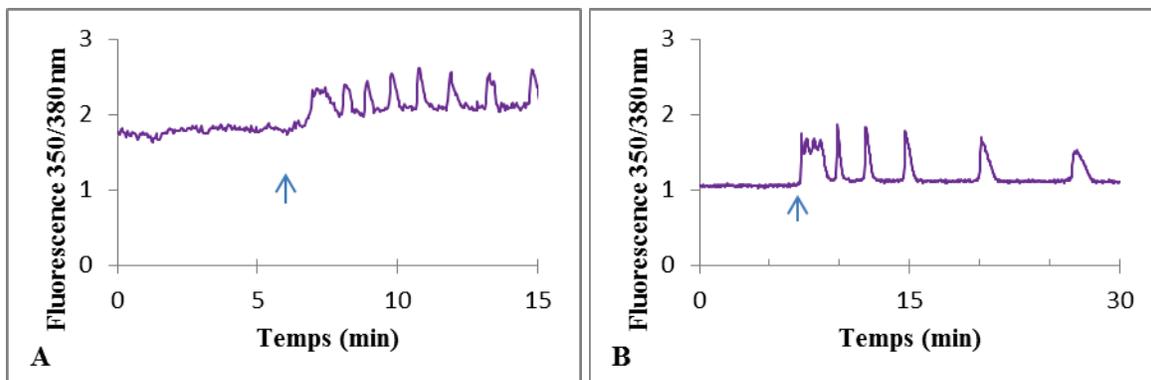


Figure 26. Réponse calcique des cellules HepG2 à la PS1Aa1. **A.** En présence de calcium. **B.** En absence de calcium. Flèches : PS1Aa1 (10 $\mu\text{g/ml}$). Chaque panneau est représentatif de trois expériences indépendantes.

3.4.4. Modulation des réponses calciques

Les oscillations calciques n'ont pas été observées avec de la toxine quand le bain contenait du lanthane. Elles sont cependant apparues après que le bain eut été rincé avec une solution ne contenant pas de cet ion (Figure 27).

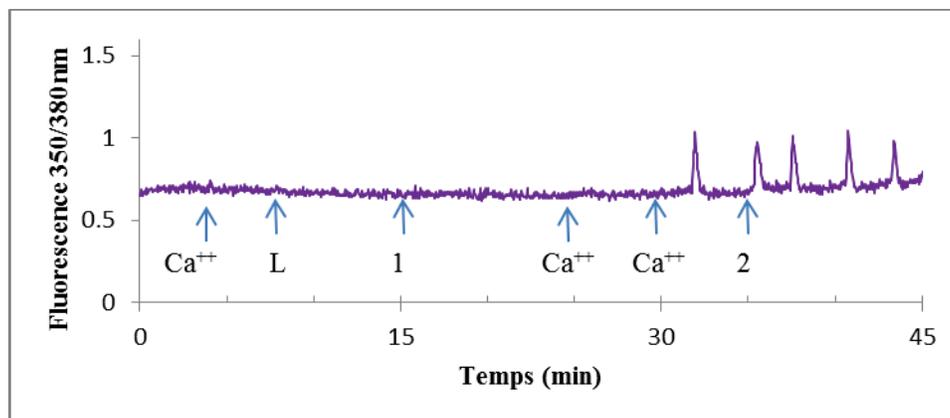


Figure 27. Effet du lanthane sur l'activité de la PS1Aa2 dans une cellule HepG2. Ca^{++} : calcium 1.8 mM; L : LaCl_3 5 mM; 1 : LaCl_3 5 mM + PS1Aa2 (1.6 $\mu\text{g/ml}$); 2 : PS1Aa2 (1.6 $\mu\text{g/ml}$). Cette expérience, représentative de trois essais, a été réalisée après la mise à jour de l'appareil.

3.5. Viabilité cellulaire

Étant donné que les effets de la PS1Aa2 sur la morphologie et le calcium intracellulaire des cellules sensibles n'ont été observés qu'à des concentrations relativement élevées de toxine, des études de viabilité cellulaire plus détaillées ont été entreprises. La viabilité des cellules a donc été évaluée par leur capacité à exclure le bleu de trypan et par des mesures de fluorescence avec l'homodimère d'éthidium, une sonde spécifique pour l'ADN qui permet de mettre en évidence la lyse cellulaire.

3.5.1. Bleu de trypan

La viabilité de cellules HepG2 a été évaluée avec le bleu de trypan. La proportion de cellules mortes (colorées) n'a pas changé dans les puits contenant 1 $\mu\text{g/ml}$ de PS1Aa2, une concentration qui est pourtant 50 fois plus élevée que la dose létale publiée (0.02 $\mu\text{g/ml}$) (Jung *et al.*, 2007). Par contre, la plupart des cellules traitées à 5 $\mu\text{g/ml}$ de toxine, une dose 250 fois plus élevée que la dose létale, sont mortes (Figure 28).

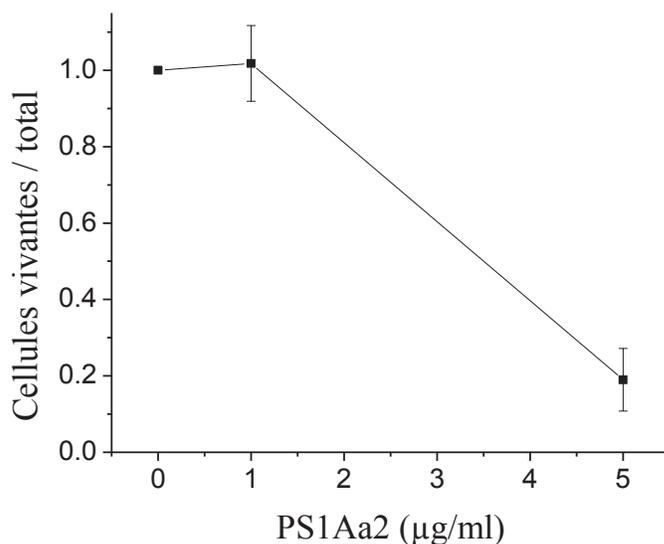


Figure 28. Effet de la PS1Aa2 sur la viabilité des cellules HepG2 estimée avec le bleu de trypan. Pour chaque concentration de toxine, les cellules ont été comptées dans un hémacytomètre. La proportion de cellules vivantes est indiquée par le nombre de cellules colorées divisé par le nombre total de cellules dans l'échantillon non traité. Les données représentent la moyenne et l'écart-type de quatre mesures.

3.5.2. Homodimère-1 d'éthidium

Devant ce résultat, et considérant le fait que les expériences réalisées avec le bleu de trypan utilisent des cellules qui doivent, au préalable, avoir été décollées de la surface sur laquelle elles se développent avec un traitement à la trypsine qui pourrait les endommager, la décision a été prise d'utiliser une autre sonde de toxicité. La viabilité des cellules a donc été étudiée en mesurant la fluorescence de l'homodimère-1 d'éthidium, une sonde qui détecte l'ADN libéré par les cellules endommagées. Cette sonde a déjà été utilisée, avec grand succès, dans notre laboratoire pour des études détaillées des effets de la Cry1C, une toxine insecticide du bacille de Thuringe, sur la viabilité des cellules Sf9 dérivées du légionnaire d'automne *Spodoptera frugiperda* (Monette *et al.*, 1997).

Des cellules HeLa, HepG2 et HEK 293 ont d'abord été exposées à 40 µg/ml de PS1Aa2 (Figure 29). Cependant, pour les trois lignées cellulaires testées, la fluorescence n'a pas changé en fonction du temps comme on aurait pu s'y attendre si la toxine avait endommagé les cellules. La fluorescence des cellules non traitées était moins élevée que celle des cellules traitées avec la toxine, mais elle est également restée à un niveau constant pendant toute l'expérience.

La fluorescence des cellules HeLa n'a pas augmenté non plus lorsqu'elles ont été exposées à 25 µg/ml de PS1Aa1, qui est pourtant 2.5 fois plus toxique que la PS1Aa2, pour cette lignée cellulaire (Jung *et al.*, 2007) (Figure 30). Comme la PS1Aa2, la PS1Aa1 semble donc beaucoup moins active qu'attendu, la concentration de toxine utilisée dans cette expérience correspondant à 208.3 fois sa LC_{50} publiée (Katayama *et al.*, 2005). On note toutefois que le niveau de fluorescence est environ 4 fois plus élevé en présence de PS1Aa2 (Figure 29) qu'en présence de PS1Aa1 (Figure 30).

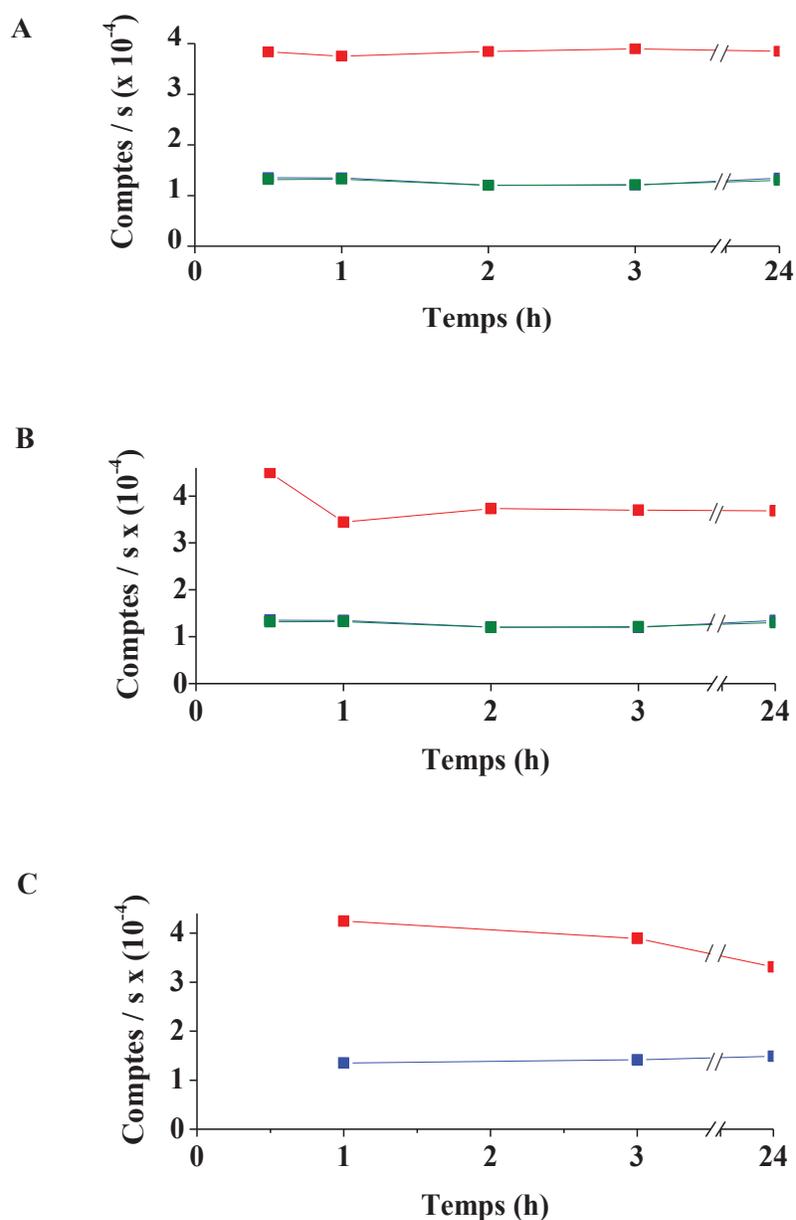


Figure 29. Fluorescence de l'homodimère d'éthidium en présence de trois lignées cellulaires. Chaque puits contenait 20×10^3 cellules HeLa (A), HepG2 (B) ou HEK 293 (C) ainsi que $40 \mu\text{g/ml}$ de PS1Aa2 (en rouge), ou un volume équivalent de tampon carbonate (en vert) ou de milieu de culture (en bleu). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

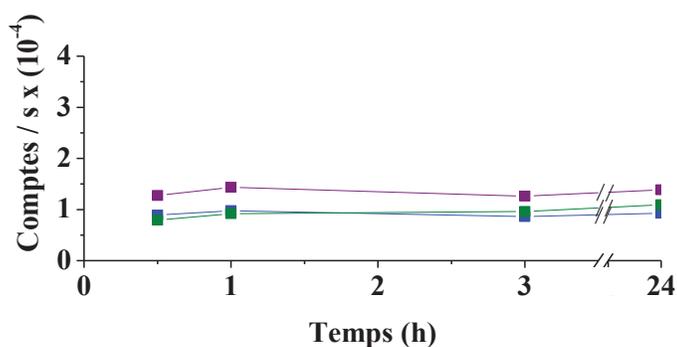


Figure 30. Fluorescence de l'homodimère d'éthidium en présence de cellules HeLa. Chaque puits contenait 20×10^3 cellules ainsi que $25 \mu\text{g/ml}$ de PS1Aa1 (en mauve), ou un volume équivalent de tampon carbonate (en vert) ou de milieu de culture (en bleu).

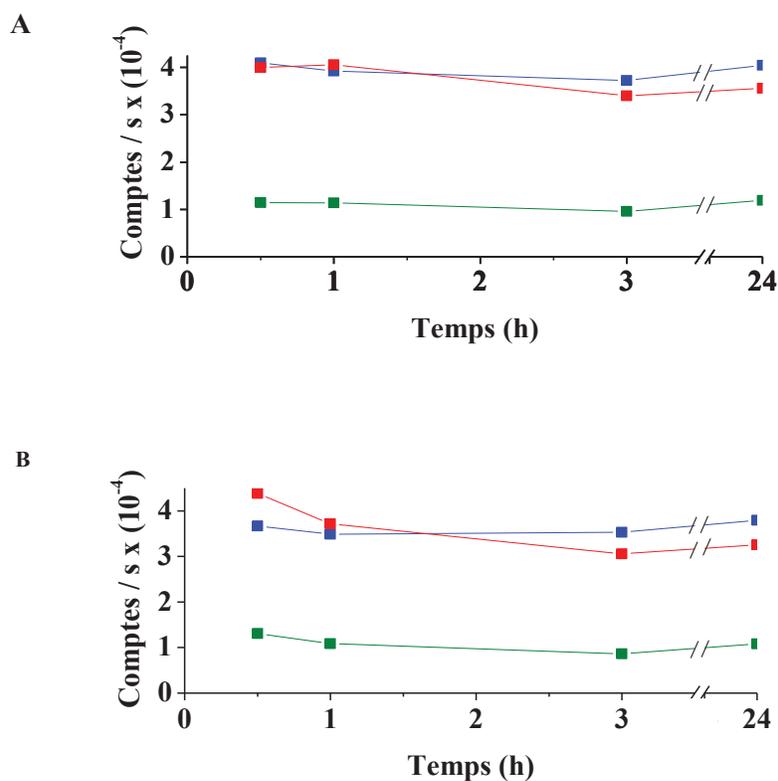


Figure 31. Fluorescence de l'homodimère d'éthidium en présence ou en absence de cellules HeLa (A) ou HepG2 (B). Chaque puits contenait 20×10^3 cellules et $33.5 \mu\text{g/ml}$ de PS1Aa1 (en rouge) ou un volume équivalent de tampon carbonate (en vert), ou la même quantité de toxine, mais sans cellules (en bleu). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Dans le but de mieux comprendre l'absence de changements dans les niveaux de fluorescence mesurés en présence de toxine, des expériences semblables aux précédentes ont été réalisées avec et sans cellules (Figure 31). Le même niveau de fluorescence est observé en présence de toxine, indépendamment de la présence ou de l'absence de cellules HeLa ou HepG2, ce qui suggère fortement que l'ADN détecté par la sonde provient de la préparation de toxine plutôt que des cellules.

La fluorescence a donc été mesurée en fonction de la concentration de PS1Aa1 et de PS1Aa2, mais en absence de cellules (Figure 32). Alors que la fluorescence ne varie pas en présence de la Cyt1Aa, elle augmente avec la concentration des deux parasporines, mais beaucoup plus rapidement pour la PS1Aa2. Ce résultat suggère, en accord avec ceux des Figures 29-31, que la préparation de PS1Aa2 contient nettement plus d'ADN que celle de PS1Aa1.

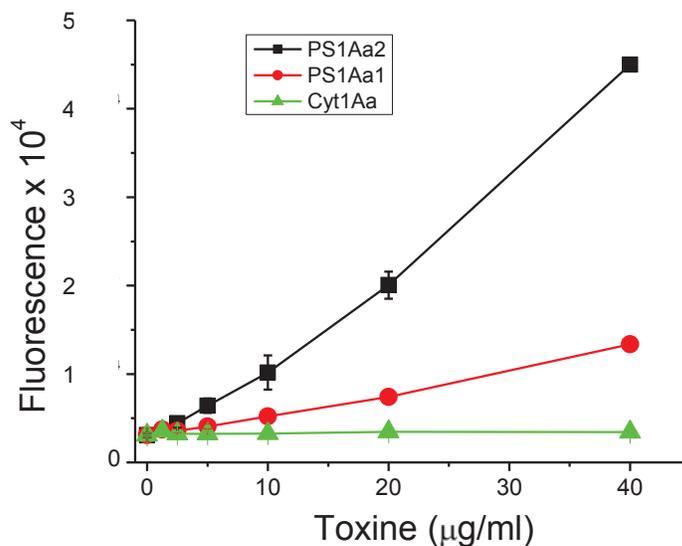


Figure 32. Fluorescence mesurée en présence de PS1Aa1, PS1Aa2, Cyt1Aa et d'homodimère d'éthidium en absence de cellules. Les données représentent la moyenne et l'écart-type de trois mesures.

Afin de vérifier la présence d'ADN dans la préparation PS1Aa2, son spectre d'absorbance a été mesuré dans l'ultraviolet. Malheureusement, le tampon carbonate dans lequel la toxine a été préparée absorbe très fortement dans cette région avec un pic à 260 nm qui atteint plusieurs unités d'absorbance (Figure 33). L'utilisation de ce tampon comme blanc implique donc une correction qui correspond à une soustraction de la presque totalité de la quantité de lumière utilisée pour éclairer l'échantillon, ce qui rend douteux les estimés de la quantité d'ADN obtenus avec cette méthode. Les estimés obtenus avec l'homodimère d'éthidium sont donc nettement plus fiables.

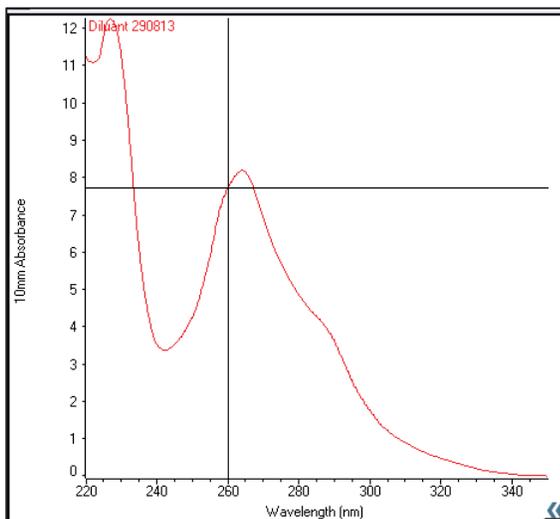


Figure 33. Spectre d'absorbance du tampon carbonate utilisé pour les préparations de PS1Aa1 et PS1Aa2.

Pour essayer de mieux comprendre pourquoi les toxines semblent beaucoup moins actives qu'attendu sur la base des données publiées (Jung *et al.*, 2007), les échantillons de PS1Aa1 et de PS1Aa2 traités avec l'homodimère d'éthidium en absence de cellules ont été observés au microscope à fluorescence (Figure 34). Dans les deux cas, on discerne nettement la présence d'amas colorés, ce qui suggère que l'ADN forme un complexe insoluble avec la

protéine. La préparation de PS1Aa2 présente un nombre beaucoup plus élevé de ces amas fluorescents que celle de la PS1Aa1, en accord avec le fait qu'elle contienne beaucoup plus d'ADN (Figures 29-32).

La présence d'amas insolubles dans les échantillons de toxines se vérifie par l'observation microscopique des différentes préparations dans un hémacytomètre (Figure 35). Le quadrillage de cet appareil permet de faciliter la mise au point pour les échantillons ne contenant pas ou peu de particules visibles. En accord avec les données de fluorescence (Figure 34), le nombre de particules observées dans le cas de la PS1Aa2 est beaucoup plus élevé que dans celui de la PS1Aa1. De plus, les échantillons de Cyt1Aa ou de tampon sans toxine ne présentent que peu de particules. Un certain nombre d'entre elles pourrait d'ailleurs correspondre à des poussières dans l'échantillon ou à des égratignures sur la lamelle de l'hémacytomètre ou ailleurs dans le montage.

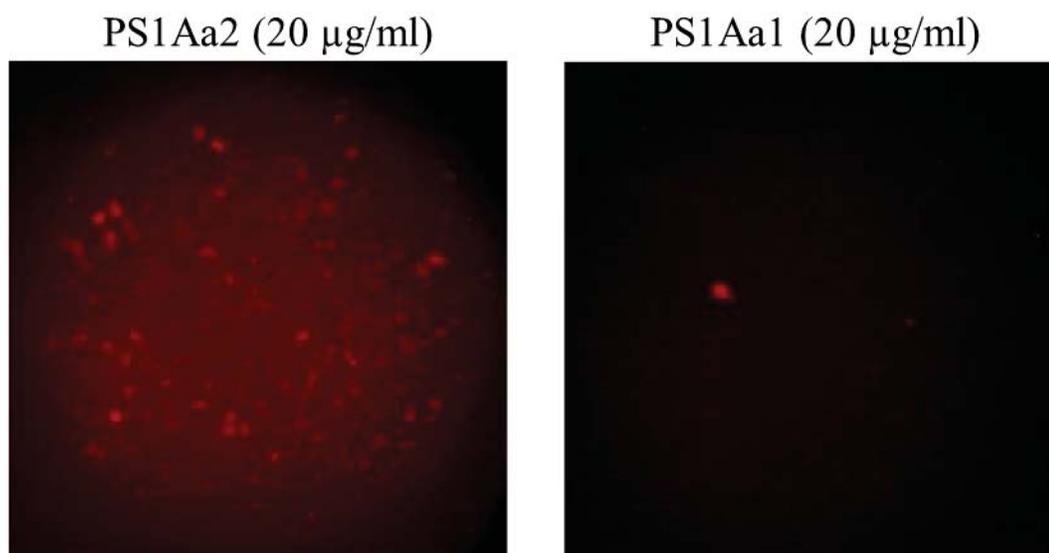


Figure 34. Observation de suspensions de la PS1Aa2 et PS1Aa1 (20 µg/ml) par microscopie de fluorescence (400 X) en présence d'homodimère d'éthidium (6 µM), mais sans cellules. Ces résultats sont représentatifs de six expériences indépendantes pour la PS1Aa2 et de trois, pour la PS1Aa1.

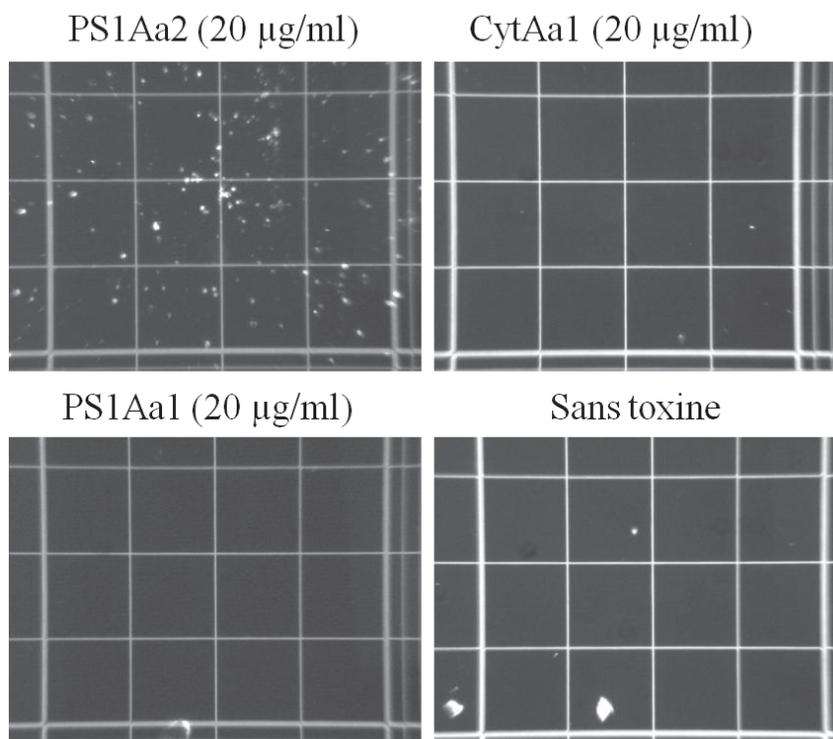


Figure 35. Observation au microscope (400 X) des toxines dans un hemacytomètre.

Dans le but d'évaluer la possibilité d'enlever l'ADN des préparations de toxine, une expérience préliminaire a été réalisée dans laquelle la PS1Aa2 a été incubée avec du suc intestinal provenant de l'intestin moyen du lépidoptère *M. sexta*. Cette source de DNase offre l'avantage d'être active au pH relativement élevé (8.0) du tampon dans lequel la toxine est préparée (Schernthaner *et al.*, 2002). Parce que ce tampon contient aussi de l'EDTA, un inhibiteur de DNase, le mélange réactionnel a été additionné de $MgCl_2$. La fluorescence mesurée avec l'homodimère d'éthidium a diminué progressivement, mais au bout de 24 heures, elle était encore à environ un tiers de son niveau de départ (Figure 36). De plus, les échantillons ainsi traités montraient encore des amas insolubles visibles en microscopie de fluorescence.

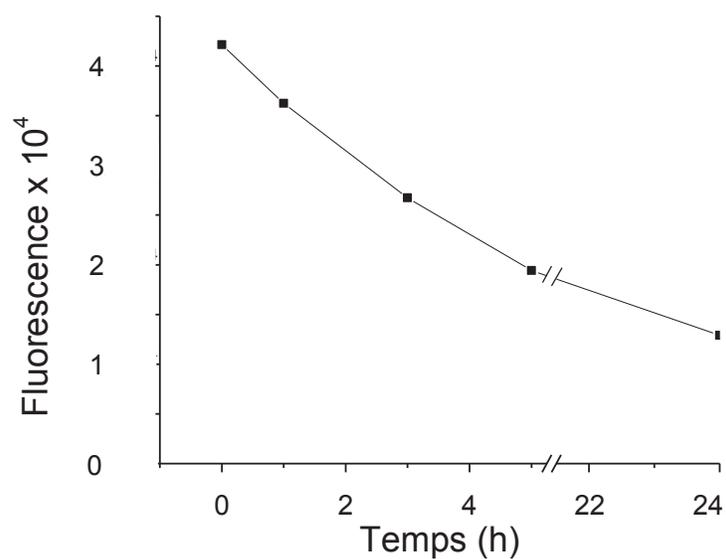


Figure 36. Effet du suc intestinal sur le contenu en ADN d'une préparation de PS1Aa2. Un échantillon de toxine a été incubé à 27°C en présence de 7.3 mM de MgCl₂ et 4.3% (v/v) de suc intestinal provenant de l'intestin moyen de larves de *M. sexta*. Aux temps indiqués, la fluorescence a été mesurée avec l'homodimère d'éthidium.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Bien que le bacille de Thuringe soit reconnu, depuis plus d'un siècle, comme un pathogène de certains insectes et que le mécanisme d'action de ses toxines insecticides ait fait l'objet de très nombreux travaux aux cours des dernières décennies (Schnepf *et al.*, 1998; Vachon *et al.*, 2002), sa capacité à produire des parasporines n'a été découverte que plus récemment (Mizuki *et al.*, 1999; Ohba *et al.*, 2009). Jusqu'à présent, la plupart des études fonctionnelles portant sur ces toxines anti-tumorales se sont bornées à mesurer leurs effets sur la viabilité de certaines lignées cellulaires. C'est ainsi que la PS1Aa1 (Katayama *et al.*, 2005) et la PS1Aa2 (Jung *et al.*, 2007) ont été testées respectivement dans 15 et 16 lignées cellulaires distinctes. Elles se sont avérées très actives, en particulier, sur les cellules HeLa et HepG2 retenues pour le présent travail. Par contre, le mode d'action des parasporines au niveau cellulaire n'a été examiné de façon détaillée que dans quelques travaux (Kitada *et al.*, 2006, 2009; Katayama *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2008; Okumura *et al.*, 2011).

4.1. Formation de canaux ioniques

La présente étude montre clairement que la PS1Aa2 peut former des pores dans des bicouches lipidiques planes (Section 3.3). Bien que la formation de canaux ioniques, dans ce type de membranes artificielles, ait été démontrée pour une variété de toxines Cry insecticides (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; English *et al.*, 1994; Grochulski *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 2004; Puntheeranurak *et al.*, 2004; Vachon *et al.*, 2012) et une toxine nématocide (Kao *et al.*, 2011; Karabrahimi 2013), aucune publication n'a jusqu'à présent décrit une telle capacité pour une parasporine. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont

cependant démontré que la PS2Aa1 produit des canaux ioniques détectables dans des expériences de bicouches lipidiques et de patch-clamp (Akira Ohgushi, Sakaé Kitada, Marc Juteau et Jean-Louis Schwartz, communications personnelles).

Dans les bicouches lipidiques, plusieurs niveaux de conductance, s'échelonnant entre 10 et 138 pS, ont été observés en présence de PS1Aa2. Bien que la plupart des travaux de bicouches lipidiques réalisés avec des toxines Cry fassent mention de plusieurs niveaux de conductance, seulement quelques-uns se sont attardés à faire l'analyse détaillée de chacun d'entre eux (Racapé 1997; Peyronnet *et al.*, 2001, 2002). Comme il a été mentionné auparavant (Section 1.6.2.1), la présence de plusieurs niveaux de conductance semble résulter, au moins pour la Cry1C, de l'ouverture simultanée d'un nombre variable de pores ayant tous un diamètre similaire, plutôt que de la formation d'une variété de pores de tailles différentes (Peyronnet *et al.*, 2002). Les pores individuels formés par la PS1Aa2, pour laquelle la plus petite conductance mesurée était de 10 pS en présence de 150 ou de 450 mM de KCl (Section 3.3), sont donc comparables à ceux qu'a formés la Cry1C en présence de 300 mM de KCl dans les expériences de Racapé (16 pS) et de Peyronnet *et al.* (2002) (21 pS). Selon cette dernière analyse, ces pores ont un rayon de 1.0 à 1.3 nm et sont assez grands pour permettre la diffusion de molécules comme le sucrose ou le raffinose, en accord avec des études de gonflement osmotique réalisées avec la Cry1C (Villalon *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2001). Il se pourrait cependant que les canaux unitaires formés par la PS1Aa2 soient quand même plus petits puisque, en présence de 450 mM de KCl, on aurait pu s'attendre à ce que les conductances soient plus élevées qu'aux concentrations plus faibles d'électrolytes. En effet, si la toxine forme des pores aqueux, comme on le suppose généralement, la conductance de ceux-ci devrait dépendre de la conductivité de la solution dans laquelle ils sont formés. Le fait

que la plus petite conductance observée soit la même en présence de 150 et 450 mM de KCl suggère donc que le niveau correspondant à la conductance unitaire des pores pourrait être plus petit que ce qu'il a été possible de distinguer clairement du bruit de fond dans les conditions expérimentales utilisées.

Quelle que soit la taille des pores formés par la PS1Aa2, le fait qu'ils aient été détectés, et ce à maintes reprises, contredit la conclusion de Katayama *et al.* (2007) selon laquelle la PS1Aa1, malgré sa proche parenté avec la PS1Aa2, ne forme pas de pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. Les expériences sur lesquelles ces auteurs fondent leur conclusion sont principalement des mesures de fuite de lactate déshydrogénase et d'influx d'iodure de propidium (Katayama *et al.*, 2007). La lactate déshydrogénase est une enzyme cytosolique dont la structure atomique, un tétramère de 140 kDa, est bien connue (Rawn 1989). Bien que l'activité enzymatique de cette grosse molécule, une fois libérée dans le milieu extracellulaire, constitue un excellent, et fréquemment utilisé, marqueur de lyse cellulaire, il est pour le moins douteux qu'elle puisse diffuser au travers des pores formés par une toxine Cry. D'autre part, l'iodure de propidium est un marqueur d'acide nucléique dont la fluorescence augmente grandement lorsque les cellules sont endommagées. Il est également douteux que cette molécule aromatique de 668 Da puisse traverser aisément les pores aqueux formés par la toxine. En effet, plusieurs toxines Cry perméabilisent la membrane pour le raffinose, un trisaccharide de 502 Da, mais celui-ci, même s'il s'agit d'une molécule très hydrophile, ne diffuse qu'assez lentement au travers des membranes, ce qui indique que sa taille s'approche de celle des pores (Carroll et Ellar 1993, 1997; Coux *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2001). Les expériences de Katayama *et al.* (2007) qui montrent que, dans les conditions

utilisées, la toxine n'entraîne pas de lyse cellulaire importante, sont loin de démontrer cependant que la toxine n'a pas la capacité de former des pores dans la membrane plasmique des cellules sensibles.

4.2. Réponses calciques à la toxine

La présente étude a mis en évidence l'induction par la PS1Aa2 d'oscillations rapides dans les niveaux cytosoliques de Ca^{++} (Section 3.4). De telles oscillations calciques ne semblent pas avoir été observées auparavant avec des toxines Cry. Les mesures de Ca^{++} intracellulaire dans les cellules Sf9 d'insectes en présence de Cry1C ont plutôt révélé des augmentations soutenues (Schwartz *et al.*, 1991) ou transitoires (Monette *et al.*, 1997) dans les niveaux cytosoliques de calcium. Une étude plus détaillée a, par la suite, montré que l'augmentation du niveau de calcium dans les cellules Cfl d'insectes, en présence de Cry1Ac, provenait en partie d'un influx de calcium au travers des pores formés par la toxine dans la membrane plasmique des cellules, mais également de la libération d'ions calciques à partir des réserves intracellulaires (Potvin *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les travaux de Katayama *et al.* (2007) n'ont montré que des augmentations soutenues des niveaux cytosoliques de calcium dans les cellules HeLa exposées à des doses toxiques de PS1Aa1. Il faut cependant noter que les techniques utilisées dans la présente étude et celle de Katayama *et al.* (2007) diffèrent passablement, même si les deux sont fondées sur des mesures de fluorescence émise par la sonde Fura-2, sensible aux concentrations de Ca^{++} . Tandis que les expériences décrites dans ce mémoire ont été réalisées avec un système de microspectrofluorométrie, les travaux du groupe japonais ont mesuré la fluorescence dans un

lecteur de plaques multipuits. La fluorescence détectée dans le présent travail était donc émise par des cellules isolées, ou par un groupe de quelques cellules montées sur une lamelle déposée dans une chambre sur la platine d'un microscope, tandis que celle qui était mesurée dans les travaux de Katayama *et al.* (2007) provenait d'une population de cellules cultivées dans le fond d'un puits de plaque multipuits. De plus, les résultats présentés dans ce mémoire sont constitués de mesures faites à chaque seconde, tandis que la fréquence d'échantillonnage des expériences présentées par Katayama *et al.* (2007) n'était que d'une mesure à toutes les 30 secondes. Il est donc tout à fait probable que la détection des oscillations calciques ait été facilitée, dans le présent travail, par le fait que l'appareil utilisé permettait une meilleure résolution dans l'espace et dans le temps. En accord avec cette possibilité, la capacité de la PS1Aa1 d'induire des oscillations calciques, au moins dans les cellules HepG2, a été mise en évidence au cours du présent travail (Figure 25).

Bien que la découverte des oscillations calciques induites par la PS1Aa1 et la PS1Aa2 soit nouvelle dans le domaine des toxines Cry, un tel effet a néanmoins été bien documenté pour plusieurs toxines bactériennes formeuses de pores dont l' α -hémolysine (Uhlén *et al.*, 2000; Laestadius *et al.*, 2002; Söderblom *et al.*, 2002; Koschinski *et al.*, 2006) et la cytolysine A (Söderblom *et al.*, 2005) de *E. coli*, la lystériolysine O de *Listeria monocytogenes* (Repp *et al.*, 2002), et la cytotoxine VacA de *Helicobacter pylori* (de Bernard *et al.*, 2005). Dans chacun de ces cas, les oscillations calciques semblent jouer un rôle important dans le déclenchement de l'inflammation tissulaire en réponse à la toxine. Elles participent donc aux mécanismes de défense de l'organisme contre l'agression de l'agent pathogène. Un rôle protecteur des oscillations calciques en réponse à la PS1Aa2 est d'ailleurs suggéré par le fait

qu'elles sont induites non seulement dans les cellules sensibles HeLa et HepG2, mais également dans les cellules HEK 293 (Figure 19) qui ne semblent pas être endommagées par la toxine (Figure 8).

Au moins dans le cas de l' α -hémolysine, la réponse calcique observée dépend de la concentration de toxine à laquelle les cellules sont exposées (Uhlén *et al.*, 2000; Laestadius *et al.*, 2002). À des concentrations sublétales, cette toxine induit des oscillations calciques, mais à doses plus élevées, on observe plutôt des augmentations soutenues dans les niveaux cytosoliques de Ca^{++} précédant la lyse cellulaire. Comme il a été démontré plus haut (Section 3.5) et sera discuté en plus grands détails dans la prochaine section, les toxines utilisées dans le présent travail se sont avérées beaucoup moins actives que prévu sur la base des données publiées (Katayama *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007) du fait qu'elles se retrouvaient en grande partie associées à de l'ADN sous la forme de complexes insolubles. Il est donc tout à fait possible que les concentrations effectives de toxine aient été beaucoup plus faibles dans les expériences présentées dans ce mémoire que dans les travaux antérieurs (Katayama *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007) et, en particulier, dans ceux publiés par Katayama *et al.* (2007). Une telle situation pourrait donc avoir contribué au fait que les toxines aient surtout entraîné des oscillations calciques, dans le présent travail, et des augmentations soutenues dans les expériences de Katayama *et al.* (2007).

À l'appui de cette interprétation, selon laquelle les conditions expérimentales utilisées dans chacune de ces deux études ont favorisé la mise en évidence de deux processus physiopathologiques différents, les oscillations calciques se produisent aussi bien en présence qu'en absence de Ca^{++} extracellulaire (Section 3.4.2), tandis que les augmentations soutenues

ne sont observées qu'en présence de calcium dans le milieu (Katayama *et al.*, 2007). Il semble donc que la présence de faibles concentrations de toxine induise un processus de signalisation calcique dépendant des réserves intracellulaires de calcium. Par contre, à concentrations élevées de toxine, la formation d'un grand nombre de pores permettant la diffusion des ions calciques au travers de la membrane plasmique entraînerait un influx massif de ces ions. Des études plus poussées sont toutefois nécessaires pour établir si de tels pores sont formés directement par la toxine ou par l'ouverture de canaux calciques endogènes sous l'effet de la toxine. Alors que les oscillations calciques pourraient faire partie d'un mécanisme protégeant les cellules des effets cytotoxiques de la toxine, l'augmentation soutenue du calcium cytosolique pourrait, au contraire, accentuer ces effets en perturbant l'homéostasie de la cellule et même déclencher des processus d'apoptose ou de nécrose (Berridge *et al.*, 1998; Elmore 2007; Monteith *et al.*, 2007; Uhlén et Fritz 2010).

Les résultats de la présente étude se caractérisent par une grande variabilité dans la réponse calcique observée avec différentes cellules. Bien que la plupart des expériences aient montré des oscillations calciques, des augmentations soutenues ont également été observées (Figures 20 et 24). En général, la présence d'oscillations calciques, ainsi que leur fréquence et leur amplitude, dépend donc vraisemblablement du choix des cellules utilisées dans chaque expérience. Une telle variabilité dans les réponses calciques semble être assez fréquente pour des mesures réalisées avec des cellules individuelles, comme il a été montré, par exemple, dans des études portant sur les effets de la phényléphrine et de la vasopressine (Rooney *et al.*, 1989), et du facteur de croissance épidermique (Moccia *et al.*, 2002). Il est d'ailleurs bien documenté que la réponse calcique à différents stimuli peut souvent différer selon la phase du

cycle cellulaire où se trouve la cellule (Takada *et al.*, 1990; Fatatis et Miller, 1999; Jellerette *et al.*, 2004). Il est donc probable que la sensibilité des cellules à la toxine puisse être modulée au cours du cycle cellulaire comme il a déjà été montré dans le cas des cellules Sf9 traitées avec la Cry1C (Avisar *et al.*, 2005).

4.3. Viabilité cellulaire

Au cours de ce travail, il est rapidement devenu clair que les parasporines utilisées étaient beaucoup moins efficaces que prévu sur la base des données publiées (Katayama *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2007). Cette faible activité résulte principalement du fait que les toxines se retrouvent sous la forme de précipité insoluble (Section 3.5). Bien que la toxine s'agglomère sous forme de particules visibles au microscope, celles-ci ont tendance à rester en suspension plutôt que de sédimenter rapidement. Leur présence, lors des observations microscopiques, peut donc facilement donner l'impression qu'il s'agit de débris cellulaires résultant de l'activité de la toxine. Cette interprétation a cependant été écartée rapidement du fait que ces particules étaient également observées en absence de cellules (Figure 34).

Par ailleurs, l'utilisation de l'homodimère d'éthidium comme sonde de viabilité a permis de montrer que le précipité contenait de l'ADN en plus de la toxine. Bien que la présence d'ADN dans les cristaux parasporaux produits par le bacille de Thuringe soit bien documentée (Bietlot *et al.*, 1993; Clairmont *et al.*, 1998; Yokoyama *et al.*, 1998; Xin *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2011), elle ne semble pas poser de problème majeur dans la préparation des toxines. En fait, Clairmont *et al.* (1998) et Guo *et al.* (2011) ont même suggéré que la présence d'ADN contribuait à l'activation des toxines en les maintenant dans une conformation propice

à leur digestion progressive. Le fait que les préparations de PS1Aa2 précipitent autant apparaît donc comme un cas particulier. Il reste néanmoins que la précipitation de la toxine a vraisemblablement contribué à la variabilité des résultats présentés dans ce mémoire aussi bien pour la composition de chacune des préparations, que pour les niveaux de conductance des pores et des réponses calciques induites par la toxine.

Les deux parasporines utilisées dans le présent travail ont été préparées selon le protocole décrit par Jung *et al.* (2007). Par contre, les résultats publiés pour la PS1Aa1 (Katayama *et al.*, 2005, 2007) ont été obtenus avec de la toxine préparée avec un protocole plus élaboré comportant des étapes supplémentaires de chromatographie et de chromatofocalisation (Katayama *et al.*, 2005). L'analyse des données de purification publiées par Katayama *et al.* (2005) suggère cependant que ces étapes supplémentaires n'ont eu qu'un effet assez modeste sur la pureté de la toxine telle qu'évaluée sur gel de polyacrylamide (voir Figure 2C de Katayama *et al.*, 2005). Bien que les étapes de purification aient été très efficaces pour éliminer les contaminants, la toxine activée constituait déjà, avant même la première chromatographie, la majeure partie des protéines de l'échantillon analysé. Par contre, la purification a donné un rendement extrêmement faible puisque seulement 1.8% des protéines de l'échantillon de départ s'est retrouvé dans la préparation finale de toxine (voir Tableau 1 de Katayama *et al.*, 2005). Il se pourrait donc fort bien que les étapes supplémentaires de purification aient surtout éliminé la toxine qui n'était pas bien solubilisée dans la préparation non purifiée après l'étape d'activation par la trypsine.

Un tel raisonnement expliquerait facilement pourquoi la PS1Aa2 se soit avérée, dans les travaux présentés dans ce mémoire, beaucoup moins active que la PS1Aa1 préparée avec le

protocole de Katayama *et al.* (2005). Par contre, étant donné que la PS1Aa2 utilisée dans la présente étude et dans celle de Jung *et al.* (2007) a, semble-t-il, été préparée avec le même protocole, il paraît surprenant qu'elle ait été plus efficace que la PS1Aa1 pour la plupart des cellules sensibles, la seule exception étant les cellules HeLa, un peu plus sensibles à la PS1Aa1 qu'à la PS1Aa2 (Katayama *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007). Par exemple, les LC_{50} publiées pour la PS1Aa1 et la PS1Aa2 étaient respectivement de 3.0 et de 0.02 $\mu\text{g/ml}$ dans les cellules HepG2 (Katayama *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007). La relativement faible activité de la PS1Aa2, dans la présente étude, et sa plutôt grande toxicité pour certaines lignées cellulaires, observées dans les travaux de Jung *et al.* (2007), demeurent donc assez difficiles à réconcilier.

4.4. Perspectives

Quoiqu'il en soit, les études portant sur la PS1Aa2 seraient grandement facilitées si elles étaient menées avec de la toxine activée bien solubilisée. Étant donné que les agrégats de toxine, ainsi que sa faible toxicité, semblent résulter d'une association particulièrement stable avec des fragments d'ADN, il serait souhaitable de mettre au point un protocole de préparation de la toxine au cours duquel celui-ci serait éliminé. Des tentatives d'élimination de l'ADN avec des préparations commerciales de DNase ont cependant entraîné la dégradation et l'inactivation de la toxine, probablement dues au fait que de telles préparations contiennent des protéases (Bietlot *et al.*, 1993). Par contre, il a été possible d'éliminer l'ADN des préparations de Cry1Ac, sans la dégrader, en utilisant du suc intestinal de la tordeuse de bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*, un lépidoptère particulièrement sensible à cette toxine, comme source de DNase (Clairmont *et al.*, 1998). L'utilisation du suc intestinal d'un autre insecte, *M. sexta*, fréquemment utilisé dans les travaux de notre laboratoire, a réduit

considérablement la quantité d'ADN contenue dans une de nos préparations de PS1Aa2, sans toutefois l'éliminer complètement (Figure 35). Il vaudrait quand même la peine de poursuivre de tels essais, sur la base de ces données très encourageantes. Ces travaux vont cependant nécessiter des quantités vraisemblablement beaucoup plus importantes de toxines que celle qui était disponible au moment où cet essai a été réalisé. L'utilisation de suc intestinal, à la place de la trypsine, aurait comme avantage de traiter la protoxine en même temps avec des protéases et des DNases intestinales sans qu'il ne soit nécessaire de réduire le pH de la préparation (Schernthaner *et al.*, 2002), une étape du protocole qui s'avère nécessaire lorsque de la trypsine commerciale, et provenant donc du bœuf ou du porc, est utilisée pour l'activation de la toxine. Ce changement de pH pourrait contribuer à réduire la solubilité de la protoxine ou de la toxine activée. En plus de simplifier le protocole, l'activation avec des enzymes intestinales de lépidoptère, adaptées au pH élevé, permettrait de traiter les échantillons de toxine avec de la DNase en même temps qu'avec les protéases et possiblement réduire la formation des amas insolubles de toxines. Une telle étude devrait examiner d'autres facteurs, comme le pH et la force ionique des solutions, susceptibles d'influencer la solubilité de la toxine. De plus, il vaudrait la peine d'évaluer les avantages de purifier la toxine par chromatographie une fois que celle-ci aura été mieux solubilisée.

Il serait par ailleurs avantageux de donner suite aux travaux de bicouches lipidiques présentés dans ce mémoire afin de mieux définir les propriétés de canaux que forme la PS1Aa2, par exemple en analysant leur sélectivité ionique. Il vaudrait aussi la peine d'entreprendre de telles études avec la PS1Aa1.

La présente étude a démontré que la PS1Aa2, ainsi que la PS1Aa1, peut induire des oscillations calciques dans les cellules traitées. Une telle réponse calcique n'a, semble-t-il,

jamais été observée dans les expériences antérieures avec des toxines Cry. De plus, il semble que leur présence, plutôt que des augmentations soutenues de Ca^{++} intracellulaire, dépende de la concentration de toxine utilisée. Il serait donc particulièrement intéressant d'entreprendre des études des effets de la PS1Aa2 sur les réponses calciques en fonction de la dose de toxine, bien qu'une telle étude ne soit envisageable qu'avec de la toxine beaucoup mieux solubilisée que celle qui était disponible pour le présent travail. Dans le même ordre d'idées, il vaudrait la peine de réaliser une étude semblable avec la PS1Aa1 en portant une attention particulière aux concentrations plus faibles que celles qui ont été testées dans les travaux de Katayama *et al.* (2007). Il serait aussi d'un grand intérêt de réaliser une étude semblable avec une ou plusieurs toxines Cry et des cellules d'insectes. De telles études permettraient de tester l'hypothèse selon laquelle les réponses calciques induites par les toxines Cry à faible dose pourraient contribuer à protéger la cellule de leurs effets nocifs.

Finalement, les résultats présentés dans ce mémoire ont suggéré la possibilité que la réponse des cellules à la présence de toxine puisse changer au cours du cycle cellulaire. Ceci pourrait être étudié directement en utilisant des agents pharmacologiques qui permettent de synchroniser les cellules et de tester les effets de la toxine au cours des différentes phases du cycle cellulaire, comme dans l'étude d'Avisar *et al.* (2005) portant sur les cellules Sf9 traitées avec la Cry1C. Il vaudrait cependant la peine d'aller plus loin que cette étude en examinant non seulement la viabilité des cellules, mais également leurs réponses calciques.

4.5. Conclusions

La toxine PS1Aa2 est sélective et endommage les cellules HeLa et HepG2 sans altérer la morphologie des cellules HEK 293. Elle forme de pores dans des bicouches lipidiques, comme de nombreuses autres toxines Cry. La PS1Aa2 modifie, la plupart du temps, la concentration cytosolique de calcium dans les cellules traitées en produisant des augmentations calciques sous la forme d'oscillations qui ne dépendent pas du calcium extracellulaire. De telles oscillations n'ont pas été décrites auparavant pour d'autres toxines Cry. Dans certains cas, elle a cependant entraîné des augmentations soutenues de calcium intracellulaire, suggérant que la réponse calcique pourrait dépendre de la phase du cycle cellulaire où se trouve la cellule au moment de l'expérience. Finalement, la toxine utilisée au cours de ce travail formait des amas microscopiques insolubles contenant de l'ADN qui vraisemblablement nuisaient à son activité. Pour donner suite à ces travaux, il serait donc avantageux d'améliorer la solubilité et l'efficacité de la toxine.

Bibliographie

- Abe, Y., H. Shimada et S. Kitada. 2008. Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumour activity. *J. Biochem.* **143**:269-275.
- Abrami, L. et F. G. van der Goot. 1999. Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J. Cell Biol.* **147**: 175-184.
- Aimanova, K., M. Zhuang et S. S. Gill. 2006. Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **92**:178-187.
- Akiba, T., Y. Abe, S. Kitada, Y. Kusaka, A. Ito, T. Ichimatsu, H. Katayama, T. Akao, K. Higuchi, E. Mizuki, M. Ohba, R. Kanai et K. Harata. 2009. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J. Mol. Biol.* **386**:121-133.
- Akiba, T., K. Higuchi, E. Mizuki, K. Ekino, T. Shin, M. Ohba, R. Kanai et K. Harata. 2006. Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to β -pore-forming toxins. *Proteins* **63**:243-248.
- Andrews, R. E., Jr., M. M. Bibilos et L. A. Bulla, Jr. 1985. Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:737-742.
- Avisar, D., M. Segal, B. Sneh et A. Zilberstein. 2005. Cell-cycle-dependent resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in Sf9 cells. *J. Cell Sci.* **118**: 3163-3171.
- Battisti, L., B. D. Green et C. B. Thorne. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **162**:543-550.
- Bellier, A., C. S. Chen, C. Y. Kao, H. N. Cinar et R. V. Aroian. 2009. Hypoxia and the hypoxic response pathway protect against pore-forming toxins in *C. elegans*. *PLoS Pathog.* **5**:e1000689.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman et P. Lipp. 1998. Calcium – a life and death signal. *Nature* **395**:645-648.
- Bietlot, H. P., J. P. Schernthaner, R. E. Milne, F. R. Clairmont, R. S. Bhella et H. Kaplan. 1993. Evidence that the CryIA crystal protein from *Bacillus thuringiensis* is associated with DNA. *J. Biol. Chem.* **268**:8240-8245.
- Bietlot, H. P., I. Vishnubhatla, P. R. Carey, M. Pozsgay et H. Kaplan. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**:309-315.
- Bischof, L. J., C. Y. Kao, F. C. Los, M. R. Gonzalez, Z. Shen, S. P. Briggs, F. G. van der Goot et R. V. Aroian. 2008. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore-forming toxin in vivo. *PLoS Pathog.* **4**:e1000176.

- Bond, R. P., C. B. Boyce et S. J. French. 1969. A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Biochem. J.* **114**:477-488.
- Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar et J. Li. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**:363-382.
- Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat et J. Lescar. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**:3391-3401.
- Bravo, A., S. S. Gill et M. Soberón. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**:423-435.
- Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill et M. Soberón. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**:38-46.
- Bravo, A. et M. Soberón. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* **26**:573-579.
- Brown, D. A. et E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-136.
- Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson et P. C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **8**:147-204.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2415-2422.
- Butko, P., M. Cournoyer, M. Pusztai-Carey et W. K. Surewicz. 1994. Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC. *FEBS Lett.* **340**:89-92.
- Cahan, R., H. Friman et Y. Nitzan. 2008. Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Microbiology* **154**:3529-3536.
- Cancino-Rodezno, A., C. Alexander, R. Villasenor, S. Pacheco, H. Porta, Y. Pauchet, M. Soberon, S. S. Gill et A. Bravo. 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**:58-63.
- Carroll, J. et D. J. Ellar. 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771-778.
- Carroll, J. et D. J. Ellar. 1997. Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **245**:797-804.

- Chaturvedi, R., V. Bhakuni et R. Tuli. 2000. The delta-endotoxin proteins accumulate in *Escherichia coli* as a protein-DNA complex that can be dissociated by hydrophobic interaction chromatography. *Protein Expr. Purif.* **20**:21-26.
- Chaufaux, J., M. Marchal, N. Gilois, I. Jehanno, et C. Buisson. 1997. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. *Can. J. Microbiol.* **43**:337-343.
- Chen, C. S., A. Bellier, C. Y. Kao, Y. L. Yang, H. D. Chen, F. C. Los et R. V. Aroian. 2010. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **5**:e9494.
- Chen, J., K. G. Aimanova, L. E. Fernandez, A. Bravo, M. Soberon et S. S. Gill. 2009a. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* **424**:191-200.
- Chen, J., K. G. Aimanova, S. Pan et S. S. Gill. 2009b. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**:688-696.
- Chen, X. J., A. Curtiss, E. Alcantara et D. H. Dean. 1995. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**:6412-6419.
- Chen, X. J., M. K. Lee et D. H. Dean. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9041-9045.
- Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor et H. Kaplan. 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis* Structural implications. *FEBS Eur. J. Biochem.* **189**:523-527.
- Clairmont, F. R., R. E. Milne, V. T. Pham, M. B. Carriere et H. Kaplan. 1998. Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **273**:9292-9296.
- Cohen, S., S. Albeck, E. Ben-Dov, R. Cahan, M. Firer, A. Zaritsky et O. Dym. 2011. Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *J. Mol. Biol.* **413**:804-814.
- Cohen, S., O. Dym, S. Albeck, E. Ben-Dov, R. Cahan, M. Firer et A. Zaritsky. 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Mol. Biol.* **380**:820-827.
- Cole, A. R., M. Gilbert, M. Popoff, D. S. Moss, A. W. Titball et A. K. Basak. 2004. *Clostridium perfringens* ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struct. Biol.* **11**:797-798.
- Cooper, M. A., J. Carroll, E. R. Travis, D. H. Williams et D. J. Ellar. 1998. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem. J.* **333**:677-683.

- Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade et R. Frutos. 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**:35546-35551.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum et D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:807-813.
- de Barjac, H. et M. M. Lecadet. 1976. Dosage biochimique de l'exotoxine thermostable de *B. thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymérase bactériennes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **282D**:2119-2122.
- de Bernard, M., A. Cappon, L. Pancotto, P. Ruggiero, J. Rivera, G. Del Giudice et C. Montecucco. 2005. The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell. Microbiol.* **7**:191-198.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore et H. E. Schnepf. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **37**:409-433.
- Dorsch, J.A., M. Candas, N. B. Griko, W. S. A. Maaty, E. G. Midboe, R. K. Vadlamudi et L. A. Bulla Jr. 2002. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**:1025-1036.
- Dow, J. A. T. 1984. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246**:R633-R635.
- Du, C., P. A. Martin et K. W. Nickerson. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3847-3853.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**:495-516.
- English, L., H. L. Robbins, M. A. Von Tersch, C. A. Kulesza, D. Ave, D. Coyle, C. S. Jany et S. L. Slatin. 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**:1025-1035.
- Entwistle, P. F. 1993. *Bacillus thuringiensis* : An Environmental Biopesticide : Theory and Practice. Chichester, England, New York, John Wiley & Sons.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig et M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5389-5394.
- Fatatis, A. et R. J. Miller. 1999. Cell cycle control of PDGF-induced Ca²⁺ signaling through modulation of sphingolipid metabolism. *FASEB J.* **13**:1291-1301.

- Federici, B. A., H.-W. Park et D. K. Bideshi. 2010. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *Open Toxinol. J.* **3**:154-171.
- Feld, J., S. K. Barta, C. Schinke, I. Braunschweig, Y. Zhou et A. K. Verma. 2013. Linked-in: design and efficacy of antibody drug conjugates in oncology. *Oncotarget* **4**:397-412.
- Fernández, L. E., C. Martinez-Anaya, E. Lira, J. Chen, A. Evans, S. Hernández-Martínez, H. Lanz-Mendoza, A. Bravo, S. S. Gill et M. Soberón. 2009. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* **48**:8899-8907.
- Fitzgerald, D. 1996. Why toxins! *Semin. Cancer Biol.* **7**:87-95.
- FitzGerald, D. et I. Pastan. 1989. Targeted toxin therapy for the treatment of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**:1455-1463.
- Fivaz, M., L. Abrami et F. G. van der Goot. 2000. Pathogens, toxins, and lipid rafts. *Protoplasma* **212**:8-14.
- Flannagan, R.D., C.-G. Yu, J. P. Mathis, T. E. Meyer, X. Shi, H. A. A. Siqueira et B. D. Siegfried. 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**:33-40.
- Gahan, L.J., Y. Pauchet, H. Vogel et D. G. Heckel. 2010. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet.* **6**:e1001248.
- Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn et L. English. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst.* **D57**:1101-1109.
- Gazit, E. et Y. Shai. 1995. The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Relevance to a functional model. *J. Biol. Chem.* **270**:2571-2578.
- Gill, S. S., E. A. Cowles et P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* **37**:615-636.
- Gill, M. et D. Ellar. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* **11**:619-625.
- Gómez, I., L. Pardo-López, C. Muños-Garay, L. E. Fernandez, C. Pérez, J. Sánchez, M., Soberón and A. Bravo. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* **28**: 169-173.
- Gonzalez, J. M., Jr., B. J. Brown et B. C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:6951-6955.

- Griffitts, J.S., S. M. Haslam, T. Yang, S. F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P. S. Cremer, A. Dell, M. J. Adang et R. V. Aroian. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**:922-925.
- Griffitts, J. S., D. L. Huffman, J. L. Whitacre, B. D. Barrows, L. D. Marroquin, R. Muller, J. R. Brown, T. Hennes, J. D. Esko et R. V. Aroian. 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.* **278**:45594-45602.
- Griffitts, J.S., J. L. Whitacre, D. E. Stevens et R. V. Aroian. 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* **293**:860-864
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau et M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447-464.
- Groulx, N., H. McGuire, R. Laprade, J.-L. Schwartz et R. Blunck. 2011. Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J. Biol. Chem.* **286**:42274-42282.
- Guihard, G., V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz. 2000. Kinetic properties of the channels formed by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1C in the plasma membrane of Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **175**:115-122.
- Guo, S., J. Li, Y. Liu, F. Song et J. Zhang. 2011. The role of DNA binding with the Cry8Ea1 toxin of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **317**:203-210.
- Guo, S., S. Ye, Y. Liu, L. Wei, J. Xue, H. Wu, F. Song, J. Zhang, X. Wu, D. Huang et Z. Rao. 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: an insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* **168**:259-266.
- Haider, M. Z. et D. J. Ellar. 1987. Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin. *Biochem. J.* **248**:197-201.
- Haider, M.Z., B. H. Knowles et D. J. Ellar. 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* **156**: 531-540.
- Hayakawa, T., R. Kanagawa, Y. Kotani, M. Kimura, M. Yamagiwa, Y. Yamane, S. Takebe et H. Sakai. 2007. Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* **55**:278-283.
- Heckel, D. G. 2012. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* **104**:103-110.
- Helgason, E., O. A. Okstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna et A. B. Kolsto. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2627-2630.
- Herrero, S., T. Gechev, P. L. Bakker, W. J. Moar et R. A. de Maagd. 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* **6**:96.

- Hodgman, T. C. et D. J. Ellar. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by computational analysis. *DNA Seq.* **1**:97-106.
- Hofmann, C. et P. Luthy. 1986. Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. *Arch. Microbiol.* **146**:7-11.
- Hofmann, C., P. Luthy, R. Hutter et V. Pliska. 1988a. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**:85-91.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens et H. Van Mellaert. 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**:7844-7848.
- Höfte, H. et H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242-255.
- Hougard, J.-M. et C. Back. 1992. Perspectives on the bacterial control of vectors in the tropics. *Parasitol. Today* **8**:364-366.
- Hua, G., J. L. Jurat-Fuentes et M. J. Adang. 2004a. Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R_{1a} cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**:193-202.
- Hua, G., J. L. Jurat-Fuentes et M. J. Adang. 2004b. Bt-R_{1a} extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**:28051-28056.
- Huffman, D. L., L. Abrami, R. Sasik, J. Corbeil, F. G. van der Goot et R. V. Aroian. 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:10995-11000.
- Hui, F., U. Scheib, Y. Hu, R. J. Sommer, R. V. Aroian et P. Ghosh. 2012. Structure and glycolipid binding properties of the nematicidal protein Cry5B. *Biochemistry* **51**:9911-9921.
- Ihara, H. et M. Himeno. 2008. Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. *J. Invertebr. Pathol.* **98**:177-183.
- Ito, A., Y. Sasaguri, S. Kitada, Y. Kusaka, K. Kuwano, K. Masutomi, E. Mizuki, T. Akao et M. Ohba. 2004. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.* **279**:21282-21286.
- Jara, S., P. Maduell et S. Orduz. 2006. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. *J. Appl. Microbiol.* **101**:117-124.
- Jellerette, T., M. Kurokawa, B. Lee, C. Malcuit, S-Y. Yoon, J. Smyth, E. Vermassen, H. De Smedt, J. B. Parys et R. A. Fissore. 2004. Cell cycle-coupled [Ca²⁺]_i oscillations in mouse zygotes and function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1. *Dev. Biol.* **274**: 94-109.

- Jiménez, A. I., E. Z. Reyes, A. Cancino-Rodezno, L. P. Bedoya-Pérez, G. G. Caballero-Flores, L. F. Muriel-Millan, S. Likitvivatanavong, S. S. Gill, A. Bravo et M. Soberón. 2012. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **42**:683-689.
- Jiménez-Juárez, N., C. Muñoz-Garay, I. Gómez, S. S. Gill, M. Soberón et A. Bravo. 2008. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides* **29**:318-323.
- Jung, Y. C., E. Mizuki, T. Akao et J.-C. Côté. 2007. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **103**:65-79.
- Jurat-Fuentes, J. L. et M. J. Adang. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* **271**:3127-3135.
- Jurat-Fuentes, J. L. et M. J. Adang. 2006. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry* **45**:9688-9695.
- Jurat-Fuentes, J.L., L. Karmbaiah, S. R. K. Jakka, C. Ning, C. Liu, K. Wu, J. Jackson, F. Gould, C. Blanco, M. Portilla, O. Perera et M. Adang. 2011. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE* **6**:e17606.
- Kalmykova, G. V., L. I. Burtseva et T. G. Iudina. 1995. Comparative characteristics of mutants of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Microbiology (Moscow)* **64**:388-394.
- Kao, C.-Y., F. C. O. Los, D. L. Huffman, S. Wachi, N. Kloft, M. Husmann, V. Karabrahimi, J.-L. Schwartz, A. Bellier, C. Ha, Y. Sagong, H. Fan, P. Ghosh, M. Hsieh, C.-S. Hsu, L. Chen et R. V. Aroian. 2011. Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog.* **7**:e1001314.
- Karabrahimi, V. 2013. Propriétés électrophysiologiques des canaux ioniques formés par la toxine nématocide Cry5Ba du bacille de Thuringe dans les bicouches lipidiques planes. Mémoire de maîtrise, Département de physiologie, Université de Montréal.
- Katayama, H., Y. Kusaka, H. Yokota, T. Akao, M. Kojima, O. Nakamura, E. Mekada et E. Mizuki. 2007. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *J. Biol. Chem.* **282**:7742-7752.
- Katayama, H., H. Yokota, T. Akao, O. Nakamura, M. Ohba, E. Mekada et E. Mizuki. 2005. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.* **137**:17-25.
- Kim, H. S., S. Yamashita, T. Akao, H. Saitoh, K. Higuchi, Y. S. Park, E. Mizuki et M. Ohba. 2000. In vitro cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **89**:16-23.

- Kim, T. Y. et H. T. Huang. 1970. The beta-exotoxins of *Bacillus thuringiensis*. I. Isolation and characterization. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:100-108.
- Kirouac, M., V. Vachon, M. Fortier, M.-C. Trudel, A. Berteloot, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 2006. A mechanical force contributes to the “osmotic swelling” of brush-border membrane vesicles. *Biophys. J.* **91**:3301-3312.
- Kirouac, M., V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171-179.
- Kirouac, M., V. Vachon, S. Rivest, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 2003. Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* **196**:51-59.
- Kitada, S., Y. Abe, T. Maeda et H. Shimada. 2009. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicology* **264**:80-88.
- Kitada, S., Y. Abe, H. Shimada, Y. Kusaka, Y. Matsuo, H. Katayama, S. Okumura, T. Akao, E. Mizuki, O. Kuge, Y. Sasaguri, M. Ohba et A. Ito. 2006. Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **281**:26350-26360.
- Knowles, B.H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275-308.
- Knowles, B. H. et D. J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**:509-518.
- Koschinski, A., H. Repp, B. Ünver, F. Dreyer, D. Brockmeier, Valeva, A. Bhakdi, S. et I. Walev. 2006. Why *Escherichia coli* α -hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells – the pore is on its own. *FASEB J.* **20**:E80-E87.
- Lacey, L. A. et A. H. Undeen. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* **31**:265-296.
- Laestadius, Å., A. Richter-Dahlfors et A. Aperia. 2002. Dual effects of *Escherichia coli* α -hemolysin on rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* **62**:2035-2042.
- Lereclus, D., H. Agaisse, C. Grandvalet, S. Salamitou et M. Gominet. 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:295-299.
- Li, J. 1996. Insecticidal δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: *Protein Toxin Structure* (Parker, M.W., ed.), R.G. Landes, Georgetown, TX, pp. 49-77.
- Li, J. D., J. Carroll et D. J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815-821.

- Li, J., D. J. Derbyshire, B. Promdonkoy et D. J. Ellar. 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571-577.
- Li, J., P. A. Koni et D. J. Ellar. 1996. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**:129-152.
- Li, Y. M. et W. A. Hall. 2010. Targeted toxins in brain tumor therapy. *Toxins* **2**:2645-2662.
- Li, E. et A. A. Yousten. 1975. Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **30**:354-361.
- Liang, Y., S. S. Patel et D. H. Dean. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**:24719-24724.
- Liebig, B., D. L. Stetson et D. H. Dean. 1995. Quantification of the effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on short-circuit current in the midgut of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **41**:17-22.
- Likitvivatanavong, S., J. Chen, A. M. Evans, A. Bravo, M. Soberón et S. S. Gill. 2011. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.* **59**:2829-2838.
- Lorence, A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero et A. Bravo. 1995. δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**:217-222.
- Marroquin, L. D., D. Elyassnia, J. S. Griffiths, J. S. Feitelson, et R. V. Aroian. 2000. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **155**:1693-1699.
- Masson, L., A. Mazza, R. Brousseau et B. Tabashnik. 1995. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Biol. Chem.* **270**:11887-11896.
- Masson, L., G. Schwab, A. Mazza, R. Brousseau, L. Potvin et J.-L. Schwartz. 2004. A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. *Biochemistry* **43**:12349-12357.
- Meadows, M. P., D. J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett et H. D. Burges. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1344-1350.
- Mizuki, E., M. Ohba, T. Akao, S. Yamashita, H. Saitoh et Y. S. Park. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **86**:477-486.
- Mizuki, E., Y. S. Park, H. Saitoh, S. Yamashita, T. Akao, K. Higuchi et M. Ohba. 2000. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**:625-634.

- Moccia, F., R. Berra-Romani, S. Tritto, S. Signorelli, V. Taglietti et F. Tanzi. 2002. Epidermal growth factor induces intracellular Ca^{2+} oscillations in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **194**:139-150.
- Monette, R., L. Potvin, D. Baines, R. Laprade et J.-L. Schwartz. 1997. Interaction between calcium ions and *Bacillus thuringiensis* toxin activity against Sf9 cells (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:440-447.
- Monteith, G. R., D. McAndrew, H. M. Faddy et S. J. Roberts-Thomson. 2007. Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport. *Nat. Rev. Cancer* **7**:519-530.
- Morse, R.J., T. Yamamoto et R. M. Stroud. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409-417.
- Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien et W. C. Wescott. 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **194**:979-980.
- Nagamatsu, Y., T. Koike, K. Sasaki, A. Yoshimoto et Y. Furukawa. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* **460**:385-390.
- Nagamatsu, Y., S. Okamura, H. Saitou, T. Akao et E. Mizuki. 2010. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**:494-498.
- Nagamatsu, Y., S. Toda, T. Koike, Y. Miyoshi, S. Shigematsu et M. Kogure. 1998. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:727-734.
- Namba, A., M. Yamagiwa, H. Amano, T. Akao, E. Mizuki, M. Ohba et H. Sakai. 2003. The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis* A1519 strain against the human leukemic T cell. *Biochim. Biophys. Acta* **1622**:29-35.
- Nickerson, K. W. 1980. Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Biotechnol Bioeng* **22**:1305-1333.
- Ohba, M. 1996. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: a possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *J Appl Bacteriol* **1**:56-64.
- Ohba, M., E. Mizuki, et A. Uemori. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res* **29**:427-434.
- Ohba, M., Y. M. Yu et K. Aizawa. 1988. Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**:85-89.
- Okumura, S., H. Saitoh, T. Ishikawa, N. Wasano, S. Yamashita, K.-I. Kusumoto, T. Akao, E. Mizuki, M. Ohba et K. Inouye. 2005. Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **53**:6313-6318.
- Okumura, S., H. Saitoh, T. Ishikawa, K. Inouye et E. Mizuki. 2011. Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**:1476-1482.

- Orrenius, S., B. Zhivotovsky et P. Nicotera. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:552-565.
- Pardo-López, L., M. Soberón et A. Bravo. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**:3-22.
- Pastan, I., R. Hassan, D. J. FitzGerald et R. J. Kreitman. 2007. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu. Rev. Med.* **58**:221-237.
- Peyronnet, O., B. Nieman, F. Genereux, V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz. 2002. Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1567**:113-122.
- Peyronnet, O., J.-F. Noulin, R. Laprade et J.-L. Schwartz. 2004. Patch-clamp study of the apical membrane of the midgut of *Manduca sexta* larvae: direct demonstration of endogenous channels and effect of a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Insect Physiol.* **50**:791-803.
- Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Baines, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1679-1684.
- Peyronnet, O., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 2001. Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* **184**:45-54.
- Pigott, C. R. et D. J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:255-281.
- Potvin, L., R. Laprade et J.-L. Schwartz. 1998. Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular stores in Cf1 cells. *J. Exp. Biol.* **201**:1851-1858.
- Puntheeranurak, T., P. Uawithya, L. Potvin, C. Angsuthanasombat et J.-L. Schwartz. 2004. Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its α 1- α 5 fragment. *Mol. Membr. Biol.* **21**:67-74.
- Racapé, J. 1997. Propriétés des pores formés par les toxines parentales et chimériques de *Bacillus thuringiensis* dans les bicouches lipidiques planes. Mémoire de maîtrise, Département de physique, Université de Montréal.
- Rajamohan, F., E. Alcantara, M. K. Lee, X. J. Chen, A. Curtiss et D. H. Dean. 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177**:2276-2282.
- Rawn, D. J. 1989. *Biochemistry*. Neil Patterson Publishers, Burlington, NC, pp. 316-317.
- Repp, H., Z. Pamukçi, A. Koschinski, E. Domann, A. Darji, J. Birringer, D. Brockmeier, T. Chakraborty et F. Dreyer. 2002. Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell. Microbiol.* **4**:483-491.

- Revina, L.P., L. I. Kostina, M. A. Dronina, I. A. Zalunin, G. G. Chestukhina, T. G. Yudina, A. V. Konukhova et A. V. Izumrudova. 2005. Novel antibacterial proteins from entomocidal crystals of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* **51**:141-148.
- Rogoff, M. H. et A. A. Yousten. 1969. *Bacillus thuringiensis*: microbiological considerations. *Annu. Rev. Microbiol.* **23**:357-386.
- Roh, J. Y., H. W. Park, B. R. Jin, H. S. Kim, Y. M. Yu et S. K. Kang. 1996. Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolates from Korea. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**:249-252.
- Rooney, T. A., E. J. Sass et A. P. Thomas. 1989. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single Fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **264**:17131-17141.
- Sacchi, V. F., P. Parenti, G. M. Hanozet, B. Giordana, P. Lüthy et M. G. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.* **204**:213-218.
- Saitoh, H., S. Okumura, T. Ishikawa, T. Akao, E. Mizuki et M. Ohba. 2006. Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:2935-2941.
- Sanahuja, G., R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell et P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* **9**:283-300.
- Sanchis, V. et D. Bourguet. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **28**:11-20.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English et M. J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**:10088-10092.
- Sapra, P. et B. Shor. 2013. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: advances and challenges. *Pharmacol. Ther.* **138**:452-469.
- Sauka, D. H. et G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol.* **40**:124-140.
- Schernthaner, J. P., R. E. Milne et H. Kaplan. 2002. Characterization of a novel insect digestive DNase with a highly alkaline pH optimum. *Insect Biochem Mol Biol* **32**:255-263.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler et D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Schroeder, R.J., S. N. Ahmed, Y. Zhu, E. London et D. A. Brown. 1998. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidyl-inositol-

- anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J. Biol. Chem.* **273**:1150-1157.
- Schwartz, J.-L., L. Garneau, L. Masson et R. Brousseau. 1991. Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1065**:250-260.
- Schwartz, J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau et E. Rousseau. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**:53-62.
- Schwartz, J. L., M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Prefontaine, R. Brousseau et L. Masson. 1997a. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS. Lett.* **410**:397-402.
- Schwartz, J.-L. et R. Laprade. 2000. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In: *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (Charles, J.-F., Delécluse, A. and Nielsen-LeRoux, C., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 199-217.
- Schwartz, J. L., Y. J. Lu, P. Sohnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson et M. J. Adang. 1997b. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**:270-276.
- Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman et W. A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**:327-337.
- Sivakumar, S., R. Rajagopal, G. R. Venkatesh, A. Srivastava et R. K. Bhatnagar. 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **282**:7312-7319.
- Slatin, S. L., C. K. Abrams et L. English. 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765-772.
- Söderblom, T., Å. Laestadius, C. Oxhamre, A. Aperia et A. Richter-Dahlfors. 2002. Toxin-induced calcium oscillations: a novel strategy to affect gene regulation in target cells. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:511-515.
- Söderblom, T., C. Oxhamre, S. N. Wai, P. Uhlén, A. Aperia, B. E. Uhlin et A. Richter-Dahlfors. 2005. Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immunostimulation via epithelial Ca²⁺ signalling and Toll-like receptor 4. *Cell. Microbiol.* **7**:779-788.
- Takada, K., N. Amino, H. Tada et K. Miyai. 1990. Relationship between proliferation and cell cycle-dependent Ca²⁺ influx induced by a combination of thyrotropin and insulin-like growth factor-1 in rat thyroid cells. *J. Clin. Invest.* **86**: 1548-1555.

- Thiéry, I., C. Back, P. Barbazan et G. Sinègre. 1996. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. *Ann. Inst. Pasteur Actualités* **7**:247-260.
- Thrush, G. R., L. R. Lark, B. C. Clinchy et E. S. Vitetta. 1996. Immunotoxins: an update. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:49-71.
- Tigue, N. J., J. Jacoby et D. J. Ellar. 2001. The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5715-5720.
- Tran, L.B., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488-4494.
- Tsuda, Y., F. Nakatani, K. Hashimoto, S. Ikawa, C. Matsuura, T. Fukada, K. Sugimoto et M. Himeno. 2003. Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). *Biochem. J.* **369**:697-703.
- Uhlén, P. et N. Fritz. 2010. Biochemistry of calcium oscillations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**:28-32.
- Uhlén, P., A. Laestadius, T. Jahnukainen, T. Söderblom, F. Bäckhed, G. Celsi, H. Brismar, S. Normark, A. Aperia et A. Richter-Dahlfors. 2000. α -Haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells. *Nature* **405**:694-697.
- Vachon, V., R. Laprade et J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J. Invertebr. Pathol.* **111**:1-12.
- Vachon, V., M.-J. Paradis, M. Marsolais, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 1995. Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **148**:57-63.
- Vachon, V., J.-L. Schwartz, L. Masson, R. Brousseau et R. Laprade. 2004. Structure and function of *Bacillus thuringiensis* pore-forming insecticidal toxins. *Phys. Can.* **60**:101-107.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele et H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**:239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele et H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378-1385.
- Vié, V., N. Van Mau, P. Pomarède, C. Dance, J.-L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz et C. Le Grimellec. 2001. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* **180**:195-203.
- Vilas-Boas, G. T., A. P. Peruca et O. M. Arantes. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**:673-687.

- Villalon, M., V. Vachon, R. Brousseau, J.-L. Schwartz et R. Laprade. 1998. Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**:27-34.
- Wirth, M. C., W. E. Walton et B. A. Federici. 2010. Inheritance patterns, dominance, stability, and allelism of insecticide resistance and cross-resistance in two colonies of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) selected with Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Med. Entomol.* **47**:814-822.
- Wolfersberger, M. G. 1991. Inhibition of potassium-gradient-driven phenylalanine uptake in larval *Lymantria dispar* midgut by two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins correlates with the activity of the toxins as gypsy moth larvicides. *J. Exp. Biol.* **161**:519-525.
- Xin, L., Y. Sun, X. Ding, Z. Fu, X. Mo, H. Zhang et Z. Yuan. 2005. Identification of cry-type genes on 20-kb DNA associated with Cry1 crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* **51**:53-58.
- Yamaizumi, M., E. Mekada, T. Uchida et Y. Okada. 1978. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**:245-250.
- Yamashita, S., H. Katayama, H. Saitoh, T. Akao, Y. S. Park, E. Mizuki, M. Ohba et A. Ito. 2005. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J. Biochem.* **138**:663-672.
- Yokoyama, Y., K. Kohda et M. Okamoto. 1998. CytA protein, a δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is associated with DNA. *Biol. Pharm. Bull.* **21**:1263-1266.
- Yousten, A. A. et E. W. Davidson. 1982. Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:1449-1455.
- Yu, C. G., M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel et J. J. Estruch. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:532-536.
- Yudina, T. G., A. V. Konukhova, L. P. Revina, L. I. Kostina, I. A. Zalunin et G. G. Chestukhina. 2003. Antibacterial activity of Cry- and Cyt-proteins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Can J. Microbiol.* **49**:37-44.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young et L. A. Bulla, Jr. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* **12**: 1407-1416.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig et L. A. Bulla, Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:9897-9902.
- Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gómez, A. K. Pullikuth, M. Soberón, A. Bravo et S. S. Gill. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* **277**:13863-13872.