

Université de Montréal

**Étude in vitro des changements physiologiques des cellules épithéliales du moustique
Aedes aegypti en réponse à une exposition aux toxines du bacille de Thuringe**

Par James-Christopher Bernard

Département de Pharmacologie et physiologie,

Faculté de médecine

Mémoire déposé en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Décembre 2016

© James-Christopher Bernard, 2016

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude in vitro des changements physiologiques des cellules épithéliales du moustique *Aedes aegypti* en réponse à une exposition aux toxines du bacille de Thuringe

présenté par :

James-Christopher Bernard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Louis Schwartz

Emmanuelle Brochiero

Raynald Laprade

Mémoire accepté le : _____

Résumé

Bacillus thuringiensis sérotype *israelensis* (Bti) produit quatre toxines entomocides utilisées à grande échelle pour le biocontrôle des populations de diptères nuisibles et vecteurs de maladies : Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa et Cyt1Aa. Chacune de ces toxines présente un effet létal sur différents insectes mais, lorsqu'elles sont combinées, on observe un effet synergique et l'absence de résistance. Bien que cette synergie soit bien documentée par des tests de toxicité, il existe très peu d'information sur son mécanisme aux niveaux cellulaire et moléculaire. À l'aide d'intestins isolés des larves du moustique *Aedes aegypti*, le principal vecteur du paludisme, et de microélectrodes, nous avons observé une dépolarisation membranaire en présence de Cyt1Aa et de Cry4Aa individuellement. Cette dépolarisation se produit cependant plus rapidement lorsque la Cyt1Aa est utilisée en même temps que la Cry4Aa. D'autre part, des expériences réalisées avec la sonde calcique Fura-2 sur une lignée cellulaire provenant d'*Anopheles gambiae* (Ag55), ont révélé une forte activité lytique de la Cyt1Aa, mais très peu d'effets des autres Cry, et ce même en combinaison. Nous avons dissocié les cellules de l'épithélium intestinal isolé du moustique pour des expériences de Fura2. Nos résultats, quoique préliminaires, montrent les effets variables de ces toxines lorsqu'elles sont administrées seules sur les cellules dissociées : une augmentation du calcium intracellulaire, ou une fuite de la sonde se traduisant par une perte du signal fluorescent, ou la lyse cellulaire. On observe également en présence de Cyt1Aa et de Cry4Ba, que les effets sont presque instantanés.

Mots clés : *Bacillus thuringiensis* sérotype *israelensis*, Bti, Cyt1Aa, Cry4Aa, Cry4Ba, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, synergie, microélectrode, Fura2

Abstract

Bacillus thuringiensis var israelensis (Bti) produces four insecticidal toxins used around the world to control disease-borne and harmful dipterans populations: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa and Cyt1Aa. They each present their lethal effect on different dipterans, but combined, they generate a synergistic activity and a reduced resistance is observed. Though these synergies are well documented and supported by toxicity bioassays, little is known regarding the cellular and molecular mechanisms of these synergies. Here, by using freshly isolated midguts from the mosquito *Aedes aegypti*, an important malaria vector, and glass microelectrodes, we measured the electrical potential of the apical membrane when exposed to these toxins alone or in combination. We observed a depolarisation when treated with Cyt1Aa and Cry4Aa. Toxin mixture assays only revealed a faster depolarisation of the membrane when the above two toxins were combined together, and a variety of responses with other toxin mixtures. Microspectrofluometry using the calcium probe Fura-2 on an immortal cell line from *Anopheles gambiae* (Ag55) showed massive effect of Cyt1Aa, but very little effect of the Cry toxins alone or in mixture. Microspectrofluometry experiments were also conducted on freshly dissociated cells from *Aedes aegypti*. Though these experiments are innovative and the results preliminary, it was observed that some cells responded differently to Cyt1Aa and Cry4Ba, showing the various ways these toxins affect cells, by inducing either intracellular calcium change, or by entirely losing the probe, or by cell lysis. The mixture of these toxins is very efficient and almost instantaneous.

Key word : *Bacillus thuringiensis var israelensis*, Bti, Cyt1Aa, Cry4Aa, Cry4Ba, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, synergies, microelectrode, Fura2-AM

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> sérotype <i>israelensis</i>	1
1.1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
1.1.2 Sérotype <i>israelensis</i>	1
1.1.3 Le moustique <i>Aedes aegypti</i> et le Bti	2
1.1.4 Physiologie de l'intestin du moustique.....	3
1.2 Les toxines du Bti	5
1.2.1 Les endotoxines	5
1.2.2 Les toxines Cry	6
1.2.3 Les toxines Cyt	10
1.3 Synergie	13

1.3.1 Les synergies in vivo	13
1.3.2 Le rôle de la Cyt dans la synergie.....	14
1.3.3 Absence de résistance	15
1.3.4 Physiologie de la synergie	16
1.4 Hypothèse et objectifs.....	16
Chapitre 2. Matériels et Méthodes	18
2.1 Électrophysiologie	18
2.1.1 Préparation du spécimen.....	18
2.2.2 Cellules dissociées	20
2.3 Viabilité cellulaire.....	20
2.3.1 Bleu de trypan.....	20
2.3.2 Observation microscopique	20
2.3.3 Colorimétrie à plaque multipuits	21
2.4.1 Techniques et appareils.....	22
2.4.2 Charge des cellules Ag55	23
2.4.4 Présentation des résultats	24
Chapitre 3 : Résultats	25
3.1 Viabilité cellulaire.....	25
3.1.1 Microscopie	25
3.1.2 Spectroscopie à lecture de plaque.....	35

3.2 Microspectrofluométrie.....	37
3.2.1 Réponse calcique de la lignée cellulaire	37
3.2.2 Réponse calcique sur les cellules isolées.....	44
3.3 Microélectrodes.....	46
Chapitre 4 : Discussion	53
4.1 Viabilité cellulaire.....	53
4.2 Microélectrodes.....	54
4.3 Réponses calciques	56
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....	59
Bibliographie.....	62

Liste des tableaux :

Tableau I: Réponse des cellules Ag55 aux toxines Cyt1Aa à 0,008 et 0,03 µg/ml en combinaison avec Cry4Aa et Cry4Ba, respectivement, à 50 µg/ml.....	41
Tableau II: Réponse des cellules Ag55 aux toxines Cyt1Aa à 0,008 et 0,03 µg/ml en combinaison avec Cry4Aa et Cry4Ba, respectivement, à 50 µg/ml.....	42
Tableau III : Combinaisons de toxines testées sur les cellules de l'intestin isolé du moustique <i>A. aegypti</i>	51

Liste des figures :

Figure 1: Modèle d'intestin du moustique <i>A. gambiae</i> (A).....	4
Figure 2: Structure tridimensionnelle des toxines Cry4Aa (A) et Cry4Ba (B).....	6
Figure 3: Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1Aa.....	10
Figure 4: Modèle de plaque multipuits pour expérience de colorimétrie, après l'ajout de l'agent MTT et du temps d'exposition.....	21
Figure 5: Groupe de cellules épithéliales dissociées de l'intestin de larve de <i>A. aegypti</i> observées dans la solution Ae.....	26
Figure 6: Groupe de cellules épithéliales dissociées du moustique <i>A. aegypti</i> observées dans la solution Ae.....	27
Figure 7: Image plus détaillée (par zoom électronique) de deux cellules épithéliales rondes sans villosités.....	27
Figure 8: Groupe de cellules dissociées de l'intestin de <i>A. aegypti</i> exposées à 25 µg/ml de Cry4Aa dans la solution Ae, à t ₀ (A), t _{5min} (B), t _{10min} (C) et t _{60min} (D).....	28
Figure 9: Image plus détaillée (par zoom électronique) d'une cellule dissociée de l'intestin de larve de <i>A. aegypti</i> exposée à 25 µg/ml de Cry4Ba dans la solution Ae à t ₀ (A) et à t _{30min} (B).....	29
Figure 10: Groupe de cellules dissociées de l'intestin isolé de <i>A. aegypti</i> exposées à 25 µg/ml de Cry4Ba et 1 µg/ml de Cyt1Aa dans la solution Ae à t ₀ (A) et t _{20min} (B).....	30
Figure 11: Cellules Ag55 dans la solution Ag sans toxine pendant 24 h au t ₀ (A), t _{30min} (B), t _{60min} (C) et t _{24h} (D).....	31
Figure 12: Cellules Ag55 exposées à 100 µg/ml de toxine de Cry4Aa dans la solution Ag sur une période de 24h : t ₀ (A), t _{30min} (B), t _{60min} (C) t _{24h} (D).....	32

Figure 13: Cellules Ag55 exposées à 100 µg/ml de toxine de Cry4Ba dans la solution Ag55 sur une période de 24h : t ₀ (A), t _{30min} (B), t _{60min} (C), t _{24h} (D).....	33
Figure 14: Cellules Ag55 exposées à 0,1 µg/ml Cyt1Aa dans la solution Ag t ₀ (A), t _{30min} (B).....	34
Figure 15: Images plus détaillées (par zoom électronique) des cellules Ag55 exposées à 0,008 µg/ml de Cyt1Aa dans la solution Ag à t ₀ (A), t _{30min} (B) et t _{60min} (C).....	34
Figure 16: Cellule Ag55 exposées à 0,002 µg/ml de Cyt1Aa dans la solution Ag à (A) t ₀ , (B) t _{60min} , (C) t _{65min} , après l'ajout de 30 µg/ml de Cry4Ba.....	35
Figure 17: Pourcentage de cellules mortes en réponse à la Cyt1Aa (0,05 à 1 µg/ml) suivant une exposition de 30 minutes.....	36
Figure 18: Réponse typique d'une cellule Ag55 à l'ajout de 0,1 µg/ml de Cyt1Aa dans la solution Ag.....	38
Figure 19: Les différents paramètres utilisés pour l'analyse des expériences de microspectrofluorométrie	39
Figure 20: Dose-réponse des cellules Ag55 à la toxine Cyt1Aa en variation de calcium intracellulaire représentée par les paramètres t _{départ} (A), t _{pic} (B) et (C) ΔR l'amplitude.. ..	40
Figure 21: ΔR atteint par les cellules en présence de 0,008 µg/ml et 0,1 µg/ml de Cyt1Aa, et la combinaison des toxines	44
Figure 22: Enregistrement d'une cellule empalée par une microélectrode et exposé à 1 µg/ml de Cyt1Aa.....	47
Figure 23: Réponse à la toxine Cyt1Aa (1 µg/ml) suivant son ajout à t _{5min}	48
Figure 24: Réponse à la toxine Cry4Aa (20 µg/ml) suivant son ajout au t _{5min}	49

Figure 25: Réponses à la toxine Cry4BaAa (22,5 µg/ml) suivant son ajout à $t_{5\text{min}}$50

Figure 26: Réponse de synergie aux toxines suivant leur ajout à $t_{5\text{min}}$52

Liste des abréviations :

Ae	solution pour <i>Aedes aegypti</i>
Ag	solution pour <i>Anopheles gambiae</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sérotype <i>israelensis</i>
EDTA	éthylène diamine tétraacétique
EGTA	éthylène glycol-bis (2-aminoéthyléther)-N,N,N,N-tétraacétate
FBS	sérum de bovin fœtal
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
kDa	kilodalton
LB-15	Leibovitz-15
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
SDS	dodécylsulfate de sodium
V-ATPase	Vacuole-type ATPase

Remerciements

J'aimerais remercier tous les gens qui ont contribué à mes recherches et à la réussite de mon mémoire.

J'aimerais, tout d'abord, remercier Jean-Louis Schwartz pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir guidé et encouragé, pour avoir été un excellent directeur de maîtrise ainsi que pour le financement de mon projet.

J'aimerais remercier Vincent Vachon pour son support, sa disponibilité constante, ses idées et ses conseils, et pour m'avoir encadré, montré plusieurs techniques, et aidé dans mon projet de maîtrise.

J'aimerais remercier Maxime Schmidt et Eva Fortea Verdejo, mes collègues de maîtrise, pour avoir été de bons amis et support moral. Nous avons réussi ensemble.

J'aimerais remercier Léna Potvin, notre chargée de projet. Tu m'as montré comment mettre de la rigueur dans mon travail, d'avoir plus confiance en moi et de passer d'étudiant à professionnel.

J'aimerais aussi remercier Karine Dubois pour m'avoir introduit au laboratoire du Dr Schwartz et Renaud Stalinski pour avoir préparé le chemin pour mon projet.

Merci à tous les étudiants qui sont venus faire un stage dans le laboratoire. Vincent Lemieux, Daline Tho, Maxime R. Schmidt, Emilie Huynh et Thomas Cauchi, Barbara Domanska. Vous êtes géniaux et de merveilleux scientifiques.

Je tiens à remercier le GÉPROM pour m'avoir bien accueilli dans son groupe, m'avoir enseigné de nouvelles techniques, et pour m'avoir fait explorer le monde des sciences en première ligne.

Merci à Michel Brunette pour avoir été toujours disponible pour m'aider avec mon appareillage électronique et à Julie Verner pour m'avoir enseigné les bonnes habitudes de laboratoire dans une salle de culture.

Je tiens à remercier Carl Lowenberger (Simon Fraser University, Burnaby, BC) pour m'avoir fourni des œufs de moustiques tout au long de ma maîtrise ; Michael Adang (University of Georgia, Athens, GA, USA) pour m'avoir envoyé les cellules Ag55, Marianne Pusztai-Carey (Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA) pour m'avoir envoyé de la toxine Cyt1Aa et Laurence Després (Université Joseph-Fournier, Grenoble, France) pour nous avoir fourni en toxine Cry.

Je tiens tout spécialement à remercier ma mère, Marie-Catherine Jean-Philippe, mon frère Carl Andrew et ma sœur Rebeckah, mon conjoint et support Guillaume Fortin et toute ma famille pour avoir été présent et m'avoir encouragé tout au long de mon parcours. Je vous aime du plus profond de mon cœur.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 *Bacillus thuringiensis* sérotype *israelensis*

1.1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie aérobie à Gram positif sans flagelle que l'on retrouve dans une variété de niches comme le sol [Bulla et al., 1980]. Bactério-insecticide grâce à ses toxines cytolytiques et formatrices de pores qui ont pour cibles l'intestin des insectes et des nématodes avec une spécificité sans précédent, sa production d'inclusions cristallines contenant ces endotoxines le distingue des autres espèces de bacilles [Ounjai et al., 2007 , Wang et al., 2008]. Contrairement aux autres bactéries du groupe de *Bacillus cereus*, groupe duquel il fait aussi partie et où l'on retrouve aussi *Bacillus anthracis*, ses corps d'inclusion parasporaux ne sont aucunement toxiques pour l'humain [Sanchis and Bourguet, 2008].

1.1.2 Sérotype *israelensis*

Bacillus thuringiensis est connu depuis un siècle, tandis que le sérovar *israelensis* (Bti) fut découvert en 1978 devenant ainsi le quatorzième sérotype de *Bacillus thuringiensis* ([Goldberg and Margalit, 1977 , Delécluse et al., 1996]. Il est aussi la première souche qui cible les larves de moustiques. Il s'attaque à plusieurs variétés de diptères. On en fait son épandage au Québec depuis des années pour contrôler les populations de simulies. De plus, le pouvoir entomocide de ses toxines contre les moustiques en fait un choix remarquable et judicieux pour le contrôle du moustique *Aedes aegypti*.

1.1.3 Le moustique *Aedes aegypti* et le Bti

Les toxines du Bti s'attaquent à différentes familles de moustiques : la Cry4Aa et la Cry4Ba ciblent principalement *Aedes* et *Anopheles* respectivement. Les toxines présentées plus haut sont hautement mortelles pour le moustique *A. aegypti*, et présentent un avantage remarquable suivant leur épandage : l'absence de résistance. Comme mentionné précédemment, plusieurs toxines de différentes familles de bacilles s'attaquent à plusieurs insectes, mais en revanche, celles-ci ne présentent pas cette singularité observée chez le sérotype *israelensis*. Nous discuterons plus en détail de ce phénomène de réduction de la résistance plus loin.

Faisant partie de l'ordre des diptères et de la famille des culicidés, le moustique *A. aegypti* se retrouve principalement dans les pays tropicaux. Cet insecte peut se nourrir du suc des plantes, mais est principalement hématophage. Ce moustique est l'un des plus grands vecteurs de maladie au monde. Il est le principal vecteur de la dengue ; il transmet aussi le chikungunya, la malaria, l'onchocercose et le virus Zika. Des millions de gens sont infectés chaque année par ce vecteur et contrôler sa population s'avère un enjeu de santé publique mondiale. Dans les pays tropicaux, le contrôle de ce moustique est primordial et, en raison du réchauffement climatique, nous observons de plus en plus un déplacement des niches du moustique vers des régions plus au nord, devenant maintenant une menace à l'extérieur des zones tropicales.

La femelle pond ses œufs en radeau à la surface des eaux stagnantes. Elle peut pondre entre 100 et 300 œufs. Il ne suffit que de 2,5 cm d'eau pour leur éclosion. Les larves peuvent survivre à la dessiccation, et ce, durant plusieurs mois ; elles ne peuvent qu'éclore dans l'eau. Suivant l'éclosion, ces larves subiront quatre stades espacés de

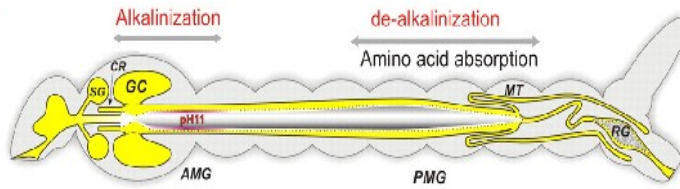
mues avant d'atteindre l'étape de métamorphose en pupe et finalement le stade imago. Les larves, contrairement à leur forme mature, sont dépourvues d'organes génitaux complets et se nourrissent principalement des particules présentes dans l'eau. Devenu adulte, le moustique est muni d'ailes et devient aérien. Chez la larve comme l'adulte, la disponibilité en nourriture influence grandement le développement : sans elle, la maturation est presque impossible chez la larve et la ponte impossible chez l'imago femelle.

Au stade adulte, le moustique se nourrit du suc des plantes et la femelle se nourrit aussi de sang animal. Le sang est utile comme source d'énergie et indispensable pour la ponte. Malgré le fait qu'elle puisse se nourrir du sang d'autres organismes, la femelle *A. aegypti* se nourrit préférentiellement de sang humain. Ce comportement particulier et inhabituel laisse croire qu'il se trouve chez l'humain des éléments plasmatiques sanguins favorables à la reproduction ou la ponte du moustique. Certaines expériences ont montré que le moustique pouvait produire une plus grande réserve d'énergie lorsque nourri d'un sang déficient en isoleucine comme le sang humain. On observe aussi une plus grande réserve de triglycérides suivant l'alimentation au sang humain, constituant important pour les insectes principalement sédentaires lorsque gravides comme *A. aegypti*. Ceci peut expliquer pourquoi ce moustique s'acharne sur les populations humaines et est un parfait candidat pour la transmission de maladies anthroponocives.

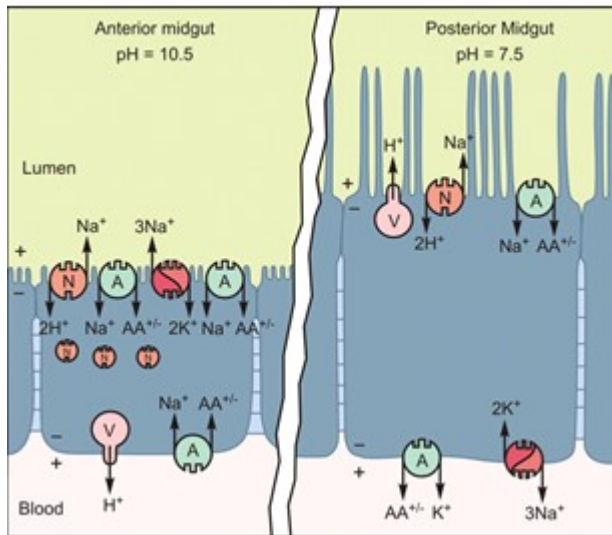
1.1.4 Physiologie de l'intestin du moustique

Chez la larve, l'intestin moyen, lieu majeur d'absorption des nutriments et de la digestion, se compose d'une simple couche de cellules épithéliales et se sépare en trois segments anatomiques : le cardia (le segment antérieur), le caecum gastrique, suivi

finalement du ventricule appelé à tort l'estomac. Le ventricule se subdivise lui aussi en deux grands segments, la partie antérieure et la partie postérieure, qui diffèrent par leur composition histologique et particulièrement par la présence de certains transporteurs ioniques, ainsi qu'une zone intermédiaire [Bernick et al., 2007]. Un autre rôle de l'intestin moyen est de contrôler la composition ionique de l'hémolymphe et le pH [Izeirovski et al., 2009 , Onken et al., 2009]. Un gradient de pH s'observe tout au long de l'intestin moyen. La partie antérieure maintient le pH de la lumière intestinale à 10,5 [Onken et al., 2009]. Ce fort pH permet de dissoudre le tanin des aliments ingérés et sera principalement dû au H^+ -V-ATPase du côté basolatéral de l'intestin de l'insecte et de NHE du côté apical [Onken et al., 2008 , Jagadeshwaran et al., 2010]. La partie postérieure de l'intestin contient des H^+ V-ATPase du côté apical de la cellule : le pH passe de 10,5 à 7,5.



A



B

Figure 1 : (A) Modèle d'intestin du moustique *A. gambiae* et (B) les transporteurs responsables de la régulation du pH du côté apical et du côté basolatéral dans la partie antérieure et postérieure de l'intestin. Image prise de Okech et al, 2008 (permission octroyée)

1.2 Les toxines du Bti

1.2.1 Les endotoxines

Les endotoxines sont des protéines contenues au sein d'une bactérie. Chez Bt, elles sont sous forme de corps d'inclusion cytoplasmiques et sont nommées δ -endotoxines. Bt produit deux familles importantes de ces endotoxines, soit les toxines Cry (pour « *crystal* », en anglais) et les toxines Cyt (pour cytolitique).

1.2.2 Les toxines Cry

La première et plus grande famille d'endotoxines est celle des Cry particulièrement connues pour leur activité létale très spécifique envers une variété de familles d'arthropodes et de nématodes [van Frankenhuyzen, 2009]. Les toxines Cry produites par Bti sont les Cry2Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa et Cry11Aa. Les toxines Cry2Ba et Cry10Aa sont moins létales que les trois autres et seront peu décrites dans ce mémoire [Ward et al., 1988 , Delécluse et al., 1996 , Ben-Dov, 2014]. La Cry4Ba et la Cry11Aa sont très toxiques pour le moustique *A. aegypti*, tandis que Cry4Aa l'est un peu moins. Cette dernière, par contre, est fortement toxique envers *Anopheles gambiae* [Angsuthanasombat et al., 1992].

Les toxines Cry se présentent sous la forme de protoxines dans les cristaux parasporaux et sont liées entre elles par des ponts disulfures [Schnepf et al., 1998]. Ceci explique pourquoi elles sont insolubles à pH neutre. Dans l'intestin du moustique, la solubilisation du cristal est provoquée par le milieu fortement alcalin retrouvé dans la lumière et qui déstabilise les ponts disulfures. Une fois solubilisée, la protoxine continue à subir d'importants changements lorsqu'elle rencontre les protéases de l'intestin de l'organisme comme la chymotrypsine. Ces enzymes clivent le polypeptide, retirant ainsi quelques acides aminés du côté N-terminal et une grande portion de la partie C-terminale qui contribuait à la stabilisation de la protéine [Schnepf et al., 1998]. Le produit issu de cette protéolyse est la toxine activée, maintenant résistante aux protéases intestinales. Les toxines Cry4Aa et Cry4Ba ont un poids moléculaire d'environ 65 kDa et celui de la Cry11Aa est de 35 kDa.

1.2.2.1 Structure tridimensionnelle

La structure tertiaire de plusieurs toxines Cry est très bien documentée. Nous connaissons celle de la Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry5B, Cry51Aa1, Cry6Aa, Cry8Ea et la parasporine-2 [Li et al., 1991 , Grochulski et al., 1995 , Galitsky et al., 2001 , Morse et al., 2001 , Boonserm et al., 2005 , Boonserm et al., 2006 , Akiba et al., 2009 , Guo et al., 2009 , Hui et al., 2012 , Evdokimov et al., 2014 , Xu et al., 2015 , Dementiev et al., 2016 , Huang et al., 2016]. Il a été observé que la structure tridimensionnelle est souvent très conservée au sein de la famille des Cry et de là il serait possible que les mécanismes d'action affectant les cellules soient semblables [Bravo et al., 2011].

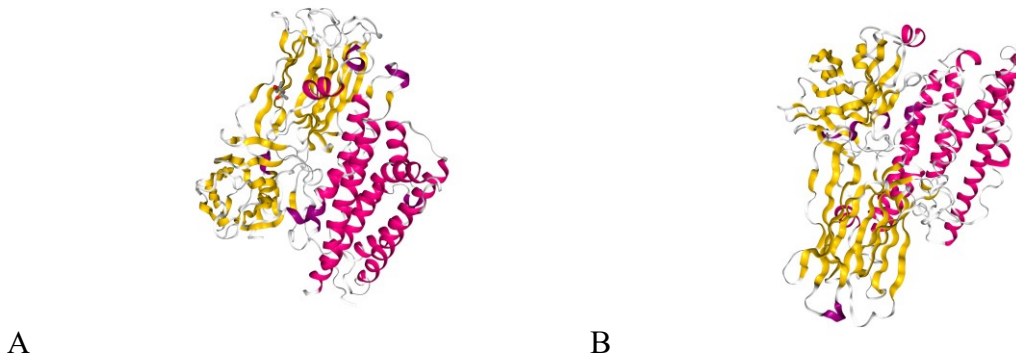


Figure 2 : Structure tridimensionnelle des toxines Cry4Aa (A) et Cry4Ba (B) (respectivement 2C9K et 4MOA)

Les toxines Cry sont pour la grande majorité constituées de blocs d'acides aminés au sein de la structure primaire ce qui explique le repliement similaire de ces protéines [Höfte and Whiteley, 1989 , Jimenez et al., 2012]. À l'exception de la Cry51Aa1 et la Cry6Aa, elles sont composées de trois domaines aux rôles distincts [Schnepf et al., 1998 , Schwartz and Laprade, 2000]. Le domaine I, constitué des acides aminés du côté N-

terminal (résidus 68 à 321 chez la Cry4Ba), possède sept hélices alpha dont une est particulièrement hydrophobe. Cette hélice, qui serait responsable de l'insertion transmembranaire, est entourée des 6 autres hélices amphipathiques antiparallèles. Ce domaine est reconnu comme étant responsable à la fois de l'insertion de la toxine dans la membrane et de la formation du pore [Schwartz and Laprade, 2000]. Le domaine II se compose de trois feuillets bêta alignés et antiparallèles formant un prisme dont l'une des faces est exposée au solvant (Figure 2). Sa séquence varie davantage d'une molécule Cry à l'autre en comparaison des autres domaines et jouerait un rôle dans la liaison de la toxine aux récepteurs membranaires, donc ce domaine serait intimement lié à la spécificité des toxines aux espèces cibles. Le domaine III, lui aussi composé de feuillets bêta antiparallèles placés en sandwich, est relié aux deux autres domaines par l'entremise de ponts hydrogènes et de liaisons hydrophobes. Ce domaine est moins bien caractérisé que les deux premiers ; toutefois, il pourrait être impliqué dans la liaison aux récepteurs, la spécificité et la stabilité du pore formé par la toxine dans la membrane [Aronson et al., 1995 , Rang et al., 1999].

1.2.2.2 Mode d'action

Le fragment protéique résultant de la solubilisation et l'activation de la protoxine va s'insérer dans la membrane suite aux liaisons faites avec des récepteurs spécifiques à sa surface [Pigott and Ellar, 2007, Likitvivanavong et al., 2011]. Les récepteurs des toxines Cry connus sont les cadhérines, les aminopeptidases N (APN) et les phosphatases alcalines (ALP), enzymes ancrées par un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) dans la membrane cellulaire, et des glycoprotéines transmembranaires nécessaires pour l'adhérence cellulaire. Ces récepteurs furent principalement étudiés chez le

lépidoptère *Maduca sexta*. Il existe aussi les transporteurs à cassettes de liaison à l'ATP, communément appelés transporteur ABC, qui sont des récepteurs aux Cry chez le lépidoptère [Baxter et al., 2011, Atsumi et al., 2012]. Chez les diptères, les cadhérines montrent une forte affinité pour les toxines Cry4Ba et Cry11Aa selon l'espèce ciblée [Hua et al., 2008, Chen et al., 2009, Park et al., 2009]. Les GPI sont aussi des récepteurs pour les toxines Cry chez le moustique principalement pour la Cry11Aa et la Cry11Ba [Zhang et al., 2008, Likitvivatanavong et al., 2009, Zhang et al., 2010]. On retrouve même deux isoformes d'APN spécifiques à *A. aegypti* liant la Cry11Aa [Chen et al., 2009]. Toutefois, le rôle exact dans l'insertion ou la toxicité de la toxine chez le moustique est très peu connu.

Il a été démontré que les toxines Cry forment des pores membranaires [Knowles and Ellar, 1987, Vachon et al., 2012]. Les étapes par lesquelles le pore se forme ne sont encore pas entièrement élucidées. Ajoutons que le rôle du récepteur dans la formation du pore est encore discutable. On sait que le domaine I seul forme des pores identiques à la toxine entière dans une bicouche lipidique en absence du récepteur [Franken et al., 1996]. Par contre, il a été proposé que le récepteur ait plutôt une fonction structurelle, facilitant l'entrée du complexe protéique dans la membrane [Bravo et al., 2011].

La toxine se lie au récepteur à l'aide du domaine II et s'insère dans la membrane avec le domaine I. Le modèle proposé suite à l'obtention de la structure atomique de la Cry3A [Li et al., 1991] présente l'hélice 5 accompagné de l'hélice 4 comme étant celles qui pénétreront la membrane lipidique laissant à la surface de la membrane le reste de la molécule [Ahmad and Ellar, 1990, Knowles, 1994, Masson et al., 1999, Schwartz and

Masson, 2000 , Aronson and Shai, 2001 , Vachon et al., 2002 , Puntheeranurak et al., 2004].

L'intégration membranaire est le point de non-retour de la toxine, une liaison irréversible [Dean et al., 1996]. Après cette étape critique, on observe la formation du pore. Toutefois, la taille des pores observés ne coïncide pas avec ce qui serait attendu d'une simple molécule [Vié et al., 2001]. Ceci nous laisse croire qu'une oligomérisation de la toxine se produit [Hodgman and Ellar, 1990 , Rang et al., 1999]. Le nombre de sous-unités retrouvées dans cette structure oligomérique reste encore inconnu. Il a été observé une structure de Cry sous forme de tétramère [Vié et al., 2001 , Puntheeranurak et al., 2004 , Groulx et al., 2011]. Il a déjà été observé en microscopie atomique que la Cry4Ba pouvait former sans l'aide de récepteur des pores sous forme d'agrégats composés de plusieurs pores, un multioligomère [Puntheeranurak et al., 2004].

Le pore enfin formé, une perte des fonctions homéostatiques de la cellule s'en suit, avec une entrée massive d'eau menant à un gonflement osmotique. Ce déséquilibre ionique cause la lyse cellulaire [Schwartz and Laprade, 2000].

1.2.3 Les toxines Cyt

La deuxième famille de toxines est celle des Cyt [Thomas and Ellar, 1983]. Les Cyt diffèrent en plusieurs points des toxines Cry.

1.2.3.1 Structure tridimensionnelle

Aussi produite par les corps de cristaux parasporaux, la toxine Cyt ne contient qu'un domaine essentiellement composé d'un feuillet bêta entouré de deux couches d'hélices alpha [Li et al., 1996 , Cohen et al., 2011]. Les hélices alpha ont une nature

plutôt amphiphilique avec une partie hydrophobe près du feuillet bêta [Cohen et al., 2008]. Le poids moléculaire de la protoxine est de 33 kDa ; après solubilisation et trypsinisation, il est de 27 kDa. In vivo, les Cyt ciblent les simules et les moustiques. Toutefois, in vitro, les Cyt peuvent être toxiques pour une variété de cellules, dont des cellules de mammifères comme les globules rouges [Thomas and Ellar, 1983 , Chilcott and Ellar, 1988 , Knowles et al., 1989 , Xie et al., 2005].



Figure 3: Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1Aa (3RON)

1.2.3.2 Mode d'action

Le mécanisme par lequel la toxine Cyt tue les cellules du moustique ne fait pas l'unanimité. Des expériences in vivo sur des membranes lipidiques ont montré que la toxine n'a pas besoin de récepteur pour agir, mais plutôt qu'elle interagirait spécifiquement avec les lipides de la membrane [Butko et al., 1996]. En fait, les éléments cruciaux à la liaison du polypeptide dépendent de la nature des têtes polaires des lipides, soit la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la sphingomyéline, et leur interaction avec les acides gras insaturés de la membrane cellulaire [Thomas and Ellar,

1983 , Butko, 2003]. Une plus grande quantité de phospholipides insaturés chez les diptères pourrait expliquer cette forte spécificité *in vivo*.

Deux modèles possibles mais toujours discutés décrivent les étapes suivantes du mode d'action de la Cyt. Le premier implique la formation de canaux sélectifs aux cations, suite à l'insertion dans la membrane des feuillets bêta consécutive à l'éloignement des deux hélices alpha [Promdonkoy and Ellar, 2000 , Promdonkoy and Ellar, 2003]. Une oligomérisation s'en suit pour former un pore dans la membrane ; ce pore provoque un gonflement osmotique colloïdal causé par une entrée d'eau, menant à la lyse de la cellule [Li et al., 1996 , Promdonkoy and Ellar, 2000 , Li et al., 2001]. Ceci rappelle le mécanisme des toxines Cry. Ce mécanisme est cohérent avec les résultats d'expériences en bicouches lipidiques où la Cyt formait des canaux ioniques sélectifs au potassium [Ward et al., 1988 , Knowles et al., 1989]. Le deuxième modèle propose que la toxine, après agrégation, interagisse avec la membrane plasmique comme un détergent, ce qui déstabilise la membrane, cause une fuite du contenu cellulaire et une perte de l'intégrité de la cellule [Butko et al., 1996 , Butko, 2003 , Manceva et al., 2004]. Cette idée est soutenue par le comportement en tout ou rien, c'est-à-dire que la toxine ne fait pas qu'endommager la cellule mais finit par la tuer, ainsi que par la présence d'agrégats à faible pH, 4.5, à la membrane lipidique de vésicules lipidiques [Butko, 2003 , Manceva et al., 2004].

Les deux modèles ne s'excluent pas l'un de l'autre. Il est possible que selon la concentration de toxine ou le pH, la toxine se comporte plus selon un modèle que l'autre dû à une différente conformation sous ces différentes conditions. Par exemple, une expérience à pH 9,5 en bicouche lipidique a clairement montré que la Cyt1Aa formait des

pores, voire même des pores sélectifs, ici au potassium [Butko, 2003]. Une autre étude a montré des perforations à la membrane de liposomes lorsqu'ils sont exposés à une faible dose de Cyt1Aa, et une détérioration de la membrane à plus forte dose [Manceva et al., 2004].

1.3 Synergie

Il a été observé in vivo que l'utilisation des toxines du Bti provoquait un plus fort taux de mortalité, lorsque combinées. En fait, lorsque les toxines ont été appliquées individuellement, aucune des toxines ne dépassait plus de cinq pour cent du pouvoir létal des corps parasporaux contenant toutes les toxines [Wu and Chang, 1985 , Chilcott and Ellar, 1988].

1.3.1 Les synergies in vivo

Plusieurs laboratoires se sont intéressés à la synergie existant entre les toxines du Bti ; on observe un taux de mortalité significativement plus élevé lorsqu'on applique ensemble toutes les toxines que l'effet additif des toxines administrées seules [Wu and Chang, 1985, Chilcott and Ellar, 1988 , Angsuthanasombat et al., 1992 , Wu et al., 1994]. Bien que chaque toxine cible et tue une espèce de diptère, un haut niveau de toxicité n'est atteignable qu'en présence des autres toxines. Il a même été montré que la Cry4Ba chez *Culex quinquefasciatus*, où on observe une faible activité létale, permettait une toxicité cinq fois plus forte de la Cry4Aa qui cible cette espèce [Angsuthanasombat et al., 1992 , Poncet et al., 1995]. Il existe aussi de la synergie entre la toxine Cry4Aa et la Cry11Aa, un peu plus faible que la précédente, et un effet un peu plus qu'additif entre la Cry11Aa et Cry4Ba [Poncet et al., 1995].

Bien que la Cyt soit nettement moins toxique pour les larves exposées et que son absence dans le cristal ne diminue pas la forte synergie existant entre les autres toxines du Bti [Delécluse et al., 1991], la toxine Cyt administrée avec chacune des toxines Cry individuellement présente un effet synergique sur la mortalité des larves [Wu and Chang, 1985 , Chilcott and Ellar, 1988 , Wu et al., 1994]. Elle augmente de 5 à 20 fois l'effet de chaque toxine Cry. Toutefois, très peu de données expérimentales expliquent le fonctionnement de cette synergie.

1.3.2 Le rôle de la Cyt dans la synergie

Quelques hypothèses expliquant la synergie observée en présence de la toxine Cyt ont été émises. On croit que la Cyt, comme mentionné ci-haut, contrairement aux toxines Cry, interagit avec les phospholipides de la membrane cellulaire et jouerait le rôle de récepteur supplémentaire aux toxines Cry suivant son insertion dans la membrane ([Butko et al., 1997 , Butko, 2003]. Des expériences récentes ont démontré une interaction intermoléculaire entre les Cry et les Cyt [Lailak et al., 2013], où l'on a muté des boucles bêta dans le domaine de reconnaissance du récepteur de la Cry4B, provoquant une perte de l'activité lytique qui fut restaurée par la Cyt2Aa. Ceci est en accord avec l'hypothèse que la Cyt serait un récepteur aux Cry. Le Bti serait donc la seule espèce bactérienne entomopathogénique à fournir son propre récepteur fonctionnel favorisant ainsi la mortalité des espèces cibles [Elleuch et al., 2015]. De plus, on a révélé la possibilité que la Cyt favorise aussi l'oligomérisation de la toxine Cry4Ba rendant l'effet plus rapide et efficace. On a aussi observé de l'interaction entre la Cyt1A et la Cry2Aa, qui cible les lépidoptères, qui n'a rendu que deux fois plus mortelle la toxine Cyt chez le moustique *Culex* [Castaneda-Ramirez et al., 2013]. Nous pouvons penser que

la toxine Cyt rendue à la membrane cellulaire augmente l'exposition d'un récepteur à la Cry. Ou encore, que l'interaction de la Cry avec des protéines membranaires augmente la toxicité de la Cyt, et même que les lésions cellulaires formées par chacune des toxines ensemble provoquent la lyse cellulaire ce qu'elles ne peuvent produire seules, sauf à de plus fortes concentrations [Bravo et al., 2011].

1.3.3 Absence de résistance

Un autre aspect majeur et particulièrement intéressant des toxines du Bti est l'absence de résistance chez l'insecte cible. La résistance se produit lorsqu'une forte exposition à un insecticide crée une pression de sélection sur l'espèce cible. L'insecte, suivant plusieurs générations, devient insensible à l'agent administré. C'est un phénomène grandement observé dans la nature et est même attendu de la part des biologistes [Wirth et al., 2000]. Des expériences où le spécimen cible était soumis à une des toxines démontrent que l'insecte développe une résistance à cette toxine. Par exemple, une étude chez Wirth [Georghiou and Wirth, 1997], montre que le moustique, suivant une forte exposition à la Cry11Ba, développe un niveau de résistance 1000 fois supérieur après 28 générations. C'est d'ailleurs le plus haut niveau de résistance observé. Les autres toxines, lorsqu'administrées seules, montraient une plus faible résistance, mais on note que la résistance est inversement corrélée au nombre de toxines utilisées. On croit que ces toxines interagissent avec différents récepteurs à la membrane, ce qui rend la désensibilisation beaucoup plus complexe pour la larve. Toutefois, l'utilisation massive des cristaux de Bti ne mène pas au développement de résistance chez les insectes affectés. On note que la combinaison des trois Cry peut retarder l'apparition de

résistance, mais en présence de Cyt l'abolition de la résistance est nettement plus efficace [Elleuch et al., 2015].

1.3.4 Physiologie de la synergie

Nous savons qu'il existe in vitro une synergie flagrante sur le taux de mortalité cellulaire entre ces entomotoxines de Bti [Chilcott and Ellar, 1988]. Toutefois, nous n'avons pas de données physiologiques expliquant cette synergie : comment la cellule répond-elle à ces toxines ? Des expériences de viabilité, de microspectrofluorométrie et d'électrophysiologie aideraient à mieux comprendre si cette synergie a lieu au niveau membranaire, cellulaire ou les deux. Elles aideraient aussi à déterminer ce qui gouverne cette synergie. Ces données fonctionnelles pourraient suggérer de nouvelles pistes pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ces protéines tuent leurs cellules cibles et par lesquels celles-ci répondent à leur attaque.

1.4 Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est que les toxines du Bti ont un impact notable individuellement ou en combinaison sur le potentiel membranaire et sur la concentration du calcium intracellulaire des cellules épithéliales de l'intestin moyen postérieur du moustique *A. aegypti* ainsi que sur les cellules de la lignée Ag55 de *A. gambiae*. Des expériences sur les Ag55 utilisant la toxine Cry19 ou les toxines binaires du *Lysinibacillus sphaericus* ont montré que ces cellules sont sensibles aux toxines du Bt [Hire et al, 2015]. Les toxines, en créant un pore à la membrane, selon la taille, vont permettre le passage d'ions de part et d'autre de la membrane, déstabilisant ainsi le potentiel membranaire et les

concentrations ioniques intracellulaires dont le calcium. Dans le cas de la toxine Cyt, aussi connue pour avoir un effet détergent, les fuites de calcium seront détectables durant nos expériences.

Nos objectifs sont les suivants :

- 1) Obtenir un modèle fonctionnel d'intestin d'*A. aegypti* avec un milieu d'incubation fiable.
- 2) Observer les effets électrophysiologiques de chacune des toxines et leurs combinaisons sur le potentiel membranaire intestinal mesuré par microélectrodes.
- 3) Déterminer un protocole de dissociation cellulaire de l'intestin de moustique et établir un protocole efficace de charge de la sonde Fura-2.
- 4) Effectuer des expériences de microspectrofluorométrie ainsi que de viabilité avec les cellules Ag55 et les cellules intestinales dissociées pour déterminer les effets de chacune des toxines ou de leurs combinaisons.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

2.1 Électrophysiologie

2.1.1 Préparation du spécimen

Les œufs de moustique *A. aegypti* éclosent dans l'eau du robinet qui est resté 24 h sur le comptoir à la température de la pièce pour faire évacuer le chlore retrouvé dans les eaux montréalaises et empêchant le développement de l'insecte. Les larves croissent entre 7 et 10 jours, jusqu'à ce qu'elles aient une taille disséquable, soit au niveau larvaire avant la dernière mue vers le stade de pupa. La larve, prise dans une bulle d'eau dans une pipette de transfert est donc déposée dans un pétri dont la base est recouverte d'agar gélatinisé et qui est lui-même placé sur la glace pour permettre l'anesthésie de la larve. Celle-ci est ensuite, à l'aide d'une aiguille très mince, fixée par sa queue au pétri et, à l'aide de micropince, décapitée et vidée de son contenu intestinal pour ensuite ne conserver que l'intestin.

L'intestin fraîchement isolé est coupé transversalement pour n'en conserver que la partie postérieure. Cette coupe provoque un repliement des deux extrémités donnant accès à la face apicale des cellules épithéliales. Le tissu est placé aussitôt dans le bain du montage contenant déjà la solution physiologique (solution Ae) basée sur l'hémolymphe du moustique *A.aegypti* en mmol l⁻¹: NaCl, 42,5; KCl, 3; MgSO₄, 0,6; CaCl₂, 5; NaHCO₃, 5; acide succinique, 5; acide malique, 5; L-proline, 5; L-glutamine, 9,1; L-histidine, 8,7; L-arginine, 3,3; glucose, 10; Hepes, 25 (148 mOsm). Le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH. Préalablement à son utilisation, de l'oxygène a été ajouté vigoureusement par pression dans cette solution pendant environ 30 minutes. L'intestin est ensuite aspiré

presque totalement dans une pipette de verre étirée à cet effet et une cellule exposée à son extrémité est empalée par une microélectrode remplie d'une solution de KCl 3M. La résistance de la microélectrode varie entre 20 et 100 M Ω . Une expérience peut avoir lieu lorsque la valeur de potentiel mesuré est d'au moins 20 mV en valeur absolue et stable durant au moins 5 minutes [Peyronnet et al, 1997]. Le potentiel est amplifié par un amplificateur (WPI, modèle M-707, Hemden, CT) et observé grâce à un oscilloscope (Kikusui Electronics, Yokohama, Japon) et enregistré sur le programme Axoscope du logiciel pClamp (Axon instruments, version 10.3, Cheshire, CT). Les cellules sont perfusées par de la solution Ae fraîche. La perfusion est arrêtée et le milieu est remplacé par une solution Ae contenant la ou les concentrations désirées de toxines.

2.2 Préparations cellulaires

2.2.1 Lignée cellulaire

Les expériences ont été faites sur une lignée cellulaire Ag55 de *A. gambiae*. Ce sont des cellules adhérentes immortelles sensibles aux toxines du Bt qui ont été cultivées dans des flacons plats ventilés de 25 cm³ contenant 10 ml du milieu de culture Leibovitz-15 (L-15) auquel ont été ajoutés 10 % de sérum de bovin fœtal inactivé et 1 % d'un mélange de pénicilline et streptomycine. Les flacons sont placés dans un incubateur à 28 °C en absence de CO₂. Les cellules Ag55 ont aussi été cultivées dans des plaques à 96 puits de 200 μ l à base plate et transparente ou sur des lamelles circulaires de verre de 25 mm de diamètre ensuite placées dans un pétri et submergées de milieu de culture pour les expériences de viabilité par colorimétrie et de microspectrofluométrie, respectivement. Préalablement à ces deux types d'expériences, les cellules sont mises dans une solution

physiologique (solution Ag) faite en laboratoire contenant en mmol l⁻¹ : NaCl, 137,9; KCl, 5,3; MgCl₂, 0,98; MgSO₄, 0,81; CaCl₂, 1,26; D-galactose, 5,0; HEPES, 10; sucrose, 8g/l. La solution Ag est de 319 mOsm et à pH 7,6 ajusté avec du HCl.

2.2.2 Cellules dissociées

L'intestin est isolé suivant le même protocole que décrit en 2.1.1. Le tissu est ensuite placé durant 5 minutes dans la solution Ae modifiée, ne contenant ni Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ et en ajoutant 5 mM de EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) et de la trypsine (0,05%). Le tissu est ensuite fragmenté délicatement à l'aide de microciseaux et de micropinces. Les cellules sont rincées très délicatement, à l'aide d'une pipette, par la solution Ae standard. On les laisse ensuite se déposer à la surface de lamelle circulaire de 25 mm recouverte de poly-D-lysine pour faciliter leur adhésion.

2.3 Viabilité cellulaire

2.3.1 Bleu de trypan

Suivant le protocole décrit en 2.2.2, les cellules dissociées et collées sur lamelle sont traitées en ajoutant 10 µl d'une solution à 0,4% de bleu de trypan par 100 µl de solution Ae. Les cellules intactes restées blanches et les cellules endommagées incorporant le bleu ont été comptées par observation microscopique.

2.3.2 Observation microscopique

Les cellules ont été observées à un grossissement de 125 pour les cellules Ag55 et de 200 pour les cellules intestinales dissociées. Les photos ont été prises par une caméra Point Grey (GS3-U3-14S5M-C, Richmond, BC) installée sur un microscope Olympus inversé (Tokyo, Japon)

2.3.3 Colorimétrie à plaque multipuits

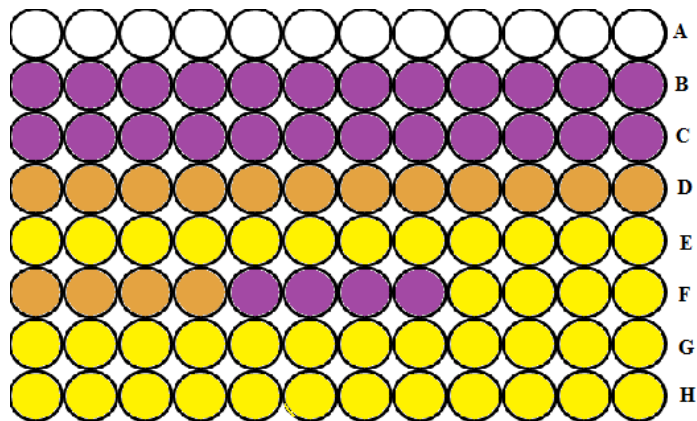


Figure 4 : Modèle de plaque multipuits pour expérience de colorimétrie, après l'ajout de l'agent MTT suivant l'exposition des cellules à une ou plusieurs toxines. A) rangée sans milieu ni cellules (vide), blanche; B) rangée de cellules dans la solution Ag sans toxine, violet ; C) rangée de cellules exposées à Cry4Ba par exemple (toxine sans effet sur les cellules), violet ; D) Rangée de cellules exposées à une faible dose de Cyt1Aa, orange ; E) cellules exposées à la Cyt1Aa à forte dose, jaune ; F) cellules exposées à Cyt1Aa en combinaison avec Cry4Ba, quatre puits pour chaque concentration utilisée, différentes couleurs selon la réaction ; G) ligne de cellules exposées à un fort agent létal (0,25% de SDS), jaune ; H) ligne de solution Ag sans cellules, jaune.

Les cellules Ag55 dans la solution Ag sont exposées aux doses souhaitées de toxines dans les puits durant un temps d'incubation prédéterminé. Le milieu est ensuite rincé et on y ajoute 100 μ l de solution Ag contenant 10 μ l de l'agent colorimétrique MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tétrazolium, préalablement dissout dans une solution tampon phosphate salin à 2 μ g/ml. Le tétrazolium,

de couleur jaune, est converti dans une réaction non réversible par les agents réducteurs des cellules vivantes en une autre molécule nommée formazan, dont la couleur est violacée. La plaque est placée deux heures dans l'incubateur à 28 °C pour maximiser la conversion. Les cristaux de formazan sont solubilisés par l'ajout dans chaque puits de 100 µl d'un mélange d'isopropanol avec 0,04 N HCl. La mesure d'absorbance se fait dans un lecteur de plaque Infinite F200 TECAN (Durham, NC) à la longueur d'onde de 560 nm. Dans la figure 3, le modèle de plaque montre, après le temps d'incubation au tétrazolium, des rangées de cellules en absence de toxine, ou sur lesquelles les toxines n'ont eu aucun effet (en violet) ; des rangées pour lesquelles la toxine a tué une partie des cellules (dans les tons d'orange selon la toxicité); des rangées où les cellules sont entièrement mortes ou carrément absentes (en jaune).

2.4 Microspectrofluorométrie

2.4.1 Techniques et appareils

La concentration intracellulaire de calcium dans une ou deux cellules isolées a été déterminée en utilisant la sonde Fura-2 (Thermo Fisher, Waltham, MA) et un microscope inversé Olympus IMT-2 couplé à un spectrophotomètre PTI (Photon Technology International, Birmingham, NJ). Le PTI possède une lampe au xénon et un objectif Nikon 40x Néofluor. Les longueurs d'onde d'excitation pour ces expériences sont fixées à 340 et 380 nm, avec un échantillonnage à toutes les secondes. Les fentes d'entrée et de sortie du monochromateur sont réglées à 1,25 mm. L'émission est obtenue à 505 nm avec un filtre passe-bande 500FS10 (Andover Corporation, Salem, NH) et le détecteur est en mode compteur de photons. Les données sont acquises et analysées par

ordinateur grâce au logiciel Félix, version 4, de PTI (Photon Technologies). L'augmentation du Fura sera interprétée comme une augmentation intracellulaire du calcium libre dans la cellule. Il est important de discerner les fuites de Fura d'une chute de calcium intracellulaire à l'aide d'observation au microscope de l'état de la cellule exposée.

2.4.2 Charge des cellules Ag55

Les cellules sont cultivées sur des lamelles pendant deux jours comme mentionné plus haut. Les lamelles sont rincées avec la solution Ag et chargées durant 45 min avec 7,5 μM du dérivé acétoxyméthylester du Fura-2 (Fura-2 AM) et 4 mM de probénécide afin d'inhiber le relargage du Fura à l'extérieur des cellules par les transporteurs d'anions organiques. La lamelle est rincée trois fois avec la solution Ag avec de la probénécide, sans quoi la sonde va fuir lentement de la cellule. Une fuite d'ions est due, en présence de probénécide, principalement par la création de pore ou des perturbations de la membrane. Ensuite, les lamelles sont placées sur la platine du microscope dans une chambre de perfusion remplie de 1 ml de la solution Ag. Lors des expériences en absence de Ca^{++} , celui-ci est remplacé par 10 mM d'EGTA (éthylène glycol-bis (2-aminoéthyléther)-N,N,N,N-tétraacétate), un puissant chélateur du calcium. Les cellules sélectionnées pour ces expériences sont celles dont la forme est semi-arrondie, c'est-à-dire des cellules qui sont ni parfaitement rondes, souvent indicatives d'une mort imminente, ou complètement allongées pouvant soit communiquer avec d'autres cellules via leurs pseudopodes ou être en phase de différenciation.

2.4.3 Charge des cellules intestinale dissociées

Les cellules dissociées collées à leur lamelle sont directement chargées dans la chambre de perfusion durant 30 min au moyen de la solution Ae contenant 0,5 μ M de Fura-2 AM, 2,5 mM de probénicid, qui bloque les transports d'anions organiques dans la membrane qui expulseraient la sonde, et 0,1 % de pluronique E-127 qui facilite l'entrée du Fura-2 AM dans les cellules en rendant la membrane perméable. Les cellules sont ensuite rincées délicatement avec la solution Ae fraîche et incubées pendant 30 min pour assurer la conversion du Fura-2 AM en Fura piégé intracellulairement. Elles sont rincées à nouveau avant le début de la mesure de fluorescence. Les cellules sélectionnées pour ces expériences sont celles dont on distingue clairement à leur surface des microvillosités.

2.4.4 Présentation des résultats

Les valeurs présentées dans les figures et les tableaux sont des moyennes des expériences \pm les erreurs-type et sont représentatives d'au moins trois expériences.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Viabilité cellulaire

Dans le but d'étudier les changements morphologiques des cellules en réponse aux toxines, des expériences de viabilité sur les cellules dissociées d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles gambiae* (Ag55) ont été effectuées. Dans un premier temps, une étude qualitative a été faite par microscopie pour les deux types de cellules, puis des tests au bleu de trypan pour les cellules fraîchement disséquées de l'intestin du moustique, ainsi que des tests en MTT sur la lignée cellulaire Ag55. Les expériences avec les cellules dissociées sont préliminaires et très novatrices puisque ce type d'expériences n'a jamais été fait sur des cellules directement isolées de l'intestin du moustique vivant.

3.1.1 Microscopie

3.1.1.1 Cellules dissociées

Afin d'étudier la réponse calcique des cellules isolées à parti de l'intestin du moustique *A. aegypti* et de les observer au microscope, il a fallu mettre au point la technique de dissociation de cet organe. Des tests au trypan bleu ont révélé que 20 % (n = 3) des cellules dissociées sont encore vivantes. Toutefois, l'adhérence des cellules à la lamelle est faible et les cellules se déplacent très facilement au moindre courant. Malgré cette difficulté, quelques observations purent être effectuées. Après dissociation, on trouve soit des cellules isolées ou en petit groupe (Figure 5 et Figure 6). On observe la présence de microvillosités, qui sont caractéristiques des cellules de la membrane à bordure en brosse. La taille des cellules présentant des microvillosités varie beaucoup.

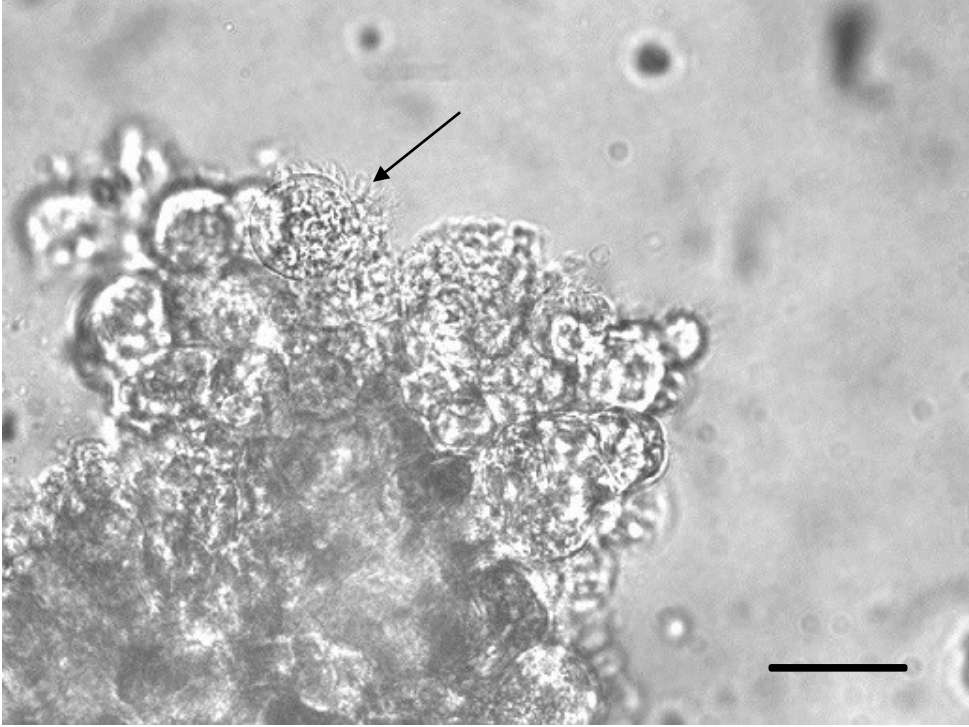


Figure 5: Groupe de cellules épithéliales dissociées de l'intestin de larve de *A. aegypti* observées dans la solution Ae. La flèche indique les microvillosités. La barre représente 10 μm . Objectif 40 x.

Il a cependant été noté que la majorité des cellules ne présentent pas de membrane à bordure en brosse et que leur contenu intracellulaire, comme les organelles, est peu visible (Figure 6 et Figure 7).

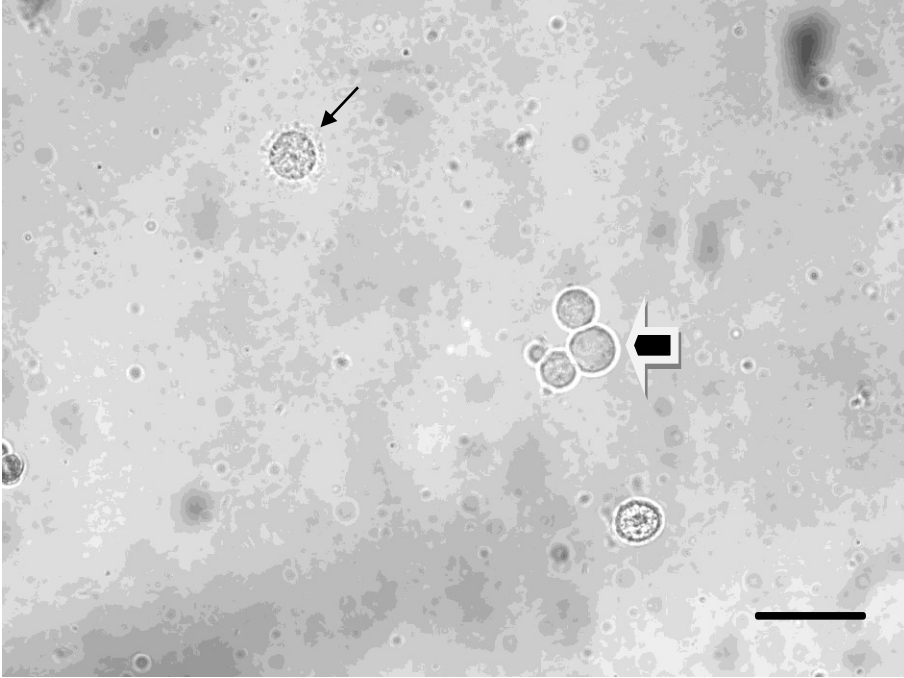


Figure 6: Groupe de cellules épithéliales dissociées du moustique *A. aegypti* observées dans la solution Ae. On observe deux types cellulaires. Des cellules rondes présentant des microvillosités à leur surface et au contenu intracellulaire bien visible comme indiqué par la flèche ; des cellules rondes sans microvillosités et dont le contenu cellulaire est peu visible comme indiqué par la grosse flèche. La barre représente 10 μm . Objectif 40 x.

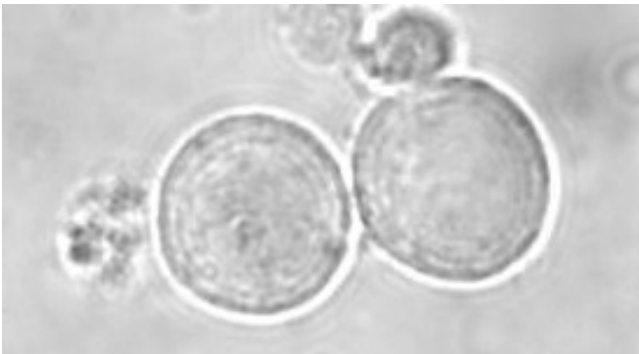


Figure 7: Image plus détaillée (par zoom électronique) de deux cellules épithéliales rondes sans villosités, représentatives de la majorité des cellules observées suivant la dissociation. Objectif 10x.

On a testé les toxines Cry4Aa et Cry4Ba sur les deux types de cellules dissociées de l'intestin. La dose de 25 µg/ml, relativement élevée, a été sélectionnée à partir de la littérature. Même à cette forte dose, les deux toxines ont peu d'effet sur la morphologie et l'intégrité des cellules (Figure 7 et Figure 8).

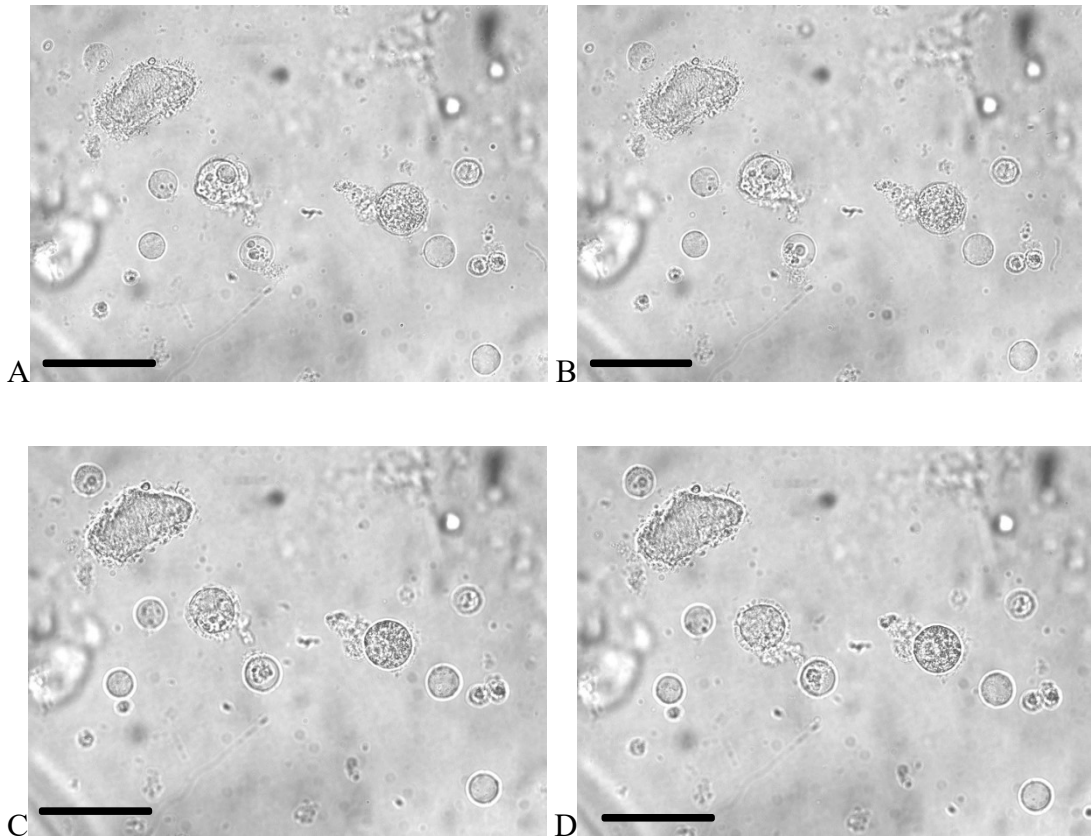


Figure 8: Groupe de cellules dissociées de l'intestin de *A. aegypti* exposées à 25 µg/ml de Cry4Aa dans la solution Ae, à t_0 (A), $t_{5\text{min}}$ (B), $t_{10\text{min}}$ (C) et $t_{60\text{min}}$ (D). La barre représente 20 µm. Objectif 10x.

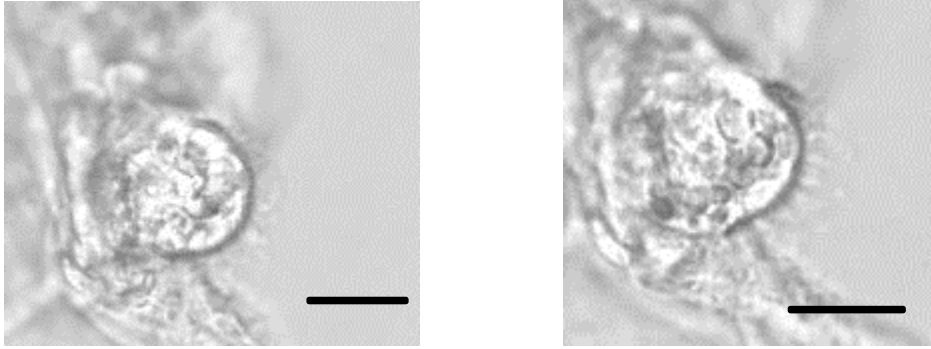


Figure 9: Image plus détaillée (par zoom électronique) d'une cellule dissociée de l'intestin de larve de *A. aegypti* exposée à 25 $\mu\text{g/ml}$ de Cry4Ba dans la solution Ae à t_0 (A) et à $t_{30\text{min}}$ (B). La barre représente 10 μm . Objectif 40x.

La Cyt1Aa, à une dose supramaximale selon la littérature, est sans effet sur les cellules dissociées épithéliales de l'intestin du moustique (non illustré). Toutefois, lorsque la Cyt1Aa et le Cry4Ba furent combinées aux mêmes concentrations que dans les expériences précédentes, on peut voir que plusieurs cellules perdent leur membrane cellulaire ou qu'elles deviennent plus granuleuses (Figure 10). L'autre type de combinaison, Cry4Aa et Cyt1Aa, n'a pu être testée en raison des difficultés d'adhérence des cellules aux lamelles en raison de l'agent recouvrant ces lamelles.

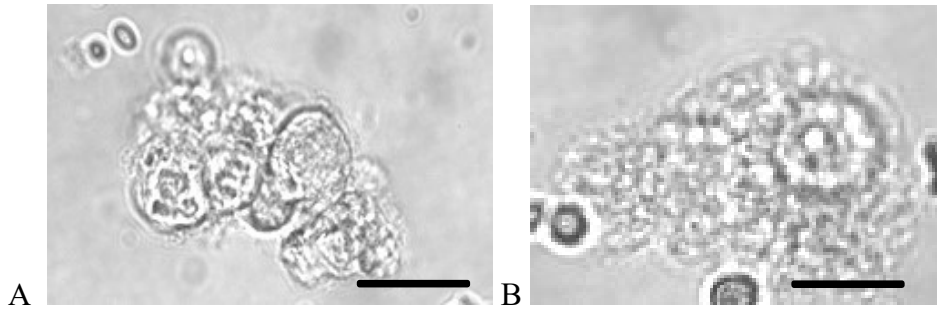


Figure 10: Groupe de cellules dissociées de l'intestin isolé de *A. aegypti* exposé à 25 µg/ml de Cry4Ba et 1 µg/ml de Cyt1Aa dans la solution Ae à t_0 (A) et $t_{20\text{min}}$ (B). La barre représente 10 µm. Objectif 40x.

3.1.1.2 Cellules Ag55

La capacité des toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cyt1Aa à endommager les cellules Ag55 a été examinée à l'aide d'observations au microscope. Ces cellules, dont l'origine anatomique est inconnue, ont été développées par Pudney et al, selon notre observation, présentent trois types de morphologies : allongées, rondes ou arrondies. Lorsque ces cellules sont soumises à un stress ou commencent à mourir, elles gonflent, s'arrondissent ou perdent leur intégrité cellulaire [Pudney et al., 1979]. On observe des débris cellulaires autour d'elles. Les cellules non exposées aux toxines et dont le milieu de culture (LB-15) est remplacé par la solution Ag restent pour la grande majorité vivantes et intactes avec une morphologie typique de ces cellules (Figure 11).

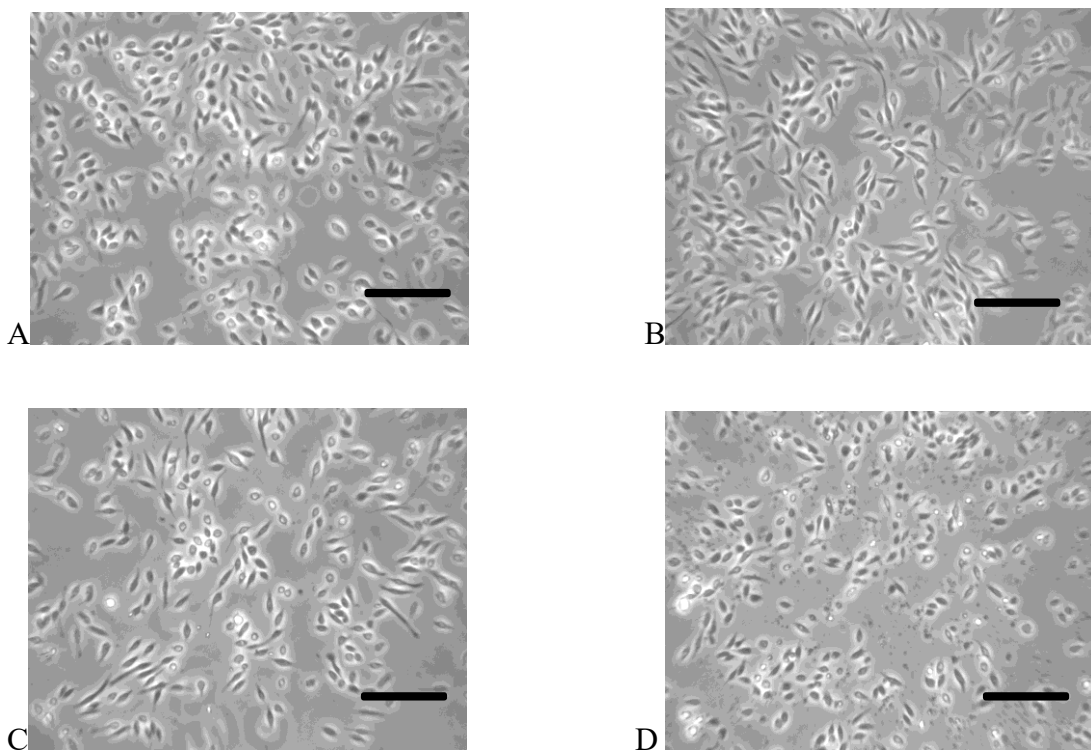


Figure 11 : Cellules Ag55 dans la solution Ag sans toxine pendant 24 h au t_0 (A), $t_{30\text{min}}$ (B), $t_{60\text{min}}$ (C) et $t_{24\text{h}}$ (D). La barre représente 20 μm . Objectif 10x.

Les expériences avec les toxines Cry sont faites à 100 $\mu\text{g/ml}$, une dose supramaximale compte tenu du fait que les Ag55 ne sont probablement pas des cellules intestinales.

Les cellules ont très peu répondu à la toxine Cry4Aa comme le montre la figure 12. On observe, toutefois, après une trentaine de minutes qu'il reste nettement moins de cellules, et qu'il y a des débris cellulaires après 24h. Mais, on peut aussi voir que certaines cellules, même après une heure d'exposition à la toxine, n'ont pas changé de morphologie.

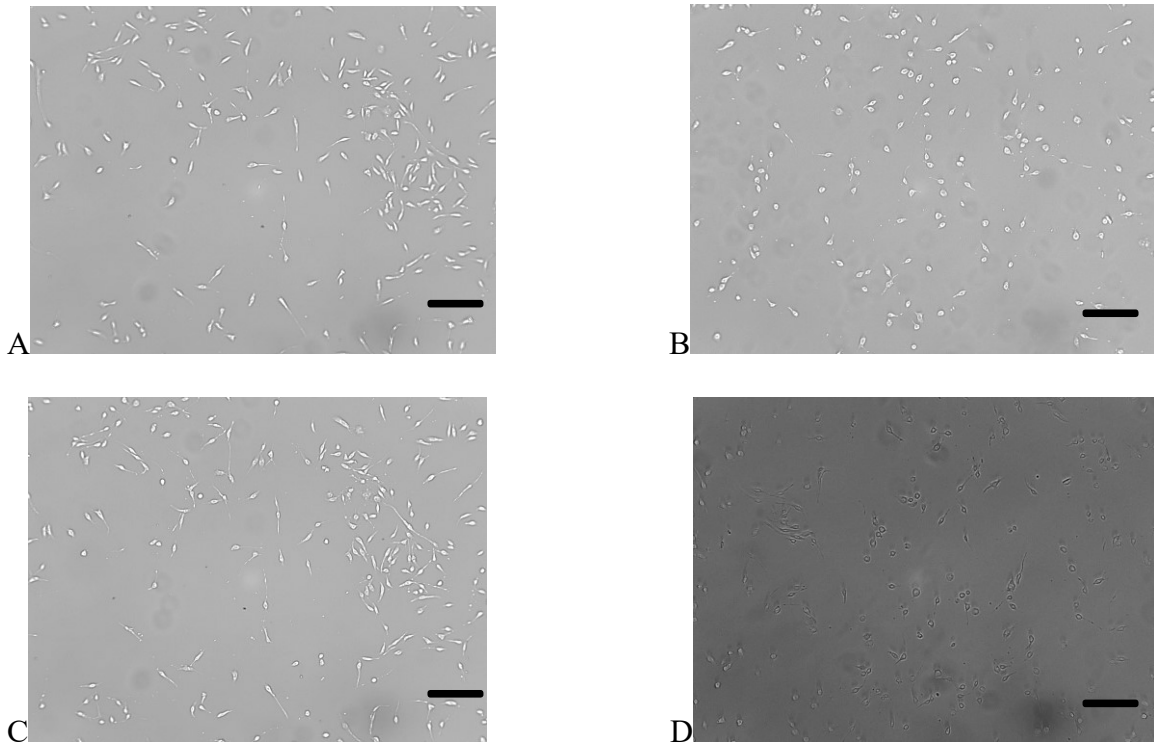


Figure 12 : Cellules Ag55 exposées à 100 µg/ml de toxine de Cry4Aa dans la solution Ag sur une période de 24h : t₀ (**A**), t_{30min} (**B**), t_{60min} (**C**) t_{24h} (**D**). La barre représente 20 µm. Objectif 10x.

À la même dose, Cry4Ba a un effet plus fort sur les cellules Ag55 comme le montre la figure 13. Toutefois, de plus faibles doses des toxines Cry4Ba et Cyt1Aa (25 µg/ml et 1 µg/ml) ont été sans effet sur les cellules (non illustré).

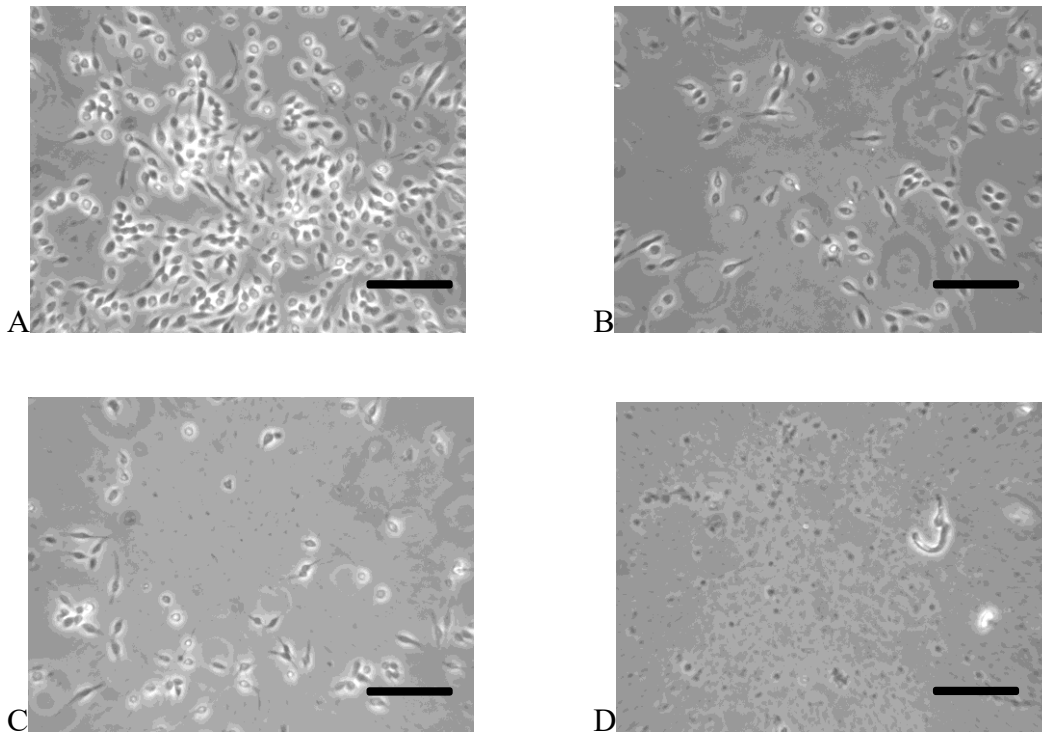


Figure 13 : Cellules Ag55 exposées à 100 µg/ml de toxine de Cry4Ba dans la solution Ag55 sur une période de 24h : t₀ (A), t_{30min} (B), t_{60min} (C), t_{24h} (D). La barre représente 20 µm. Objectif 25x.

Par contre, on a observé que la Cyt1Aa affecte les cellules Ag55 à des doses bien plus faibles. Une concentration de 0,1 µg/ml endommage l'ensemble des cellules et provoque la mort de certaines suivant une exposition de 30 minutes (Figure 14). Il ne reste que peu de cellules, on voit beaucoup de débris cellulaires et les cellules restantes sont gonflées et semblent endommagées.

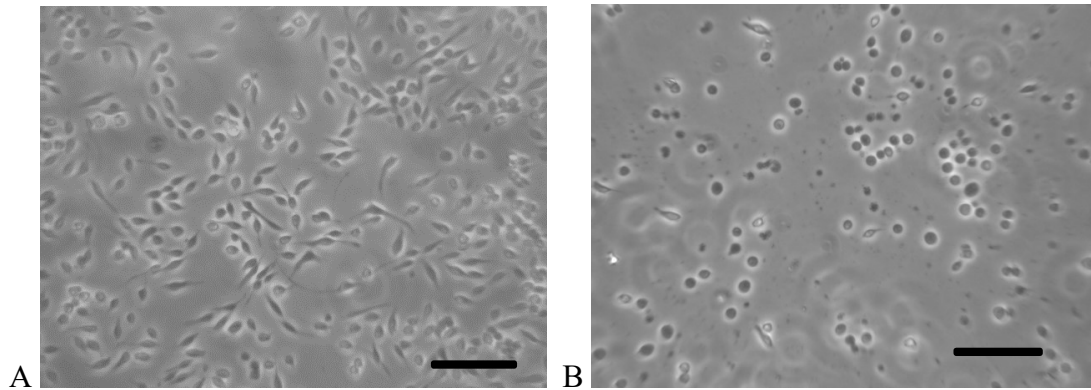


Figure 14: Cellules Ag55 exposées à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Cyt1Aa dans la solution Ag à t_0 (A), $t_{30\text{min}}$ (B). La barre représente 20 μm . Objectif 25x.

Dans le but de déterminer la plus faible dose létale et d'y observer les étapes morphologiques traversées par les cellules avant la lyse, des expériences à une très faible concentration, soit 0,008 $\mu\text{g/ml}$, furent effectuées comme le montre la figure 15. On observe dans cette figure que quelques cellules perdent leur intégrité cellulaire après 60 min d'exposition (comme montré par les flèches).

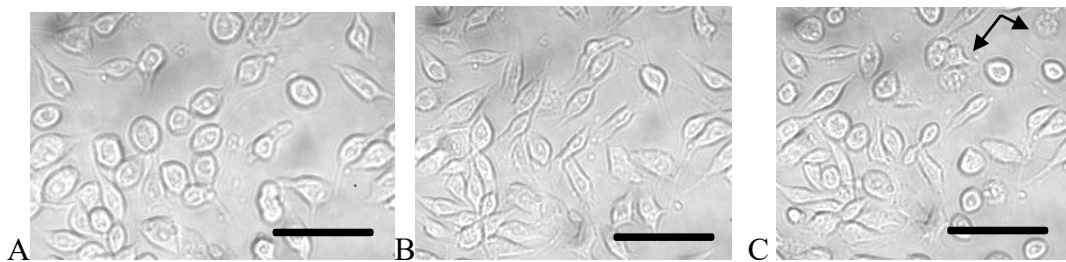


Figure 15: Images plus détaillées (par zoom électronique) des cellules Ag55 exposées à 0,008 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa dans la solution Ag à t_0 (A), $t_{30\text{min}}$ (B) et $t_{60\text{min}}$ (C). La figure C montre aussi des cellules ayant perdu leur intégrité cellulaire. La barre représente 10 μm . Objectif 40x.

À une dose plus faible (0,002 $\mu\text{g/ml}$), la Cyt1Aa n'a pas d'effet visible sur les Ag55 après 60 minutes d'exposition (Figure 16 **B**). Par contre, l'ajout de 30 $\mu\text{g/ml}$ de Cry4Ba déclenche dans les minutes qui suivent le gonflement de certaines cellules et la lyse de plusieurs autres (Figure 16 **C**). Ceci semble indiquer un effet synergique des deux toxines.

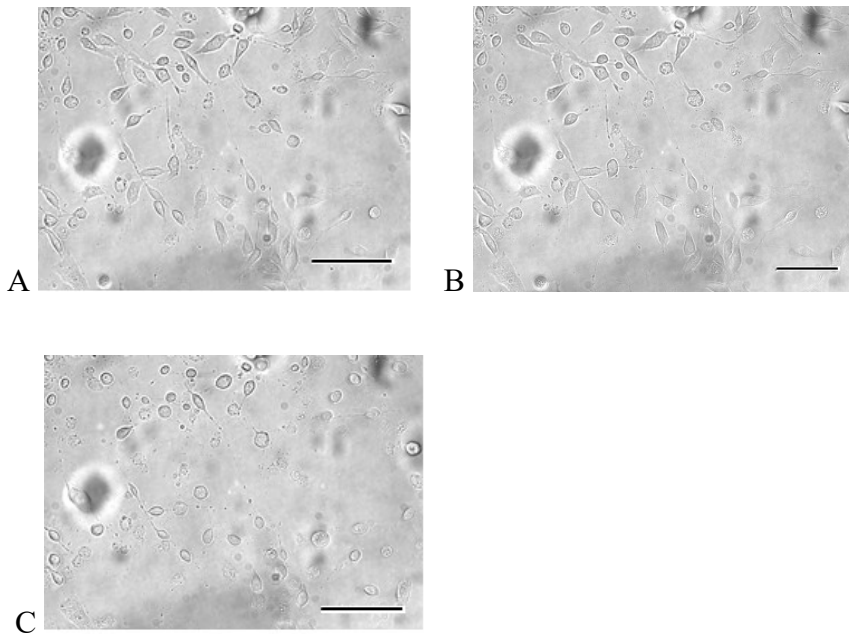


Figure 16: Cellule Ag55 exposées à 0,002 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa dans la solution Ag à (**A**) t_0 , (**B**) $t_{60\text{min}}$, (**C**) $t_{65\text{min}}$, après l'ajout de 30 $\mu\text{g/ml}$ de Cry4Ba. La barre représente 20 μm . Objectif 10x.

3.1.2 Spectroscopie à lecture de plaque

Dans le but de quantifier le taux de mortalité des cellules, une étude mesurant la viabilité cellulaire a été entreprise. Seule la lignée cellulaire Ag55 fut étudiée puisqu'il est presque impossible d'obtenir un nombre suffisant de cellules isolées de l'intestin du

moustique pour en étudier la viabilité par spectroscopie. Cette technique est communément appelée test colorimétrique du MTT.

Les mesures de spectroscopie ont révélé une forte activité cytolytique de la toxine Cyt1Aa sur les cellules Ag55 et ce à partir de 0,001 μ g/ml à l'intérieur de 30 minutes. La figure 17 montre une courbe dose réponse de mortalité des cellules exposées à la Cyt1Aa. La concentration létale à 50% est de 0,057 μ g/ml.

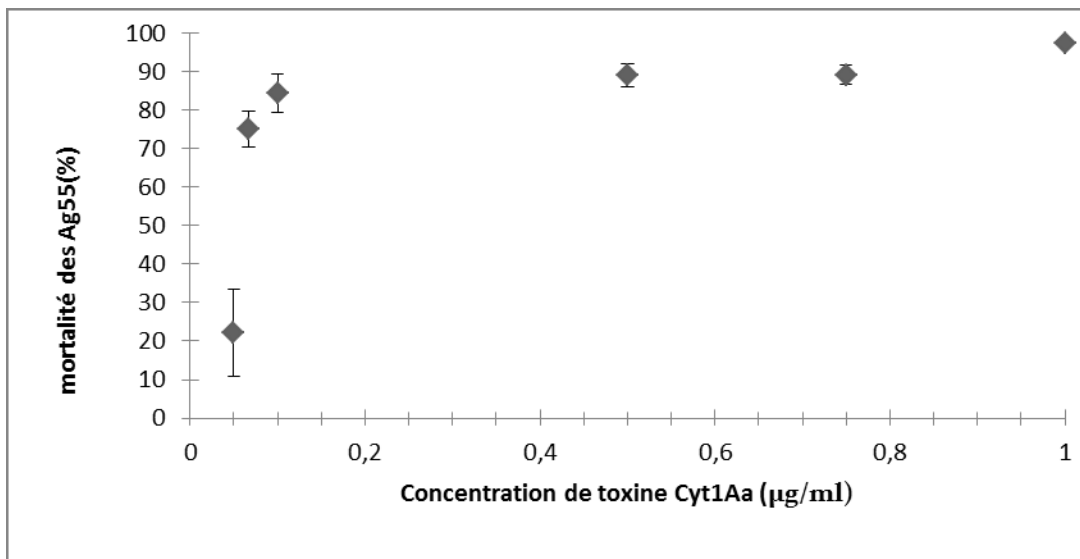


Figure 17 : Pourcentage de cellules mortes en réponse à la Cyt1Aa (0,05 à 1 μ g/ml) suivant une exposition de 30 minutes. Les cellules préparées pour la mesure d'absorbance du MTT ont été cultivées dans des plaques à 96 puits dans le milieu LB-15 modifié. La concentration létale à 50 % (LC_{50}) est 0,057 μ g/ml. Chaque point est la moyenne \pm l'erreur-type. Trois à 11 puits ont été utilisés pour chaque dose de toxine et la courbe correspond à 1 à 5 répétitions d'expériences identiques.

Comme mentionné dans la section précédente, l'exposition des toxines Cry4Aa et Cry4Ba n'a aucun effet sur les cellules Ag55 sur une période de quelques heures au moins, même à dose élevée (100 à 150 µg/ml). Malgré un nombre important d'expériences en absorbance de MTT (n=32) destinés à mettre en évidence des synergies entre les toxines Cyt1Aa et Cry4, il n'a pas été possible de tirer des conclusions fermes. En effet, il ne suffit que d'une infime dose de la Cyt1Aa pour endommager les cellules rapidement et une longue exposition à une forte dose de Cry est nécessaire pour espérer observer un effet significatif.

3.2 Microspectrofluométrie

3.2.1 Réponse calcique de la lignée cellulaire

Le rapport de fluorescence de Fura-2 a été mesuré dans les cellules Ag55 en présence des toxines à l'étude. Les cellules adhérentes à la lamelle absorbent la sonde fluorescente qui se liera au calcium libre intracellulaire. La fluorescence émise par le Fura-2 excité à 340 et 380 nm est mesurée à 505 nm et dépend de la concentration du calcium libre intracellulaire lié à la sonde. Le changement de concentration intracellulaire de Ca^{++} est représenté par le ratio des amplitudes de la fluorescence à 340 et 380 nm. Cette technique est illustrée à la figure 15 qui montre dans le panneau **A** la variation des amplitudes de fluorescence à 340 et 380 nm en réponse à l'exposition d'une cellule individuelle Ag55 à 0,1 µg/ml de Cyt1Aa. Le panneau **B** représente le ratio des fluorescences à ces deux longueurs d'onde. On observe donc une augmentation de la concentration de Ca^{++} intracellulaire suivie d'une baisse correspondant à la fuite de Fura-2 en raison de la lyse cellulaire, confirmée par observation microscopique du champ expérimental en lumière blanche.

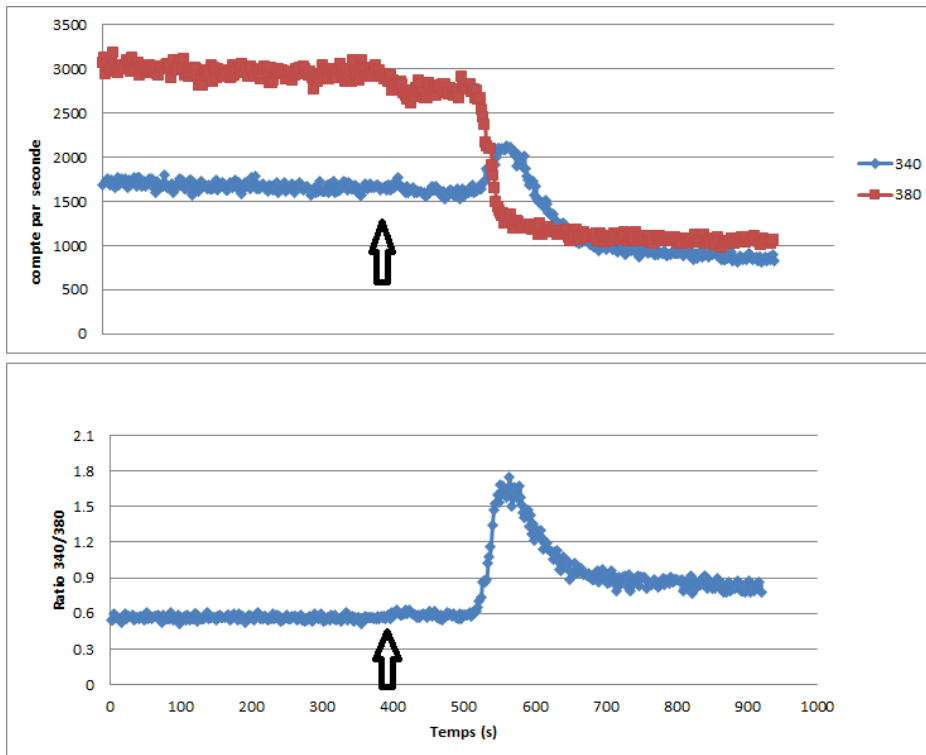


Figure 18: Réponse typique d'une cellule Ag55 à l'ajout de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa dans la solution Ag. **A)** Tracés bruts (non corrigés pour la fluorescence de fond) de fluorescence à 340 nm (bleu) et 380 nm (rouge). **B)** Ratio du tracés à 340 nm sur celui à 380 nm du panneau **A**. La toxine a été appliquée au moment indiqué par les flèches.

Pour étudier les effets des toxines sur le calcium intracellulaire des Ag55, on a mesuré les paramètres suivant : ΔR , l'amplitude maximum d'augmentation du ratio; $t_{\text{départ}}$, le temps écoulé entre le moment d'application de la toxine et une augmentation de 20 % de la réponse (20 % de ΔR); t_{pic} , le temps écoulé entre le moment d'application de la toxine et le maximum de la réponse. Ces paramètres sont illustrés dans la figure 19 qui représente la même expérience que celle de la figure 18, mais après correction de la fluorescence de fond à chaque longueur d'onde.

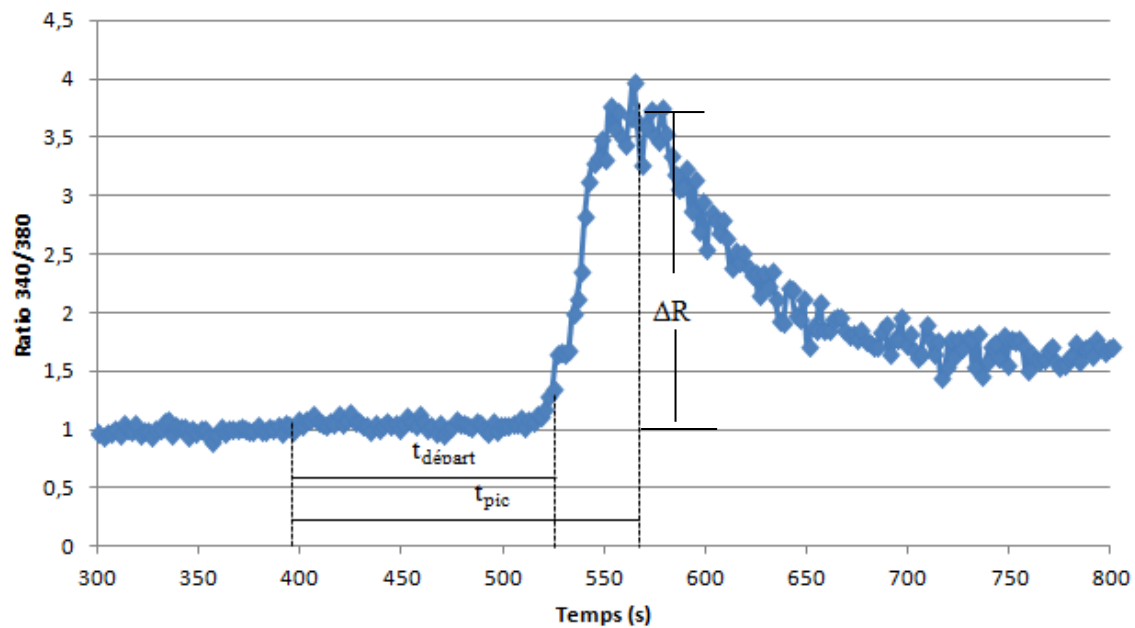
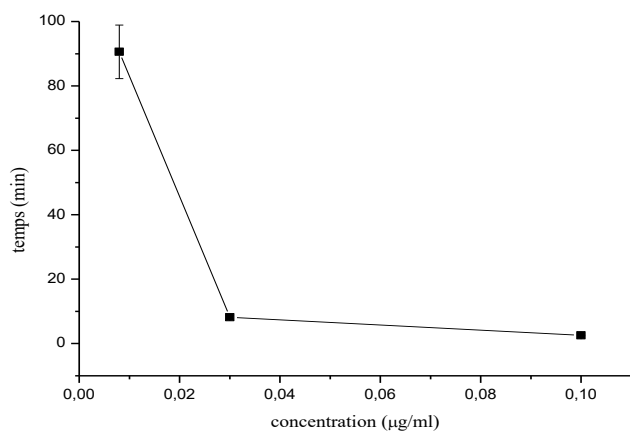
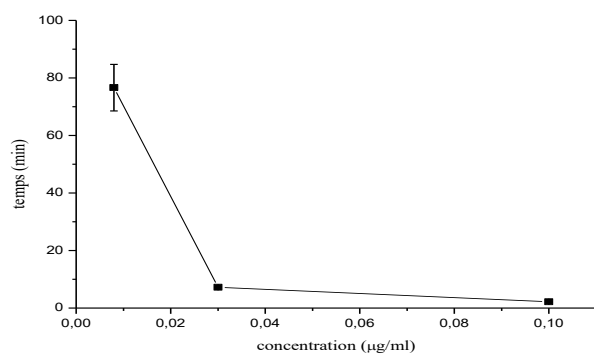


Figure 19: Les différents paramètres utilisés pour l'analyse des expériences de microspectrofluorométrie. Le ratio représenté provient de l'expérience illustrée en figure 14 après correction de la fluorescence de fond des tracés individuels à 340 et 380 nm.

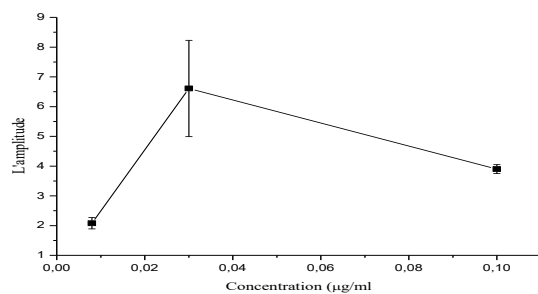
Le graphique suivant (Figure 20) montre une dose réponse pour $t_{\text{départ}}$ et t_{pic} ainsi que le ΔR pour la toxine Cyt1Aa. Les paramètres indiquent une réponse dans le temps liée à la concentration. L'amplitude par contre ne semble pas, à première vue, être liée à la concentration du Cyt1Aa administrée.



A



B



C

Figure 20: Dose-réponse des cellules Ag55 à la toxine Cyt1Aa en variation de calcium intracellulaire représentée par les paramètres $t_{\text{départ}}$ (A), t_{pic} (B) et ΔR (C). Les barres d'erreurs-type ne sont montrées que lorsqu'elles sont plus grandes que la taille des points du graphique (n=3).

Les toxines Cry4Aa et Cry4Ba provoquent peu d'effet sur les cellules Ag55 à des concentrations inférieures à 50 µg/ml et la toxine Cry11Ba ne déclenchait pas de réponse constante et reproductible. À 50 µg/ml, les toxines Cry4Aa et Cry4Ba ont provoqué une réponse cellulaire dont le tableau I présente le détail des paramètres à l'étude.

Tableau I : Réponse des cellules Ag55 aux toxines Cyt1Aa à 0,008 et 0,03 µg/ et aux toxines Cry4Aa et Cry4Ba, respectivement, à 50 µg/ml. L'analyse est faite selon les paramètres $t_{\text{départ}}$, t_{pic} et ΔR .

Toxines	$t_{\text{départ}}$ (min)	t_{pic} (min)	ΔR
Cyt1Aa 0,008 µg/ml	90,60 ± 8,32	76,64 ± 8,10	2,08 ± 0,19
Cyt1Aa 0,03 µg/ml	8,17 ± 0,59	7,23 ± 0,10	6,61 ± 1,62
Cry 4Aa 50 µg/ml	26,10 ± 5,71	28,75 ± 5,61	3,49 ± 0,14
Cry 4Ba 50 µg/ml	4,67 ± 0,51	14,25 ± 0,92	2,55 ± 0,18

Les réponses obtenues pour la Cyt1Aa seront considérées en tant que références pour étudier les synergies entre les toxines. Les combinaisons entre les toxines Cry4Aa et Cry4Ba n'ont montré aucun effet de synergie.. Puisque les toxines Cry ne montrent pas

d'effet en deçà de 50 µg/ml, la toxine Cry4Aa a été étudiée à cette dose en présence de la Cyt1Aa à 0,008 µg/ml soit une dose où l'effet est sur une longue période, Le $t_{\text{départ}}$ est similaire à la toxine Cry4Aa seule, soit $32,99 \pm 6,96$ plutôt que $26,1 \pm 5,7$, tandis que le t_{pic} se produit nettement plus lentement que la Cry4Aa mais plus rapidement que la Cyt1Aa, indiquant plutôt une moyenne des réponses des deux toxines comme le montre le Tableau II. Des expériences à de plus faibles concentrations de Cry4Aa n'eurent aucun effet sur la réponse de la Cyt1A. Les ΔR n'indiquent pas de synergie lorsque les Cry sont combinées à la Cyt.

Tableau II : Réponse des cellules Ag55 aux toxines Cyt1Aa à 0,008 et 0,03 µg/ml en combinaison avec Cry4Aa et Cry4Ba, respectivement, à 50 µg/ml. L'analyse est faite selon les paramètres $t_{\text{départ}}$, t_{pic} et ΔR .

Toxines	$t_{\text{départ}}$ (min)	t_{pic} (min)	ΔR
Cyt1Aa 0,03 µg/ml + Cry4Aa 50 µg/m	$32,99 \pm 6,96$	$44,91 \pm 6,77$	$5,17 \pm 0,72$
Cyt1Aa 0,03 µg/ml + Cry4Ba 50 µg/ml	$10,22 \pm 7,08$	$11,90 \pm 7,67$	$5,65 \pm 1,35$

Contrairement à la toxine Cry4Aa, la Cry4Ba à 20 µg/ml et 50 µg/ml, en combinaison avec la Cyt1Aa à 0,008 µg/ml annule complètement l'effet de cette dernière. Toutefois, lorsque la Cyt1Aa est à une concentration plus élevée, soit 0,03 µg/ml, on observe une réponse semblable à la toxine Cry4Aa (Tableau II). Le temps de départ de

Cry4Ba à 50 µg/ml en combinaison avec la Cyt1Aa 0,03 µg/ml ainsi que la variation du temps jusqu'au pic sont plus lents que lorsque la toxine Cyt est appliquée seule, indiquant un ralentissement du mécanisme de ce dernier.

Suivant l'hypothèse que la Cyt1Aa jouerait le rôle de récepteur à la membrane cellulaire, on a testé l'ajout d'une toxine Cry lorsque la réponse calcique, l'augmentation du ratio de fluorescence, est déjà entamée, assurant ainsi que la toxine Cyt est bien dans la membrane et que les Cry, s'il y a lieu, puissent interagir avec la Cyt comme elles interagiraient avec un récepteur. Les résultats montrent encore un ralentissement de l'effet aux différentes concentrations : le temps avant que la cellule lyse est plus long. Toutefois, l'amplitude de la réponse calcique est supérieure à celle de la toxine seule, comme on peut voir dans la figure 21 où le maximum du ratio calcique, soit ΔR , atteint par les cellules en présence de Cyt1Aa à 0,008 µg/ml ou à 0,1 µg/ml, est inférieur à celui de la combinaison des toxines de Cry4Aa à 50 µg/ml ou à Cry4B 22,5 µg/ml à Cyt1Aa 0,008 µg/ml respectivement. Les barres d'erreurs sont effectivement grandes toutefois, nous considérons a priori qu'il y a une différence puisqu'elles ne se chevauchent pas.

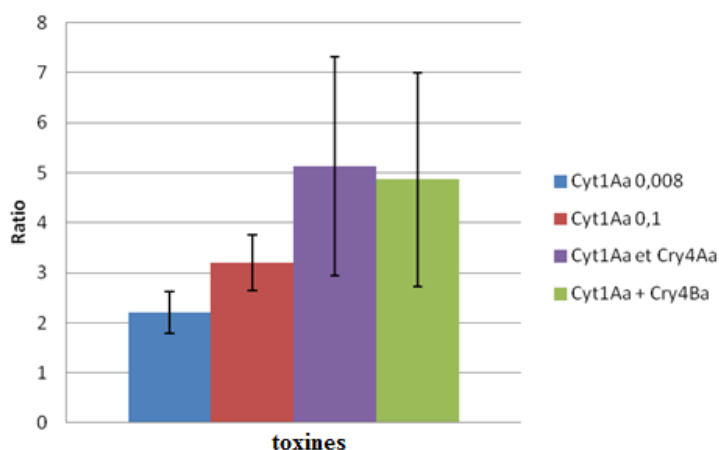


Figure 21: ΔR atteint par les cellules en présence de 0,008 $\mu\text{g/ml}$ et 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa, et la combinaison des toxines Cry4Aa à 50 $\mu\text{g/ml}$ et Cry4Ba à 22,5 $\mu\text{g/ml}$ et Cyt1Aa 0,008 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Les toxines Cry furent ajoutée après Cyt1Aa lorsque la cellule répond par une montée calcique maintenue.

3.2.2 Réponse calcique sur les cellules isolées

Comme mentionné plus haut, les cellules isolées de l'intestin du moustique n'ont jamais été étudiées dans un contexte de microspectrofluorométrie. Elles sont peu adhérentes à une lamelle même lorsque cette dernière est recouverte de poly-D-lysine qui souvent favorise une bonne adhésion. Quelques cellules collées et vivantes ont cependant pu être étudiées pour déterminer leurs différentes réponses aux toxines ($n = \text{approx. } 30$). Les résultats présentés ici sont donc préliminaires. La plupart des cellules dissociées qui absorbent facilement le Fura-2 AM ressemblent à celles de la figure 2 : très rondes, et montrant quelques fois des microvillosités. Ces cellules ne répondent pas aux toxines, mais répondent à des agents comme l'éthanol ou l'ionomycine. Les cellules privilégiées pour nos expériences sont donc celles dont la membrane présente des microvillosités,

mais la taille de ces cellules varie et elles n'absorbent pas systématiquement la charge. Une perte du signal calcique peut soit indiquer la mort de la cellule ou tout simplement la fuite de la charge de la sonde fluorescente : contrairement à la lignée Ag55, on ne peut pas savoir avec certitude que ces cellules sont mortes puisqu'elles ne perdent pas nécessairement leur intégrité cellulaire.

La toxine Cyt1Aa présente une variété de réponses aux mêmes concentrations. Celle qui a été observée plusieurs fois (n=3) est une montée calcique ne menant pas nécessairement à la mort de la cellule. Deux autres expériences par contre montrent une perte du signal ne se traduisant pas par la mort de la cellule. De plus, d'autres cellules n'ont montré aucune réponse calcique à la toxine (n=4).

Très peu de réponses à la Cry4Aa à 20 µg/ml ont été observées , la plupart des cellules ne répondant pas du tout (n=8). Une seule expérience montre une montée du calcium intracellulaire et la lyse de la cellule après ajout de la toxine. Dans les autres expériences, on note une augmentation ou une diminution des amplitudes de la fluorescence aux deux longueurs d'onde sans changement de leur rapport et sans mort cellulaire (n=5).

La plupart des cellules ne répondent pas à la Cry4Ba (n=5), mais trois expériences, deux à 1 µg/ml et une à 30 µg/ml montrent une perte de signal de la cellule environ 5 minutes après son ajout. Contrairement à ce qui se passe avec la Cry4Aa, les cellules qui perdent leur signal conservent leur intégrité. Cette réponse a aussi été observée à 20 µg/ml de Cry4Ba.

Pour tester la possibilité de synergies, plusieurs expériences (n=16) ont été faites avec l'ajout successif de deux toxines différentes (Cyt1Aa suivie de Cry4Aa (n=5), Cyt1Aa suivie de Cry4Ba (n=6) et Cry4Ba suivie de Cyt1Aa (n=2) aux doses identiques à celles des toxines testées individuellement. Dans le premier cas, les réponses sont identiques à celles de la Cry4Aa seule. Dans les deux autres cas, les cellules répondent soit par une perte de signal sans lyse, soit par une augmentation transitoire du ratio et la mort cellulaire.

3.3 Microélectrodes

Des expériences d'électrophysiologie furent conduites pour déterminer les réponses cellulaires au niveau du potentiel de membrane de l'intestin du moustique *A. aegypti*. La viabilité du tissu est confirmée par des observations au microscope où l'on voit le fort mouvement péristaltique de l'intestin ; ce mouvement peut durer jusqu'à deux heures et perd ensuite de sa vigueur jusqu'à être entièrement absent après 8 h (n=11). Malgré le fait que la viabilité de la préparation soit élevée, le taux de succès d'utilisation des microélectrodes est limité à 25-30 % (n=84).

La réponse à chacune des toxines et à différentes concentrations est très variable d'une expérience à l'autre. Il a toutefois été possible d'observer quelques types de réponses.

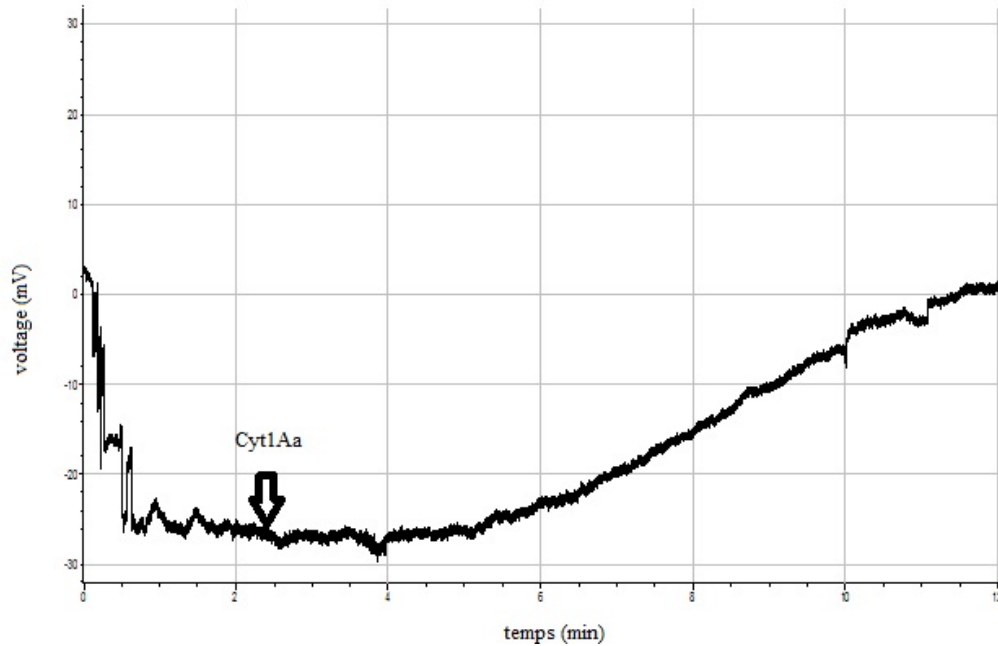


Figure 22: Enregistrement d'une cellule de l'intestin d'*A. aegypti* empalée par une microélectrode et exposée à 1 $\mu\text{g/ml}$ de Cyt1Aa. Le passage de 0 mV à -50 mV indique l'entrée dans la cellule (voltage initial à l'ajout de la toxine de 27 mV). Ce tracé montre une dépolarisation suivant l'ajout de la Cyt1Aa. Échelle verticale potentiel membranaire (mV), échelle horizontale temps (min).

Des expériences ($n = 19$) avec la toxine Cyt1Aa ont été faites à des concentrations aussi faibles que 0,05 $\mu\text{g/ml}$ et aussi fortes que 10 $\mu\text{g/ml}$. Les cellules intestinales, peut importe la concentration, ne répondent pas de la même façon. À une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ de toxine, certaines cellules se dépolarisent presque totalement, comme illustré en figure 21. La figure 23 montre l'effet de la Cyt1Aa à 1 $\mu\text{g/ml}$ sur le potentiel membranaire normalisé de trois intestins.

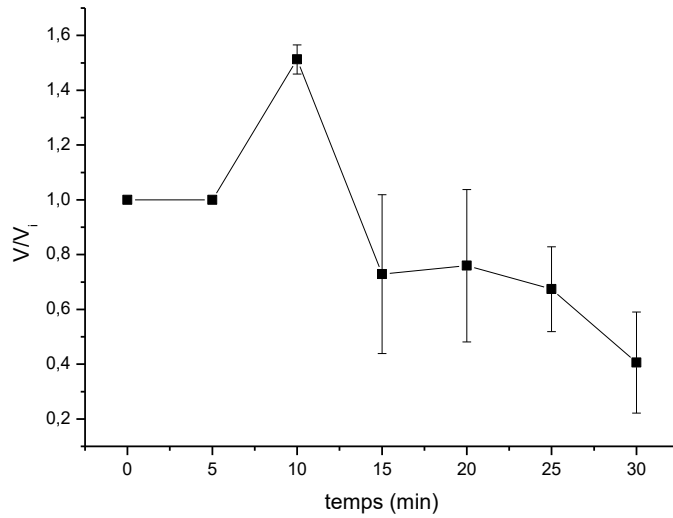


Figure 23: Réponse à la toxine Cyt1Aa (1 $\mu\text{g/ml}$) suivant son ajout à $t_{5\text{min}}$. L'axe vertical présente le potentiel membranaire normalisé (V/V_i) où V_i est le potentiel intracellulaire mesuré immédiatement après empalement de la cellule de l'intestin isolé du moustique *A. aegypti*. Les points représentent les valeurs moyennes et erreurs-type ($n=3$). Les barres d'erreurs-type ne sont montrées que lorsqu'elles sont plus grandes que la taille des points sur le graphique.

La toxine Cry4Aa montre deux types de réponses, soit aucun effet sur le potentiel membranaire ($n=4$), et ceci à différentes concentrations, soit une dépolarisation complète de la membrane (Figure 24, $n=4$).

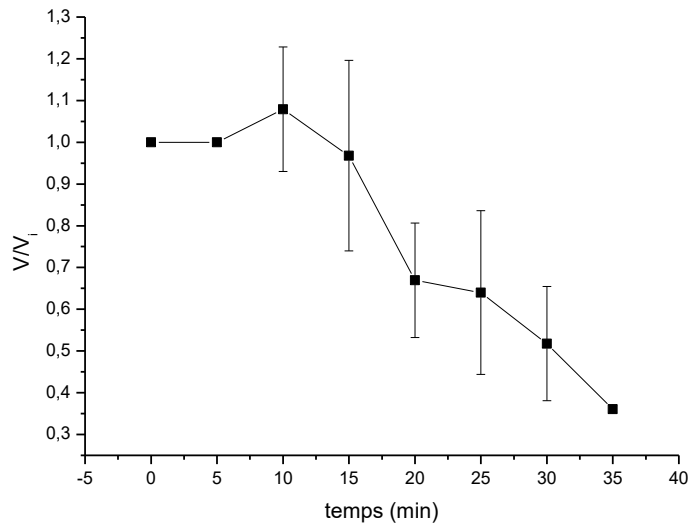
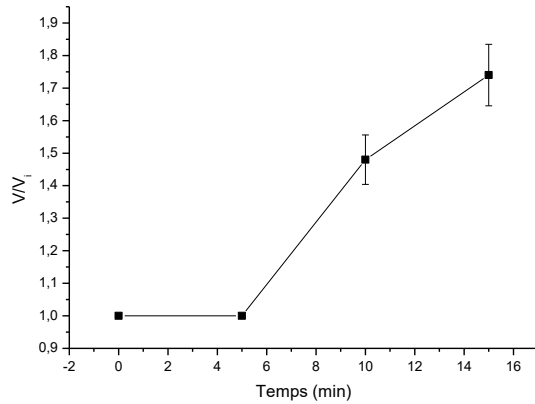
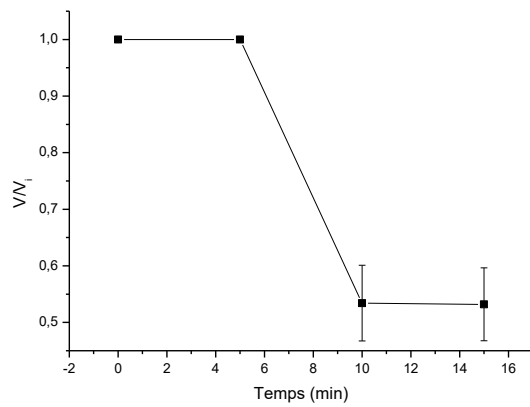


Figure 24: Réponse à la toxine Cry4Aa (20 µg/ml) suivant son ajout au $t_{5\text{min}}$ des cellules de l'intestin d'*A. aegypti*. L'axe vertical présente le potentiel membranaire normalisé (V/V_i) où V_i est le potentiel intracellulaire mesuré immédiatement après empalement de la cellule de l'intestin isolé du moustique *A.aegypti*. Les points représentent les valeurs moyennes et erreurs-type ($n=4$). Les barres d'erreurs-type ne sont montrées que lorsqu'elles sont plus grandes que les points sur le graphique.

Comme dans certaines expériences avec la toxine Cry4Aa (voir plus haut), plusieurs expériences avec la toxine Cry4Ba ne montrent aucun effet sur le potentiel membranaire ($n=13$). Il a toutefois été observé, à 22,5 µg/ml, que certaines cellules ($n=3$) répondent par une hyperpolarisation sans nécessairement se dépolariser ensuite (Figure 24 **A**). D'autres cellules ($n=3$), par contre, répondent à cette même concentration de toxine par une dépolarisation de la membrane (Figure 25 **B**).



A



B

Figure 25: Réponses à la toxine Cry4BaAa (22,5 $\mu\text{g/ml}$) suivant son ajout à $t_{5\text{min}}$. **A)** hyperpolarisation des cellules. **B)** Dépolarisation des cellules L'axe vertical présente le potentiel membranaire normalisé (V/V_i) où V_i est le potentiel intracellulaire mesuré immédiatement après empalement de la cellule de l'intestin isolé du moustique *A. aegypti*. Les points représentent les valeurs moyennes et erreurs-type ($n=3$). Les barres d'erreurs-type ne sont montrées que lorsqu'elles sont plus grandes que les points sur le graphique.

Différents protocoles expérimentaux pour étudier les synergies possibles ont été testés. Les résultats obtenus avec la plupart des ces combinaisons étaient variables. Le tableau III présente les différentes combinaisons testées.

Tableau III: Combinaisons de toxines testées sur les cellules de l'intestin isolé du moustique *A. aegypti*. Chaque expériences a été reproduites au moins trois fois.

Toxines (µg/ml)	Effets
Cyt1Aa puis Cry4Aa 0,5 5-10 1,0 5-10-50-100 5,0 5-20	Effet variable
Cyt1Aa puis Cry4Ba 1,0 5-50	Aucun effet
Cyt1Aa + Cry4Aa 1,0 20	Réponse plus rapide
Cyt1Aa + Cry4Ba 1 20-25	Effet variable
Cry4Aa puis Cyt1Aa 25 0,5-1	Effet variable
Cry4Aa puis Cry4Ba 25 25	Peu d'effet

En raison du manque de réponse des différentents concentrations de Cyt1Aa et de Cry4Aa, les expériences de combinaison ont été réalisées principalement aux concentrations où les effets étaient observables. La combinaison des deux toxines provoque une dépolarisation plus rapide de la cellule en comparaison à l'application des

toxines seules (Figure 26). On y voit presque une perte totale de signal. Quelques expériences à des concentrations légèrement plus faibles de Cyt1Aa en combinaison avec la Cry4Aa, à la même ou à plus faibles doses, n'ont montré aucun effet.

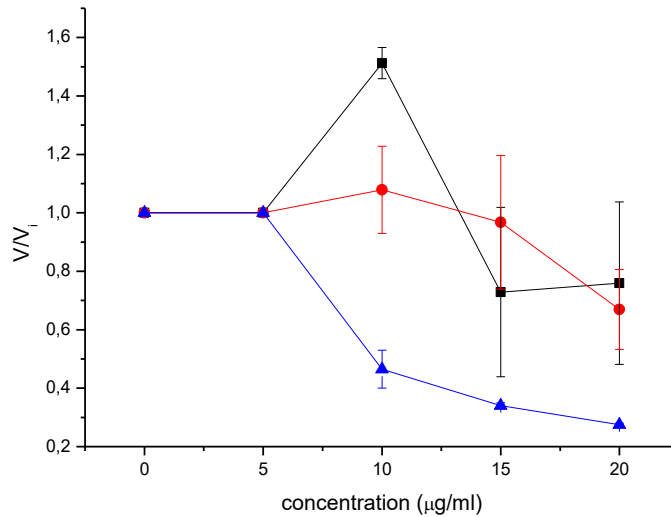


Figure 26: Réponse de synergie aux toxines suivant leur ajout à $t_{5\text{min}}$; toxine Cyt1Aa (1 µg/ml) seule (carrés noirs); Cry4Aa (20 µg/ml) seule (cercles rouges); Combinaison des deux toxines à ces concentrations (triangles bleus). L'axe vertical présente le potentiel membranaire normalisé (V/V_i) où V_i est le potentiel intracellulaire mesuré immédiatement après empalement de la cellule de l'intestin isolé du moustique *A. aegypti*. Les points représentent les valeurs moyennes et erreurs-type (N=3). Les barres d'erreurs-type ne sont montrées que lorsqu'elles sont plus grandes que les points de la courbe.

Chapitre 4 : Discussion

Bien que les toxines du sérotype *israelensis* de *Bacillus thuringiensis* soient reconnues comme étant formatrices de pores et capables de synergie entre elles, il existe très peu de données permettant d'expliquer les mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire de ces toxines [Ben-Dov, 2014]. Les résultats présentés dans ce mémoire ont cherché à identifier des pistes à la compréhension de ces mécanismes.

4.1 Viabilité cellulaire

Les observations au microscope ont permis d'établir que la toxine Cyt1Aa a un effet sur des lignées cellulaires. Elles ont montré que certaines cellules présentaient clairement un changement de leur membrane, augmentaient de taille ou lysaient tout simplement.

La lignée Ag55, *A. gambiae*, est composée de cellules dont on ne connaît pas l'origine, on ne sait pas avec certitude s'il s'agit de cellules intestinales; il existe aucune information présentant une réponse de ces cellules au Bti. Les observations au microscope ainsi que les expériences de colorimétrie au MTT ont montré que ces cellules répondent fortement à la toxine Cyt1Aa : dès 0,008 $\mu\text{g/ml}$, plusieurs cellules meurent ou changent de forme dans les minutes suivant l'ajout de la toxine (figure 14 et figure17). La toxine Cyt1Aa est reconnue comme étant une toxine très active contre une variété de cellules *in vivo* [Butko, 2003 , Ben-Dov, 2014]. Toutefois, ces cellules répondent très peu aux toxines Cry sauf à des doses supramaximales ($\geq 150 \mu\text{g/ml}$) et sur une longue période de temps. Il a déjà été montré que des lignées cellulaires d'anophèles répondaient aux toxines du Bti et le LC_{50} de la Cyt1Aa était nettement inférieur à celui des toxines

Cry dont certaines expériences ont été faites aux alentours de 150 et 200 µg/ml [Chilcott and Ellar, 1988]. D'autres études ont montré que les toxines Cry se liaient dans la membrane de la partie postérieure de l'intestin moyen sur les cellules présentant des microvillosités [Ravoahangimalala and Charles, 1995]. Hua et al (2008) a aussi montré que les cellules d'*A. gambiae* possèdent des cadhérines qui joueraient le rôle de récepteurs situés dans les microvillosités.

Des expériences de synergie ont été effectuées, en combinant des variétés de concentration de Cyt et de Cry. L'hypothèse que la toxine Cyt jouerait le rôle de récepteur pour les toxines Cry n'a pu être confirmée par la colorimétrie puisque les doses très faibles de Cyt1Aa ne semblaient pas provoquer une plus forte mortalité en présence de faibles ou de fortes doses de Cry. Il n'était pas possible de distinguer les intensités des réponses en raison de la faible différence des valeurs; cette technique ne s'est pas avérée assez sensible pour les différentes concentrations.

4.2 Microélectrodes

Cette technique d'électrophysiologie est très novatrice dans le domaine du Bti et, quoique complexe, permet d'observer des changements du potentiel des cellules en réponse aux toxines [Peyronnet et al., 1997]. Toutefois, le risque d'endommager les cellules est très élevée pour le moustique, car, bien que l'intestin puisse survivre une longue période à l'extérieur de la larve (2 h), le tissu est fragile et sensible. Les effets peuvent se traduire différemment sur le potentiel membranaire, expliquant ainsi les différentes réponses observées par les toxines. Plusieurs cellules n'ont pas répondu à la toxine Cyt1Aa, ceci malgré une dose élevée. Il est connu que la Cyt1Aa est moins active sur les moustiques *A. aegypti* [Cheong and Gill, 1997], malgré sa forte activité

cytolytique in vitro sur une variété de cellules [Bourgouin et al., 1988 , Chilcott et al., 1998 , Cohen et al., 2011]. Toutefois, quelques cellules ont répondu à Cyt1Aa à 1 µg/ml par une légère hyperpolarisation et une dépolarisation de la membrane dans les minutes qui suivent l'ajout de la toxine (figure 23). Une dépolarisation peut être provoquée par le pore causé par la toxine ou encore la déstabilisation de la membrane qui mène à un déséquilibre ionique de part et d'autre de la membrane. L'hyperpolarisation peut être due à la position de la toxine dans la membrane laissant ainsi passer soit des anions soit des cations.

Ce ne sont pas toutes les cellules, encore une fois, qui répondent à la toxine Cry4Aa, mais elles ont répondu davantage à celle-ci qu'à la Cry4Ba. On observe une dépolarisation prolongée menant à la perte du potentiel à 20 µg/ml (figure 21). Quelques résultats furent obtenus en deçà de cette valeur, mais pas de résultats récurrents permettant d'établir une tendance véritable.

La toxine Cry4Ba a montré trois types de réponses. Tout d'abord, plusieurs cellules n'ont pas répondu à la toxine (figure 25). Comme le montrent Cavados et al., 2004, le tissu exposé aux toxines peut répondre quelques heures après le traitement. On ne peut pas écarter la possibilité que certaines cellules ne répondent pas à la Cry4Ba parce qu'elles n'ont pas les récepteurs nécessaires. De plus, l'article de Clark et al., 2005 a clairement montré que l'effet de la toxine Cry4Ba était très localisé chez le moustique *A. aegypti* : les cellules ne faisant pas partie du segment transitionnel de l'intestin moyen du moustique, soit celles des segments antérieurs et postérieurs, ne sont pas autant affectées par la toxine Cry4Ba. Malgré tout, deux effets à 22,5 µg/ml ont été observés en

réponse à la toxine, soit une perte du potentiel indiquant la mort de la cellule ou une hyperpolarisation soutenue de la cellule (figure 25).

En combinaison avec la Cyt1Aa, la toxine montre une dépolarisation plus rapide que la Cry4Aa seule, soit plus que deux fois plus rapide, ce qui indique une claire synergie. Toutefois, des expériences avec une valeur plus faible de Cry4Aa en combinaison avec la même valeur de Cyt1Aa (1 µg/ml) n'ont montré aucun effet (figure 26).

Plusieurs combinaisons de toxines ont été tentées pour révéler des synergies, mais les réponses étaient très variables. Cette variabilité dans les réponses montre la complexité de l'interaction des toxines et des mécanismes d'action. Par contre, il est fort possible que les synergies se produisent au niveau cellulaire pour les interactions entre Cry4Aa et Cyt1Aa. L'hypothèse que l'intestin répondrait aux toxines est confirmée, toutefois les effets sont très variables et difficilement quantifiables.

4.3 Réponses calciques

Les expériences de microspectrofluorométrie faites sur les cellules fraîchement dissociées de l'intestin du moustique *A. aegypti* sont très peu documentées et ont fait l'objet de plusieurs protocoles expérimentaux pour réussir à les maintenir en vie et les faire adhérer. C'est la première fois que des expériences du type se font sur ces cellules dissociées. Ceci explique aussi les diverses difficultés rencontrées et le peu de résultats : la plupart des cellules se déplaçaient à l'ajout de la toxine. Toutefois, les quelques expériences réussies ont su révéler certains comportements cellulaires en réponse aux toxines (Tableau III). La charge en Fura des cellules est très variable selon deux groupes morphologiques : les cellules dont on distingue clairement la membrane de bordure en

brosse et qui se chargent plus difficilement, et celles qui semblent plutôt lisses et dont le contenu cellulaire n'est pas si visible. Ces dernières se chargent nettement mieux que les premières, mais répondent peu aux toxines du Bti.

Aucune cellule n'a répondu à la Cry4Aa, seule ou en combinaison avec d'autres toxines, à l'exception d'une cellule qui a subi une montée de son ratio calcique. Toutefois, malgré qu'on n'observe pas une montée calcique, on observe une augmentation ou une diminution du signal aux deux longueurs d'onde dans le même sens, ce qui n'affecte pas le ratio. C'est une réponse très particulière pour ce type d'expérience. Il est possible que la cellule change de taille en réponse à la toxine, ce qui se traduirait en une augmentation du signal, dans le cas du rétrécissement de la cellule, ou une baisse du signal, dans le cas inverse. Les fuites de Fura qui ne sont pas causées par la toxine ou un changement de taille sont reconnaissables puisqu'elles se traduisent pas une perte lente du signal.

Ce sont principalement la Cry4Ba et Cyt1Aa qui ont engendré une réponse. Il est important de souligner que la plupart des cellules qui ont été exposées à la toxine Cry4Ba ont répondu quelques minutes après l'ajout. La toxine va provoquer la mort cellulaire, mais souvent on n'observe qu'une perte du signal sans que la cellule ne perde son intégrité. Il est connu que la toxine Cry4Ba affecte de multiples façons le tissu de l'intestin : lésions de la membrane, trous dans la membrane, détachement des cellules du reste du tissu, présence de crevasses sur la membrane plasmique des cellules et lyse cellulaire. Il a été montré, par Clark et al., 2005, en microscopie confocale, que plusieurs cellules avaient à leur surface des trous assez gros pour en vider le contenu cellulaire sans

pour autant qu'elles ne changent de morphologie. Cette explication serait plausible pour expliquer la perte totale du Fura.

Les cellules qui ont répondu à la Cyt1Aa subissaient une montée calcique progressive qui ne se produisait pas directement après l'ajout. Toutefois, dans deux expériences où la toxine Cyt1Aa était en présence des toxines Cry4Ba, l'effet était certain et quasi instantané. De plus, deux autres expériences de combinaison des trois toxines, à différentes concentrations pour les deux expériences, où chaque toxine était ajoutée une à la suite de l'autre, la mort de la cellule a été instantanée dès l'ajout de la dernière toxine (données non montrées). Ces résultats préliminaires soulèvent une piste pour l'étude des synergies en microspectrofluorométrie. Il est possible que la présence de Cyt1Aa augmenterait la rapidité de l'effet des Cry sur la cellule et assurerait la mort de la cellule exposées.

L'intérêt d'étudier la lignée Ag55 repose sur le fait que les toxines de Bti ne furent jamais testées sur ces cellules, mais que des toxines du Bt et *L. sphaericus* ont eu des effets sur ces cellules. Comme dans les expériences de viabilité, la toxine Cyt1Aa engendre une réponse calcique variable dans le temps en fonction de la concentration : plus la concentration est élevée, plus la réponse se produit rapidement. Lors de ces expériences, la toxine Cyt ne menait pas à un plateau de la réponse calcique qui signifie que la cellule maintient son taux de calcium plutôt que de les éjectés par des canaux ou pompes, et les cellules ne récupèrent jamais; elles meurent systématiquement. Il est possible que la Cyt1Aa utilise plusieurs mécanismes auxquels les cellules ne peuvent pas faire face. La montée calcique serait soit une l'entrée massive de calcium externe, ou un relargage du calcium des organelles. Il n'est pas improbable que la toxine laisse entrer

d'autres ions, mais que le déséquilibre ionique stimule l'activité de canaux ou pompe calcique engendrant une montée du calcium intracellulaire.

Les toxines Cry ne présentent aucun effet sur le calcium intracellulaire autrement qu'à de fortes doses. Ceci permet de tester l'hypothèse que la toxine Cyt1Aa agirait comme récepteur pour les toxines Cry puisque tous les changements efficaces seraient liés à la synergie [Wirth et al., 1998]. Les résultats de ce mémoire montrent plutôt que les toxines Cry ralentissent les mécanismes lytiques de la toxine Cyt1Aa. Il y aurait donc une interaction potentielle entre les toxines avant d'atteindre la membrane, ou même au niveau de la membrane, empêchant le fonctionnement habituel de la Cyt1Aa. Il n'est pas impossible que les molécules de Cyt1Aa favorisent leurs interactions avec les toxines Cry4 plutôt que l'interaction à la membrane cellulaire. Toutefois, l'amplitude de la réponse calcique est nettement plus forte lorsque la Cry4Aa ou la Cry4Ba sont ajoutées pendant la montée calcique, comme le montre la figure 21, ce qui indique que la Cyt1Aa est possiblement localisée à la membrane et qu'elle permet un mouvement de calcium intracellulaire plus important que lorsqu'elle est utilisée seule.

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

Bien que la technique de microélectrode puisse être difficile pour étudier les synergies sur un tissu comme l'intestin du moustique *A. aegypti*, elle permet d'observer rapidement les réponses cellulaires des cellules sensibles. Il a tout de même été possible d'obtenir un modèle fonctionnel d'intestin avec un milieu d'incubation adéquat. Nos résultats montrent que les toxines du Bti engendrent une réponse au niveau du potentiel

membranaire des cellules sous différents modèles de réponse, bien que plusieurs cellules n'aient pas été affectées par la présence de ces toxines individuellement ou en combinaison. Il serait donc intéressant de poursuivre des expériences en microélectrodes pour y étudier des réponses, quoique souvent les réponses soient très variables d'une toxine à l'autre, voire d'une expérience à l'autre.

La technique de choix pour étudier des synergies entre les toxines du Bti est la microspectrofluorométrie sur des cellules fraîchement dissociées de l'intestin moyen de la larve. Bien que l'adhérence de ces cellules aux lamelles ait posé des difficultés au bon déroulement des expériences et à la quantité d'expériences représentatives, nous avons réussi à établir un protocole de dissociation des intestins du moustique ainsi qu'un protocole de charge de la sonde Fura-2 efficace. La réponse calcique intracellulaire, ou d'un autre ion selon la sonde, permet d'interpréter les mécanismes cellulaires par lesquels les toxines affectent les cellules et grâce auxquels les cellules tentent de survivre à l'attaque. De plus, les observations microscopiques permettraient de cibler les types cellulaires (présence de longues microvillosités, courtes microvillosités ou aucunes microvillosités) et d'établir celles plus sensibles à une toxine pour ensuite la combiner à une ou plusieurs autres toxines et en voir l'effet. Les résultats présentés dans ce mémoire ont révélé que les toxines du Bti, ici la Cyt1Aa, Cry4Aa et Cry4Ba, provoquent des réponses au niveau cellulaire de la larve du moustique *A. aegypti*. Des expériences de microspectrofluorométrie utilisant d'autres types de sondes sensibles à d'autres ions donneraient une image globale des réponses des cellules dissociées du moustique et aideraient à comprendre et détailler les mécanismes de synergie. Seule la Cyt1Aa montre un impact au niveau cellulaire chez le moustique *A. gambiae*. Une avenue à explorer pour

l'étude de ces toxines serait l'utilisation de la technique du patch clamp avec des cellules isolées de *A. aegypti* : une autre technique d'électrophysiologie qui aiderait à déterminer l'effet physiologique des toxines individuelles ou en combinaison.

Bibliographie

1. **Ahmad, W., and D. J. Ellar.** 1990. Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. FEMS Microbiology Letters **68**:97-104.
2. **Akiba, T., Y. Abe, S. Kitada, Y. Kusaka, A. Ito, T. Ichimatsu, H. Katayama, T. Akao, K. Higuchi, E. Mizuki, M. Ohba, R. Kanai, and K. Harata.** 2009. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. Journal of Molecular Biology **386**:121-133.
3. **Angsuthanasombat, C., N. Crickmore, and D. J. Ellar.** 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism in vivo. FEMS Microbiology Letters **94**:63-68.
4. **Aronson, A. I., and Y. Shai.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiology Letters **195**:1-8.
5. **Aronson, A. I., D. Wu, and C. L. Zhang.** 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. Journal of Bacteriology **177**:4059-4065.
6. **Atsumi, S., K. Miyamoto, K. Yamamoto, J. Narukawa, S. Kawai, H. Sezutsu, I. Kobayashi, K. Uchino, T. Tamura, K. Mita, K. Kadono-Okuda, S. Wada, K. Kanda, M. R. Goldsmith, and H. Noda.** 2012. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**:E1591-E1598.
7. **Baxter, S. W., F. R. Badenes-Perez, A. Morrison, H. Vogel, N. Crickmore, W. Kain, P. Wang, D. G. Heckel, and C. D. Jiggins.** 2011. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. Genetics **189**:675-NIL_814.
8. **Ben-Dov, E.** 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins **6**:1222-1243
9. **Bernick, E. P., S. B. Moffett, and D. F. Moffett.** 2007. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. Tissue & Cell **39**:277-292.

10. **Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar, and J. Li.** 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology* **348**:363-382.
11. **Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat, and J. Lescar.** 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Ångstrom resolution. *Journal of Bacteriology* **188**:3391-3401.
12. **Bourgouin, C., A. Delécluse, and G. Rapoport.** 1988. Specificity and synergism of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins on mosquito larvae, p. 225-226. In Fehrenbach (ed.), *Bacterial Protein Toxins*. Gustav Fisher, Stuttgart, Germany.
13. **Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S. S. Gill, and M. Soberón.** 2011. *Bacillus thuringiensis* : a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**:423-431.
14. **Bulla, L. A., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson, and P. C. Fitz-James.** 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis* . *Critical Reviews in Microbiology* **8**:147-204.
15. **Butko, P.** 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:2415-2422.
16. **Butko, P., F. Huang, M. Pusztai-Carey, and W. K. Surewicz.** 1996. Membrane permeabilization induced by cytolytic δ -endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biochemistry* **35**:11355-11360.
17. **Butko, P., F. Huang, M. Pusztai-Carey, and W. K. Surewicz.** 1997. Interaction of the delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes. *Biochemistry* **36**:12862-12868.
18. **Castaneda-Ramirez, J. C., N. M. de la Fuente-Salcido, R. Salcedo-Hernandez, F. Leon-Galvan, D. K. Bideshi, and J. E. Barboza-Corona.** 2013. High-level synthesis of endochitinase ChiA74 in *Escherichia coli* K12 and its promising potential for use in biotechnology. *Folia Microbiologica* **58**:455-462.
19. **Cavados, C. F. G., S. Majerowicz, J. Q. Chaves, C. Araujo-Coutinho, and L. Rabinovitch.** 2004. Histopathological and ultrastructural effects of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*

- serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**:493-498.
20. **Chen, J. W., K. G. Aimanova, S. Q. Pan, and S. S. Gill.** 2009. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**:688-696.
 21. **Cheong, H. S., and S. S. Gill.** 1997. Cloning and characterization of a cytolytic and mosquitocidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Jegathesan*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3254-3260.
 22. **Chilcott, C. N., and D. J. Ellar.** 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *Journal of General Microbiology* **134**:2551-8.
 23. **Chilcott, C. N., P. J. Wigley, A. H. Broadwell, D. J. Park, and D. J. Ellar.** 1998. Activities of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins Cyt1Aa and Cyt2Aa against three species of sheep blowfly. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:4060-4061.
 24. **Clark, T. M., M. J. Hutchinson, K. L. Huegel, S. B. Moffett, and D. F. Moffett.** 2005. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Tissue and Cell* **37**:457-468.
 25. **Cohen, S., S. Albeck, E. Ben-Dov, R. Cahan, M. Firer, A. Zaritsky, and O. Dym.** 2011. Cyt1Aa toxin: crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *Journal of Molecular Biology* **413**:804-814.
 26. **Cohen, S., O. Dym, S. Albeck, E. Ben-Dov, R. Cahan, M. Firer, and A. Zaritsky.** 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Molecular Biology* **380**:820-827.
 27. **Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S. J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara, and S. R. Hussain.** 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis □ a minireview. *Gene* **179**:111-117.
 28. **Delécluse, A., F. Barloy, and M.-L. Rosso.** 1996. Les bactéries pathogènes des larves de diptères: structure et spécificité des toxines. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités* **7**:217-231.

29. **Elleuch, J., S. Jacca, F. Darriet, F. Chandre, S. Tounsi, and R. Z. Zghal.** 2015. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. *Toxicon* **104**:83-90.
30. **Delécluse, A., J.-F. Charles, A. Klier, and G. Rapoport.** 1991. Deletion by in vivo recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *Journal of Bacteriology* **173**:3374-3381.
31. **Dementiev, A., J. Board, A. Sitaram, T. Hey, M. S. Kelker, X. Xu, Y. Hu, C. Vidal-Quist, V. Chikwana, S. Griffin, D. McCaskill, N. X. Wang, S.-C. Hung, M. K. Chan, M. M. Lee, J. Hughes, A. Wegener, R. V. Aroian, K. E. Narva, and C. Berry.** 2016. The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family α pore-forming toxins. *BMC Biology* **14**:71.
32. **Evdokimov, A. G., F. Moshiri, E. J. Sturman, T. J. Rydel, M. Y. Zheng, J. W. Seale, and S. Franklin.** 2014. Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into *in vivo* formed crystals. *Protein Science* **23**:1491-1497.
33. **Franken, E., L. Potvin, J. L. Schwartz, and W. Schnetter.** 1996. Activation of the CryIIIa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*: a comparative analysis, p. 163, XXth International Congress of Entomology, Firenze, Italy.
34. **Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn, and L. English.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial β -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **57**:1101-1109.
35. **Georghiou, G. P., and M. C. Wirth.** 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1095-1101.
36. **Goldberg, L. J., and J. Margalit.** 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* **37**:355-358.

37. **Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puzsai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology* **254**:447-464.
38. **Groulx, N., H. McGuire, R. Laprade, J. L. Schwartz, and R. Blunck.** 2011. Single molecule fluorescence study of the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAa reveals tetramerization. *Journal of Biological Chemistry* **286**:42274-42282.
39. **Guo, S. Y., S. Ye, Y. F. Liu, L. Wei, J. Xue, H. F. Wu, F. P. Song, J. Zhang, X. A. Wu, D. F. Huang, and Z. H. Rao.** 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: an insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology* **168**:259-266.
40. **Hire, R.S., H. Gang, Q Zhang, R. Mishra, and M. J. Adang** 2015. *Anopheles gambiae* Ag55 cell lines as a model for *Lysinibacillus sphaericus* Bin toxin action. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**:105-110
41. **Hodgman, T. C., and D. J. Ellar.** 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* α -endotoxins determined by computational analysis. *DNA Sequence* **1**:97-106.
42. **Höfte, H., and H. R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* . *Microbiological Reviews* **53**:242-255.
43. **Hua, G., R. Zhang, M. A. F. Abdullah, and M. J. Adang.** 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* **47**:5101.5110
44. **Huang, J., Z. Guan, L. Wan, T. Zou, and M. Sun.** 2016. Crystal structure of Cry6Aa: a novel nematocidal ClyA-type α -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis* . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **478**:307-313.
45. **Hui, F., U. Scheib, Y. Hu, R. J. Sommer, R. V. Aroian, and P. Ghosh.** 2012. Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochemistry* **51**:9911-9921.
46. **Izeirovski, S., S. B. Moffett, D. F. Moffett, and H. Onken.** 2009. The anterior midgut of larval yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*): Effects of amino acids, dicarboxylic acids, and glucose

- on the transepithelial voltage and strong luminal alkalinization. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics & Physiology* **311A**:719-726.
47. **Jagadeshwaran, U., H. Onken, M. Hardy, S. B. Moffett, and D. F. Moffett.** 2010. Cellular mechanisms of acid secretion in the posterior midgut of the larval mosquito (*Aedes aegypti*). *Journal of Experimental Biology* **213**:295-300.
48. **Jimenez, A. I., E. Z. Reyes, A. Cancino-Rodezno, L. P. Bedoya-Perez, G. G. Caballero-Flores, L. F. Muriel-Millan, S. Likitvivanavong, S. S. Gill, A. Bravo, and M. Soberon.** 2012. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**:683-689.
49. **Knowles, B. H.** 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal α -endotoxins, p. 275-308. *In* P. D. Evans (ed.), *Advances in Insect Physiology*, vol. 24. Academic Press, London (UK).
50. **Knowles, B. H., M. R. Blatt, M. Tester, J. M. Horsnell, J. Carroll, G. Menestrina, and D. J. Ellar.** 1989. A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Letters* **244**:259-262.
51. **Knowles, B. H., and D. J. Ellar.** 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* α -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* **924**:509-518.
52. **Lailak, C., T. Khaokhiew, C. Promptmas, B. Promdonkoy, K. Pootanakit, and C. Angsuthanasombat.** 2013. *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin employs two receptor-binding loops for synergistic interactions with Cyt2Aa2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **435**:216-221.
53. **Li, J., J. Carroll, and D. J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal α -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815-821.
54. **Li, J., D. J. Derbyshire, B. Promdonkoy, and D. J. Ellar.** 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* α -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochemical Society Transactions* **29**:571-577.

55. **Li, J., P. A. Koni, and D. J. Ellar.** 1996. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology* **257**:129-152.
56. **Likitvivanavong, S., K. G. Aimanova, and S. S. Gill.** 2009. Loop residues of the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin are important for mosquitocidal activity. *FEBS Letters* **583**:2021-2030.
57. **Likitvivanavong, S., J. W. Chen, A. M. Evans, A. Bravo, M. Soberón, and S. S. Gill.** 2011. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **59**:2829-2838.
58. **Manceva, S. D., M. Pusztai-Carey, and P. Butko.** 2004. Effect of pH and ionic strength on the cytolytic toxin Cyt1A: a fluorescence spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1699**:123-130.
59. **Masson, L., B. E. Tabashnik, Y. B. Liu, R. Brousseau, and J. L. Schwartz.** 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *Journal of Biological Chemistry* **274**:31996-32000.
60. **Morse, R. J., T. Yamamoto, and R. M. Stroud.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409-417.
61. **Okech, A.B., D. Y. Boudko, P. J. Linser, and W. R. Harvey.** 2007. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology* **211**:957-968
62. **Onken, H., S. B. Moffett, and D. F. Moffett.** 2008. Alkalinization in the isolated and perfused anterior midgut of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Science* **8**: 46
63. **Onken, H., S. K. Parks, G. G. Goss, and D. F. Moffett.** 2009. Serotonin-induced high intracellular pH aids in alkali secretion in the anterior midgut of larval yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Journal of Experimental Biology* **212**:2571-2578.
64. **Onken, H., M. Patel, M. Javoroncov, S. Izeirovski, S. B. Moffett, and D. F. Moffett.** 2009. Strong alkalinization in the anterior midgut of larval yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*): Involvement of luminal Na⁺/K⁺-ATPase. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics & Physiology* **311A**:155-161.

65. **Ounjai, P., V. M. Unger, F. J. Sigworth, and C. Angsuthanasombat.** 2007. Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba δ -endotoxin complex revealed by electron crystallography: Implications for toxin-pore formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **361**:890-895.
66. **Park, S., B. E. Rittmann, and W. Bae.** 2009. Life-cycle kinetic model for endospore-forming bacteria, including germination and sporulation. *Biotechnology and Bioengineering* **104**:1012-1024.
67. **Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brousseau, D. Baines, J. L. Schwartz, and R. Laprade.** 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1679-1684.
68. **Pigott, C. R., and D. J. Ellar.** 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:255-281.
69. **Poncet, S., A. Delécluse, A. Klier, and G. Rapoport.** 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology* **66**:131-135.
70. **Promdonkoy, B., and D. J. Ellar.** 2003. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* . *Biochemical Journal*:255-259.
71. **Promdonkoy, B., and D. J. Ellar.** 2000. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* . *Biochemical Journal*:275-282.
72. **Pudney, M., M.G.R. Varma, C.J. Leake.** 1979. Establishment of cell lines from larvae of culicine (*Aedes* species) and Anopheline mosquitoes. *TCA manual* 5, 997-1001
73. **Puntheeranurak, T., P. Uawithya, L. Potvin, C. Angsuthanasombat, and 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. *Molecular Membrane Biology* **21**:67-74.
74. **Rang, C., V. Vachon, R. A. De Maagd, M. Villalon, J. L. Schwartz, D. Bosch, R. Frutos, and R. Laprade.** 1999. Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2918-2925.

75. **Ravoahangimalala, O., and J. F. Charles.** 1995. In vitro binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *FEBS Letters* **362**:111-115.
76. **Sanchis, V., and D. Bourguet.** 2008. *Bacillus thuringiensis* : applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **28**:11-20.
77. **Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:775-806.
78. **Schwartz, J. L., and R. Laprade.** 2000. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation, p. 199-218. In J. F. Charles, A. Delécluse, and C. Nielsen-Leroux (ed.), *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. Kluwer Associate Publishing, Norwell, MA, USA.
79. **Schwartz, J. L., and L. Masson.** 2000. Structure-function analysis of cysteine-engineered entomopathogenic toxins, p. 101-113. In O. Holst (ed.), *Methods in Molecular Biology - Bacterial toxins: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
80. **Thomas, W. E., and D. J. Ellar.** 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal α -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science* **60**:181-197.
81. **Thomas, W. E., and D. J. Ellar.** 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal α -endotoxin. *FEBS Letters* **154**:362-368.
82. **Vachon, V., R. Laprade, and J. L. Schwartz.** 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* **111**:1-12.
83. **Vachon, V., G. Préfontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, M. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J. L. Schwartz, and R. Laprade.** 2002. Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* **41**:6178-6184.
84. **van Frankenhuyzen, K.** 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* **101**:1-16.

85. **Vié, V., N. Van Mau, P. Pomarède, C. Dance, J. L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz, and C. Le Grimellec.** 2001. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *Journal of Membrane Biology* **180**:195-203.
86. **Wang, J., J. R. Steggles, and D. J. Ellar.** 2008. Molecular characterization of virulence defects in *Bacillus thuringiensis* mutants. *FEMS Microbiology Letters* **280**:127-134.
87. **Ward, E. S., D. J. Earp, B. H. Knowles, S. M. Pinnavaia, C. N. Nicholls, T. J. Sawyer, P. E. Granum, and D. J. Ellar.** 1988. Diversity of structure and specificity of mosquitocidal α -endotoxins, p. 67-68. *In* Fehrenbach (ed.), *Bacterial Protein Toxins*. Gustav Fisher, Stuttgart, Germany.
88. **Wirth, M. C., A. Delecluse, B. A. Federici, and W. E. Walton.** 1998. Variable cross-resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:4174-4179.
89. **Wirth, M. C., G. P. Georghiou, J. I. Malik, and G. H. Abro.** 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) from California, USA. *Journal of Medical Entomology* **37**:534-540.
90. **Wu, D., and F. N. Chang.** 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Letters* **190**:232-236.
91. **Wu, D., J. J. Johnson, and B. A. Federici.** 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis* . *Molecular Microbiology* **13**:965-972.
92. **Xie, J., P. Butko, and D. Xie.** 2005. Molecular dynamics simulations of the cytolytic toxin Cyt1A in solution. *IEEE Transactions on Nanobiosciences* **4**:235-240.
93. **Xu, C. C., U. Chinte, L. R. Chen, Q. Q. Yao, Y. Meng, D. Zhou, L. J. Bi, J. Rose, M. J. Adang, B. C. Wang, Z. N. Yu, and M. Sun.** 2015. Crystal structure of Cry51Aa1: a potential novel insecticidal aerolysin-type β -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis* . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **462**:184-189.

94. **Zhang, R., G. Hua, T. M. Andacht, and M. J. Adang.** 2008. A 106-kDa Aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* **47**:11263-11272.
95. **Zhang, R., G. Hua, J. L. Urbauer, and M. J. Adang.** 2010. Synergistic and inhibitory effects of aminopeptidase peptides on *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxicity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* **49**:8512-8519.