

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Imagerie par microscopie à force atomique de toxines Cry1 de *Bacillus thuringiensis*  
interagissant avec des membranes apicales de l'intestin de *Manduca sexta*

par  
Eric Laflamme

Département de physique  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en physique  
option biophysique et physiologie moléculaire

Avril 2008

© Eric Laflamme, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

Imagerie par microscopie à force atomique de toxines Cry1 de *Bacillus thuringiensis*  
interagissant avec des membranes apicales de l'intestin de *Manduca sexta*

présenté par :

Eric Laflamme

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Yves Lapointe  
Président-rapporteur

Raynald Laprade  
Directeur de recherche

Jean-Louis schwartz  
Co-directeur de recherche

Rikard Blunck  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

La microscopie à force atomique (AFM) a été utilisée afin d'imager des toxines CryI du *Bacillus thuringiensis* (Bt) interagissant avec leur membrane cible, c'est à dire les membranes de bordure en brosse de la larve du *Manduca sexta*. De plus, pour fins de comparaison, ces toxines ont été imagées en interaction avec une bicouche de lipides synthétiques purs de dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine (DPPC-DOPC). Avec la bicouche de DPPC-DOPC, la CryIAa forme des structures se retrouvant principalement à l'interface entre deux domaines lipidiques distincts ou en bordure des domaines de DOPC. Les dimensions de ces structures sont d'environ 30 par 60 nm de large et 3 à 7 nm de haut. Avec une préparation de vésicules de membrane de bordure en brosse (BBMV), on observe, sur le mica et en l'absence de toxine, des fragments membranaires plats pouvant atteindre  $25 \mu\text{m}^2$  et 4.2 nm de hauteur. Il est aussi possible de voir, dans ces fragments, des structures irrégulières plus élevées. Après incubation avec la CryIAa, la CryIAc et la CryIC, qui sont des toxines actives contre *M. sexta*, de nouvelles structures de 35 nm de large et de 5.1 à 6.7 nm de haut apparaissent sur certains fragments membranaires, parfois dans des régions particulières de ceux-ci. Leur densité sur la membrane, qui atteint un plateau au bout de 4h, dépend de la toxine et de sa concentration. Les structures formées par la CryIAc sont souvent groupées selon un arrangement serré à deux dimensions. Aucune interaction spécifique n'a pu être observé avec la CryIBa, une toxine inactive contre *M. sexta*. Cette étude fournit la première visualisation à l'échelle nanométrique des interactions entre les toxines de Bt et leur membrane cible. Les structures observées représente vraisemblablement un complexe protéinique formant un pore fonctionnel dans la membrane.

Mots clés : Membrane de bordure en brosse, CryIAa, CryIAc, CryIC, membrane cible, BBMV.

## SUMMARY

Atomic force microscopy (AFM) was used to image *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins interacting with their natural targets, *Manduca sexta* midgut brush border membranes (BBMs), as well as with dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine (DPPC-DOPC) solid-supported lipid bilayers. In lipid bilayers, Cry1Aa formed structures 30- by 60-nm wide and 3- to 7-nm high, mostly at the interface of domains formed by the two different lipids or at the edge of DOPC-enriched domains. Brush border membrane vesicles (BBMVs), in the absence of toxin, formed flat membrane fragments of up to 25  $\mu\text{m}^2$  and 4.2-nm high, with irregular embedded structures. After incubation with Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C, which are active against *M. sexta*, new structures, 35-nm wide and 5.1- to 6.7-nm high, were observed in some membrane fragments, sometimes only in particular regions. Their density, which reached a plateau within 4 h, was toxin- and concentration-dependent. The structures formed by Cry1Ac were often grouped into dense, two-dimensional arrangements. No such specific interactions were observed with Cry1Ba, which is inactive against *M. sexta*. This study provides the first visual demonstration of specific interactions of *Bt* toxins with insect midgut BBMs at the nanometric scale. The observed structures likely represent the protein complexes forming functional *Bt* pores in target membranes.

Keywords: Brush border membrane, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1C, target membrane, BBMV.

## TABLE DES MATIÈRE

Résumé.....	iii
Summary.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	ix
CHAPITRE I.-Introduction.....	1
1.1 Historique et utilisation du Bt.....	1
1.2 Toxines du Bt, nomenclature et structure.....	3
1.3 Physiologie des lépidoptères.....	5
1.4 Mode d'action des toxines du Bt.....	6
1.4.1. Ingestion, solubilisation et activation.....	6
1.4.2. Liaison au récepteur.....	6
1.4.3. Modèles d'insertion et caractérisation du pore.....	8
1.5 La microscopie à force atomique (AFM).....	11
1.6 Présentation des travaux.....	14
1.7 Contribution des co-auteurs.....	15
CHAPITRE II- Résumé de l'article en anglais.....	16
Abstract.....	18
Introduction.....	19
Materials and Methods.....	21
Chemicals.....	21
Toxins.....	21
Brush border membrane vesicles.....	21
Formation of supported DPPC/DOPC bilayers and deposition of brush border membranes.....	21
Atomic force microscopy imaging.....	22
Results and Discussion.....	23

Imaging of Cry1Aa toxin on DPPC-DOPC bilayers.....	23
Imaging of brush border membranes from <i>M. sexta</i> midgut.....	24
Imaging of Cry1 toxins on <i>M. sexta</i> midgut brush border membrane fragments....	25
<i>Toxin dose</i> .....	30
<i>Toxin specificity</i> .....	30
Conclusion.....	31
Acknowledgements.....	32
References.....	33
Tables.....	39
Figures and figures legends .....	41
Accord des coauteur.....	50
CHAPITRE III- Discussion générale.....	51
3.1 Imagerie de la Cry1Aa sur une bicouche de DPPC-DOPC.....	51
3.2 Imagerie de membranes de bordure en brosse de <i>M. sexta</i> .....	51
3.3 Imagerie de toxines de Bt sur des fragments de membranes de bordure en brosse de <i>M. sexta</i> .....	52
3.3.1. La dose de toxine.....	54
3.3.2. Spécificité de la toxine.....	55
3.3.3 Comparaison des dimensions de la toxine Cry.....	56
Chapitre IV- Conclusion et perspective.....	60
Bibliographie.....	62

**LISTE DES TABLEAUX**

## Chapitre II

Table 1. Measured heights and diameters of Cry toxins interacting with membrane fragments.....39

Table 2. Toxin structures interacting with membrane fragments.....40



## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I

Fig. 1. Structure de toxine Cry1Aa en diffraction des rayons X (Grochulski <i>et al.</i> , 1995).....	4
Fig. 2. Modèle d'insertion, modèle d'oligomérisation et images de Vié <i>et al.</i> .....	10
Fig. 3. Schéma du principe de fonctionnement de l'AFM.....	13
Fig. 4. Structure oligomérique de Cry4Ba.....	14

### Chapitre II

Fig. 1. AFM imaging of a typical DPPC-DOPC (1:1 v/v) supported bilayer on mica prepared by liposome fusion.....	41
Fig. 2. Representative images of membrane fragments from <i>M. sexta</i> midgut BBMs.....	42
Fig. 3. Lipid domains in BBMs from <i>M. sexta</i> .....	43
Fig. 4. Effect of PLA2 on BBMs from <i>M. sexta</i> .....	44
Fig. 5. Interaction of Cry1Aa toxin with BBMs from <i>M. sexta</i> .....	45
Fig. 6. Time course of Cry1Aa interaction with BBMs from <i>M. sexta</i> .....	46
Fig. 7. Time course of Cry1Ac interaction with BBMs from <i>M. sexta</i> .....	47
Fig. 8. Dense 2-D arrangements formed by Cry1Ac toxin interacting with BBMs from <i>M. sexta</i> . .....	48

Fig. 9. Interaction of Cry1C toxin with BBMs from *M. sexta*.....49

### Chapitre III

Fig. 5. Comparaison des dimensions des toxines Cry et de ses structures mesurées par diffraction aux rayons X.....58-59

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AFM	Microscope à force atomique
ALP	Phosphatase alcaline
APN	Aminopeptidase N
DOPC-DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
MAC	Magnetic alternative cantilever

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier Raynald Laprade et Jean-Louis Schwartz, mes deux co-directeurs, qui m'ont fait confiance et m'ont soutenu tout au long de ce projet. Je remercie les co-auteurs de mon article Antonella Badia et Michel Lafleur, du département de chimie, Université de Montréal, dont l'expertise en AFM et en lipide a été indispensable. Je remercie aussi Stéphanie Juneau (Département d'astronomie, University of Arizona), qui a initié le projet en tant que stagiaire, Patricia Moraille et Jacqueline Sanchez, du Département de chimie, Université de Montréal, pour leur support technique sur AFM, Lucie Marceau, Marc Juteau et Mireille Marsolais, du Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, pour la purification des toxines et le support technique. Je remercie aussi Frédéric Girard, Martin Kirouac et Vincent Vachon pour des discussions stimulantes.

Je remercie le *Groupe de recherche en transport membranaire (GRTM)*, le *Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM)* et les *Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)* pour les bourses d'études dont j'ai eu la chance de bénéficier. Je remercie également le *Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG)* et les *Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT)* pour leur soutien financier.

# Chapitre I

## Introduction

La popularité des pesticides chimiques n'est plus ce qu'elle était. Face à leurs effets secondaires importants sur la faune, leur toxicité envers des organismes non ciblés, l'accumulation dans l'environnement, la contamination des cours d'eau ou l'apparition d'insectes nuisibles résistants (Coté, 1998 ; Forsberg, 1977 ; Fortier, 2007a ; Frutos *et al.*, 1999), l'homme a essayé de trouver une solution de remplacement efficace provoquant moins de répercussions néfastes sur l'environnement. L'utilisation de micro-organismes pathogènes pour contrôler les insectes, comme la nature le fait déjà depuis toujours, s'est donc avérée une alternative intéressante. En effet, les agents de contrôle produits par ces micro-organismes sont spécifiques et biodégradables, ce qui contribue à préserver l'écosystème. Ainsi, certains virus, champignons ou bactéries sont aujourd'hui utilisés afin de combattre les ravages dans les cultures agricoles et les forêts (Borror et White, 1991) en plus de prévenir, par exemple, la propagation de moustiques pouvant causer la transmission du virus du Nil (Bourassa 2000; Lacoursière et Boisvert, 2004). De tous ces pathogènes, l'utilisation de toxines provenant de la bactérie *Bacillus thuringiensis* est maintenant la plus utilisée (Bravo *et al.*, 2007 ; Schnepf *et al.*, 1998).

### 1.1 Historique et utilisation du Bt

La première découverte de la bactérie du *Bacillus thuringiensis* remonte au début du siècle au Japon par Ishiwata (Beegle et Yamamoto, 1992). Ce n'est qu'en 1911 que Ernst Beliner, un microbiologiste allemand, utilisa pour la première fois le nom *Bacillus thuringiensis* (Bt) afin de décrire un pathogène de la pyrale de la farine trouvé dans les granges de la région de Thuringe en Allemagne (Beegle et Yamamoto, 1992 ; Coté, 1998). Il y a environ quarante mille souches de Bt actuellement connues et cette bactérie à Gram positif se retrouve dans une multitude d'habitats différents comme le sol, les feuilles des arbres, etc. (Schnepf *et al.*, 1998). En plus d'être efficace contre les larves de lépidoptères, certaines souches de Bt sont actives contre les

diptères, les coléoptères, hyménoptères, orthoptères, etc (Beegle et Yamamoto, 1992 ; Goldberg et Margalit, 1977 ; Lambert et Peferoen, 1992). Il est donc facile de cibler l'insecte nuisible sans affecter les populations de d'autres insectes et ainsi préserver l'équilibre écologique souvent fragile d'une région. Cette bactérie, en conditions défavorables, produit un spore ainsi qu'une inclusion cristalline de protoxine(s) insecticide(s) ( $\delta$ -endotoxines) de 27 à 140 kDa (Höfte et Whiteley, 1989). Ces protoxines, après ingestion par un insecte cible, sont activées par des protéases intestinales qui deviennent ensuite des toxines fonctionnelles. Puis, ces dernières forment des pores et s'insèrent dans la membrane apicale de l'intestin moyen en se fixant, préalablement, à un récepteur spécifique. Ces pores, abolissant ainsi les gradients ioniques et électriques, causent la lyse des cellules épithéliales et provoquent, éventuellement, la mort de l'insecte (Schwartz et Laprade, 2000).

Depuis la fin des années 60, la popularité de ces bio-pesticides n'a cessé d'augmenter. La découverte de différentes souches a été en constante progression et ils représentent aujourd'hui environ 2 % du marché mondial des pesticides (Sanchis, 2000). Le Bt est plus spécifique que les pesticides chimiques et a donc le grand avantage de ne pas être toxique pour les vertébrés (Siegel, 2001) et d'être moins néfaste pour l'environnement puisqu'il est biodégradable. Depuis 1995, des plantes transgéniques résistantes aux insectes sont apparues dans les champs afin de remplacer l'épandage d'insecticides. Un gène responsable de la production de toxine insecticide a été incorporé dans le génome de ces plantes. Ainsi, des plantes transgéniques de coton, de maïs, de la tomate et de la patate ont été commercialisées et se sont avérées avantageuses puisqu'elles ont réduit les coûts de production des agriculteurs et n'ont pas semblé avoir d'effet négatif sur l'environnement (Crickmore, 2006). Par contre, étant donné que les insectes sont continuellement exposés aux bio-pesticides par la présence en tout temps de la toxine dans les tissus de ces plantes, cela favorise et accélère l'apparition de la résistance des insectes (Frutos *et al.*, 1999 ; Kumar *et al.*, 1996 ; Lacey *et al.*, 2001), bien que quelques stratégies aient été développées afin de contrer l'apparition de la résistance des insectes ciblés (Frutos *et al.*, 1999 ; Kumar *et al.*, 1996 ; Schnepf *et al.*, 1998,).

## 1.2 Toxines du Bt, nomenclature et structure

Le Bt regroupe trois familles de protéines : les Cry, les Cyt et les Vip. Les Cry et les Cyt sont des protéines cristallisées retrouvées dans le Bt et ayant une toxicité vérifiable (Cry, *crystal*) ou une activité cytolytique (Cyt, *cytolytic*) (Crickmore *et al.*, 1998). Certaines protéines ayant une homologie de séquence avec celles-ci peuvent aussi porter le nom de Cry ou Cyt. Les toxines Vip (*vegetative insecticidal protein*), quant à elles, sont produites dans la phase végétative de la croissance bactérienne (Estruch *et al.*, 1996). Pour les Cry, qui nous intéressent particulièrement dans cette étude, la nomenclature actuelle a été proposée pour la première fois par Crickmore *et al.* en 1998 et est basée sur l'identité de séquence des toxines. Le premier caractère est un nombre arabe, le deuxième est une lettre majuscule, le troisième est une lettre minuscule et le quatrième, facultatif, est un nombre arabe (Crickmore *et al.*, 1998). On peut alors distinguer les toxines qui ont : moins de 45%, de 45% à 78%, de 78% à 95% et plus de 95% d'identité de séquence (Exemple : Cry1Aa).

La cristallographie et la diffraction aux rayons X ont permis d'obtenir la structure tridimensionnelle de plusieurs toxines Cry : la Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), la Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) (Figure 1), la Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), la Cry1Ac (Derbyshire *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2001), la Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), la Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) et finalement la Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006). Ces toxines, en général, ont toutes trois domaines distincts : le domaine I est composé de sept hélices  $\alpha$  anti-parallèles, le domaine II, de 3 feuillets  $\beta$  anti-parallèles et le domaine III de deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles disposés en sandwich. Le domaine I est responsable de la formation du pore et les domaines II et III sont responsables de la fixation de la toxine à des récepteurs spécifiques de la membrane cible (Boonserm *et al.*, 2006 ; Grochulski *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1991). Bien que la structure tridimensionnelle de ces toxines fournisse de précieuses informations et représente probablement la conformation de ces protéines en solution, la toxine, en interagissant avec des membranes lipidiques avec ou sans récepteur, avec leur membrane cible ou *in vivo*, peut avoir subi des changements de conformation et ainsi présenter une architecture fort différente de celles des protéines cristallisées.



Fig. 1. Structure de toxine Cry1Aa en diffraction des rayons X (Grochulski *et al.*, 1995). Le domaine I est en rouge, le domaine II en bleu et le domaine III en vert.



### 1.3 Physiologie des Lépidoptères

La membrane cible du Bt est l'épithélium de l'intestin moyen d'un insecte sensible à la toxine. C'est la larve de lépidoptères, en particulier celle du sphinx du tabac (*Manduca sexta*) (Dow, 1986 ; Knowles, 1994 ; Tran, 2000), qui a été la plus utilisée dans l'étude du mode d'action des toxines du Bt.

Les chenilles possèdent 5 ou 6 stades larvaires avant de se transformer en papillon et croissent très rapidement. Leur principale occupation est de se nourrir de feuilles, de plantes et de fruits, et certaines chenilles peuvent ainsi ravager à grande vitesse les cultures agricoles et les forêts. Le canal alimentaire de la chenille se sépare en trois régions : l'intestin antérieur, moyen et postérieur. La partie la plus active est l'intestin moyen et permet une absorption efficace de nutriments. Il est composé d'une seule couche de cellules possédant une membrane basolatérale (Cioffi, 1979) et deux types de cellules. On retrouve les cellules en colonne et celles en gobelet (Cioffi, 1979 ; Dow, 1986 ; Knowles, 1994), qui sont elles-mêmes reliées entre elles par des jonctions serrées et communicantes permettant un couplage électrique et chimique entre les cellules (Dow et Peacock, 1989 ; Lane et Skaer, 1980 ; Lane *et al.*, 1989 ; Mofett et Koch, 1988). Les cellules en colonne possèdent une membrane apicale de bordure en brosse et c'est sur celle-ci que les récepteurs spécifiques des toxines du Bt sont situés (Aimanova *et al.*, 2006 ; Bravo *et al.*, 1992 ; Hofmann et Lüthy, 1986 ; Hofmann *et al.*, 1988a ; Oddou *et al.*, 1993 ; Van Rie *et al.*, 1989, 1990). La liaison de la toxine à un récepteur spécifique facilite la formation de pores (Knowles et Ellar, 1987 ; Knowles, 1994). Au niveau fonctionnel, il existe un transport important de potassium dans les cellules intestinales de l'hémolymphe vers la lumière de l'intestin (Harvey et Nedergaard, 1964). Le gradient de potassium ainsi généré à travers la membrane apicale permet l'absorption d'acides aminés par l'intermédiaire du co-transporteur K<sup>+</sup>/ acides aminés (Giordana *et al.*, 1989 ; Sacchi et Wolfersberger, 1996 ; Wolfersberger, 2000). Finalement, il est intéressant de savoir que le pH de la lumière de l'intestin est particulièrement basique et peut varier de 8 à 12 au dernier stade larvaire (Dow, 1984).

La présence de radeaux lipidiques dans les membranes de bordure en brosse fait présentement l'objet de plusieurs débats (Heerklotz, 2002 ; Munro, 2003). On les suspecte de jouer un rôle

important dans le mode d'action de la toxine Cry1Ab, c'est-à-dire qu'ils contiendraient le site où la toxine pré-oligomérisée se lierait à son récepteur pour ensuite s'insérer dans la membrane (Bravo *et al.*, 2004). Les types de lipides contenus dans la membrane de bordure en brosse des lépidoptères sont similaires à ceux de d'autres épithéliums d'intestin. En effet, le rapport protéines/lipide (masse) est de 3 et on note une présence significative de cholestérol (20-30 µg/mg protéine) (Terra *et al.*, 2006). L'analyse de la composition lipidique des membranes de bordure en brosse de l'intestin de *Plutella xylostella* (Kumaraswami *et al.*, 2001) et de *Bombyx mori* (Leonardi *et al.*, 2001) ont montré qu'ils contiennent des phospholipides, des glycolipides neutres, des lipides acides et des lipides non-polaires.

## 1.4 Mode d'action des toxines du Bt

### 1.4.1. Ingestion, solubilisation et activation

Suite à l'ingestion par l'insecte de cristaux de protoxines du Bt, le pH alcalin permet de briser les ponts dissulfures qui relient les molécules de toxine à l'intérieur des cristaux (Jaquet *et al.*, 1987 ; Bietlot *et al.*, 1990) pour ainsi solubiliser la toxine. Puis, dans le cas des Cry1, les protoxines solubilisées, d'un poids moléculaire de 130 à 140 kDa, sont partiellement digérées par des protéases intestinales (Lecadet et Martouret, 1967 ; Tojo et Aizawa, 1983) générant le fragment toxique de 60 à 70 kDa.

### 1.4.2. Liaison au récepteur

Parmi les récepteurs identifiés des toxines Cry1, on retrouve des isoformes de l'aminopeptidase N (APN), une enzyme digestive reliée à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Garczynski et Adang, 1995), des molécules semblables aux cadhérines (Garczynsk et Adang, 2000 ; Schnepf *et al.*, 1998) et des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellule-cellule (Shapiro *et al.*, 1995). Chez *Manduca sexta*, la Cry1Aa se lie à un aminopeptidase N (APN) de 120 kDa (Knight *et al.*, 1994 ; Masson *et al.*, 1995) et à une cadhérine de 210 kDa (Hua *et al.*, 2004 ; Keeton et Bulla, 1997), la Cry1C à un APN de 106 kDa (Luo *et al.*, 1996), et la Cry1Ac à toutes celles-ci (Hua *et al.*, 2004 ; Masson *et al.*, 1995 ; Sangadala *et al.*, 1994) en plus d'une phosphatase alcaline (ALP) de 62 kDa et de deux autres protéines de 140 kDa et 190 kDa (Zhuang *et al.*, 2002). Enfin, la Cry1Ac, qui se lie à l'APN de 120 kDa, n'est retrouvée que

dans les régions résistantes (radeaux lipidiques) au détergent des membranes de bordure en brosse de *Manduca sexta* tandis que les autres protéines spécifiques se retrouvent dans les régions résistantes et solubles (Zhuang *et al.*, 2002). La liaison de la toxine au récepteur se fait en deux étapes, la première réversible (Hofmann *et al.*, 1988a, b), et la seconde irréversible (Ihara *et al.*, 1993 ; Liang *et al.*, 1995 ; Van Rie *et al.*, 1989). On considère que cette dernière étape est l'insertion de la toxine dans la membrane (Ihara *et al.*, 1993 ; Liang *et al.*, 1995 ; Van Rie *et al.*, 1989). En effet, une expérience avec la Cry1Ab dépourvue de domaine I montre qu'elle se lie au récepteur seulement de façon réversible, indiquant que ce domaine est important pour la liaison irréversible (Flores *et al.*, 1997). Récemment, un nouveau modèle de mode d'action des toxines Cry1 a été proposé par le laboratoire d'Alexandra Bravo basé sur des expériences avec la Cry1Ab (Bravo *et al.*, 2004 ; Gómez *et al.*, 2002 ; Zhuang *et al.*, 2002). Ce modèle suggère que l'insertion de la toxine se fasse en deux étapes, la première étant la formation d'un pré-pore oligomérique suite à la fixation de plusieurs monomères à un récepteur cadhérine. Puis, la formation du pore fonctionnel se ferait dans les radeaux lipidiques en se fixant à un APN (Bravo *et al.*, 2004 ; Zhuang *et al.*, 2002 ;). Plus spécifiquement, la cadhérine se fixerait aux boucles 2 et 3 du domaine II tandis que l'APN se fixerait au feuillet  $\beta$ 16 du domaine III (Gómez *et al.*, 2006). Par contre, le processus d'oligomérisation reste encore largement inconnu et plusieurs modèles sont envisageables (Schwartz *et al.*, 1997b). Par exemple, la toxine pourrait former une pré-pore oligomérique avant de se lier à un récepteur spécifique et former un pore. Une autre possibilité serait qu'une seule molécule s'accroche à un récepteur spécifique, et qu'ensuite les conditions soient favorables pour que d'autres molécules s'ajoutent afin de former le pore fonctionnel.

De nombreuses études ont démontré que la liaison de la toxine à un récepteur spécifique est essentielle à la toxicité (Hofmann *et al.*, 1988a, b ; Van Rie, 1989, 1990). En effet, des cellules en culture ont développé une sensibilité à la Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac en leur faisant exprimer un récepteur de type cadhérine (Dorsch *et al.*, 2002 ; Hua *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2005). De plus, l'expression d'un APN du *Manduca sexta* chez le *Drosophila melanogaster* induit une toxicité à la Cry1Ac (Gill et Ellar, 2002). D'autre part, des mutations de l'APN chez le *P. interpunctella* (Zhu *et al.*, 2000), chez le *Helicoverpa armigera* (Wang *et al.*, 2005) et l'absence d'expression de celle-ci chez le *S. exigua* (Herrero *et al.*, 2005) ont été associées à une résistance

de l'insecte face aux toxines Cry.

#### 1.4.3 Modèles d'insertion et caractérisation du pore

En se liant au récepteur, la toxine subira un changement de conformation important qui permettra aux hélices hydrophobes du domaine I de pénétrer et de former un pore dans la membrane en bordure en brosse de l'insecte cible (Schnepf *et al.*, 1998) suite à l'oligomérisation de plusieurs molécules. Deux modèles d'insertion, en parapluie et en canif (Knowles, 1994), ont donc été suggérés pour expliquer la formation de pores (Fig. 2). Dans le modèle en canif, ce sont les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  qui s'insèrent dans la membrane pendant que le reste de la molécule demeure en surface. Par contre, dans le modèle en parapluie, ce sont les hélices  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$ , les hélices les moins polaires du domaine I (Grochulski *et al.*, 1995), qui seraient insérées dans la membrane pendant que le reste du domaine I serait étendu à la surface de la membrane (Knowles 1994 ; Aronson et Shai, 2001), en plus du domaine II et III. Ce dernier modèle est présentement le plus favorisé et plusieurs travaux l'ont corroboré (Biggin et Sansom, 1996 ; Cumming *et al.*, 1994 ; Gazit *et al.*, 1994, 1998 ; Gerber et Shai, 2000 ; Masson *et al.*, 1999).

Un modèle théorique (Schwartz *et al.*, 1997a) a proposé que le pore serait formé d'au moins quatre molécules et que la dimension du pore serait supérieure à 0.6 nm (Fig. 2). En effet, les travaux de Schultz et Solomon en 1961 avaient déjà démontré que le raffinose, qui a un diamètre hydraté de 2.4 nm, peut passer par le pore, indiquant que le diamètre du pore doit être au moins de 2.4 nm. Carroll et Ellar, en 1997, ont même déterminé, en calculant la perméabilité de vésicules de membrane de bordure en brosse, que le rayon varie selon le pH : il passe de 2.4 nm à pH 8.7 à 2.6 nm à pH 9.8. Des études sur des bicouches lipidiques ont aussi déterminé un diamètre similaire de 2.0 à 2.6 nm (Peyronnet *et al.*, 2002). Ainsi, en formant des pores, les toxines du Bt rendent la membrane perméable à une panoplie de cations, d'anions, de sucres et d'acides aminés (English *et al.*, 1991, 1994 ; Kirouac *et al.*, 2002, 2006a ; Schwartz *et al.*, 1993, 1997a,c ; Slatin *et al.*, 1990 ). La première visualisation tri-dimensionnelle de la toxine formant possiblement un pore, obtenue en utilisant un microscope à force atomique (AFM) (Vié *et al.*, 2001), montre une structure tétramérique avec un pore d'environ 1.5 nm de diamètre (Fig. 2).

La formation de pores dans la membrane de bordure en brosse cause l'abolition des gradients

ioniques et entraîne la lyse des cellules (Knowles et Ellar, 1987). Bien que la formation de pores se fasse en quelques minutes, voire secondes, la mort de l'insecte survient quelques jours après une intoxication (Knowles, 1994). Il est intéressant de noter que, bien que l'insecte ne meure pas immédiatement après l'intoxication, il arrête rapidement de s'alimenter, sauvant ainsi les récoltes des ravages de l'insecte nuisible ciblé.

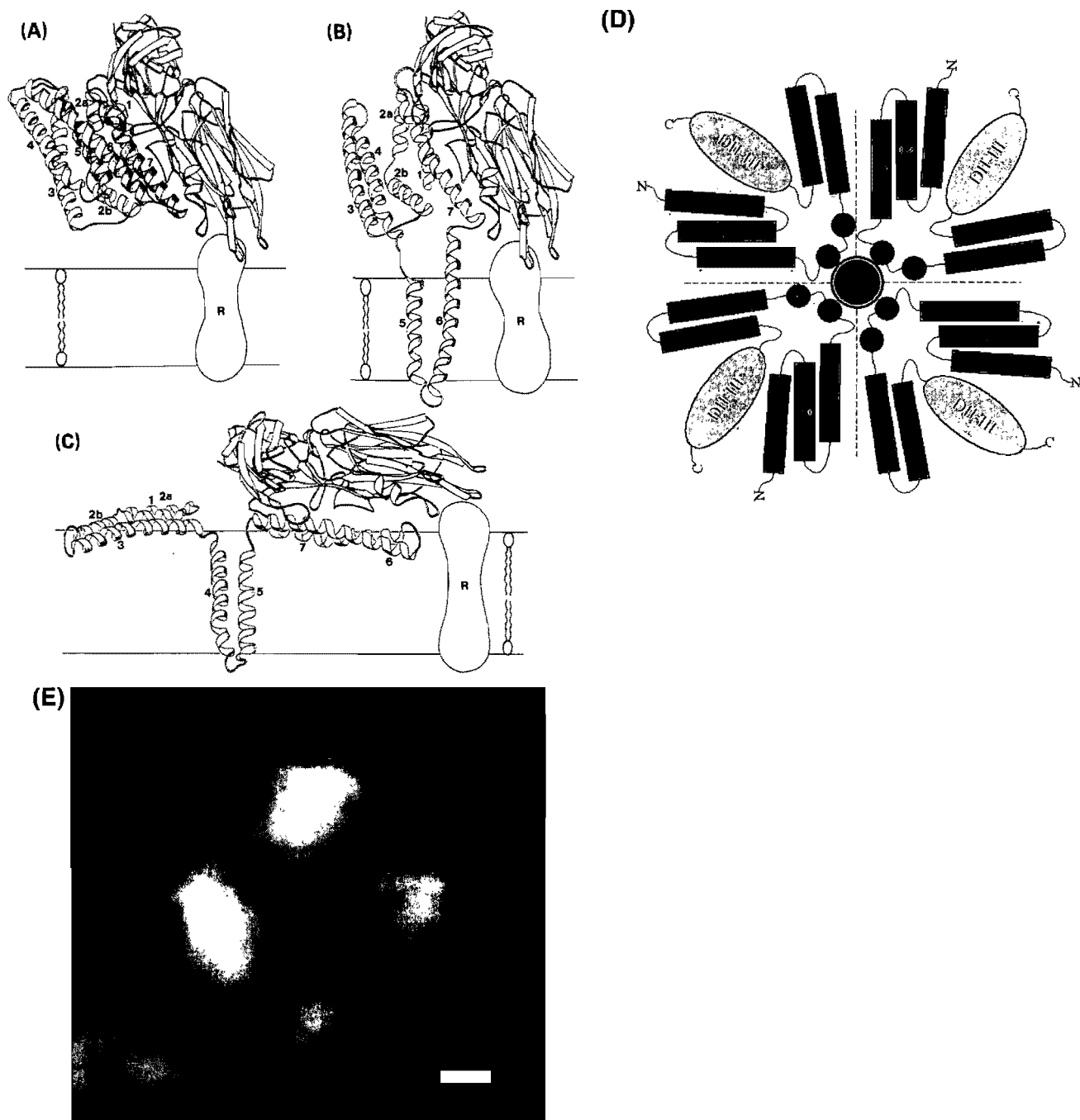


Fig. 2. A), B) et C) Modèles d'insertion (Knowles, 1994) des toxines Cry1. A) Les domaines II et III seraient responsables de la liaison au récepteur. B) Le modèle d'insertion en canif C) Le modèle d'insertion en parapluie D) Modèle d'oligomérisation en tétramère (Schwartz *et al.*, 1997). E) Image AFM tirée de Vié *et al.*, 2001, de la Cry1Aa interagissant avec une bicouche lipidique et suggérant un pore tétramérique de 1.5 nm de diamètre. La barre blanche représente une longueur de 1 nm.

### 1.5 La microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM) est un outil très puissant qui permet d'imager plusieurs types de matériaux à l'échelle nanométrique comme, par exemple, les échantillons biologiques (revue dans El Kirat *et al.*, 2005). Depuis la fin des années 80, l'AFM a été de plus en plus utilisé afin d'observer des échantillons biologiques tels que des membranes, des molécules biologiques ou des réseaux 2D de protéines. Le principe de fonctionnement d'un AFM est simple : il consiste à balayer la topographie d'un échantillon, un peu comme un doigt lisant de l'écriture Braille, à l'aide d'une pointe (d'un rayon d'environ 10 nm) accrochée à l'extrémité d'un levier plus petit qu'un cheveu. Ce levier possède une faible constante de rappel et agit comme un ressort avec une faible constante de Hook. Pendant le balayage, la réflexion d'un signal laser sur l'extrémité du levier est détectée et la moindre surélévation de celui-ci sur l'échantillon provoque un repositionnement vertical par l'entremise d'un système de rétroaction contrôlé par un ordinateur (Fig. 3). La pointe peut être immergée dans l'eau et il est ainsi possible d'observer des échantillons biologiques dans des conditions physiologiques ou quasi-physiologiques, et de visualiser des conformations de protéines jusqu'à une très haute résolution (0.5 nm, Müller *et al.*, 2000). Par contre, ce niveau de résolution est très difficile à obtenir avec des échantillons biologiques puisqu'ils sont habituellement flexibles, fragiles et mous. De plus, la résolution théorique de l'AFM se limite normalement au diamètre de la pointe, c'est à dire environ 10 nm, puisqu'il est en principe impossible de détecter un détail plus petit que l'élément qui effectue le balayage (Howland *et Benatar*, 1993). Afin d'atteindre des résolutions de l'ordre un nanomètre dans des conditions physiologiques, il semble qu'un arrangement compact ou un réseau 2D de protéines soit essentiel (Janovjak *et al.*, 2006). En effet, le réseau 2D permet une périodicité de l'échantillon qui fait en sorte que les irrégularités de la pointe, de l'ordre du nanomètre, entrent en contact étroit avec l'échantillon et révèlent ainsi une résolution nanométrique (Howland *et Benatar*, 1993). De plus, la haute résolution nécessite que l'échantillon soit bien attaché au substrat et que le balayage ne l'abime pas. Un réseau 2D de protéines favorise aussi une rigidité et une stabilité de l'échantillon biologique, contrairement à une membrane ou une cellule qui sont flexibles, et permet donc d'obtenir une résolution optimale. Lorsqu'il s'agit d'observer des membranes ou des protéines dans un arrangement non compact, l'AFM se limite alors à des résolutions de l'ordre de quelques nanomètres (Danker *et al.*, 1997 ; Fotiadis *et al.*, 2004), comme dans la présente étude. Plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'observer des

échantillons biologiques dans différentes conditions et de révéler l'architecture de membranes, cellules et/ou protéines. Par exemple, il y a l'imagerie de membranes naturelles suite à l'excision de la membrane en patch-clamp (Danker *et al.*, 1997), la coupe sériée de tranches minces d'une cellule permettant de révéler sa structure interne en trois dimensions (Chen *et al.*, 2005) ou l'isolation de membranes en utilisant la centrifugation pour caractériser l'organisation tridimensionnelle des protéines G couplées aux récepteurs rodopsin (Fotiadis *et al.*, 2004).

L'AFM se pratique principalement selon deux modes qui possèdent chacun leurs caractéristiques : le mode contact et le mode non-contact. Dans le mode contact, aussi appelé le mode répulsif, la pointe fait pratiquement contact avec l'échantillon. Pendant le balayage, le mode contact force doucement la pointe à se déplacer afin d'accommoder les changements de topographie. Les forces de Van der Waals empêchent les atomes de la pointe de s'approcher trop de l'échantillon, mais, dans le cas d'échantillons biologiques, le mode contact peut facilement le déformer ou arracher une bicouche lipidique. Par ailleurs, le mode non-contact comprend plusieurs techniques de pointes vibrantes. Les pointes vibrent près de leur fréquence de résonance (typiquement de 100 à 400 kHz) avec une amplitude de quelques dixièmes jusqu'à une centaine d'Angstroms. Ensuite, en balayant la surface d'un échantillon, le mode non-contact détecte tout changement dans la fréquence de résonance ou d'amplitude de vibration de la pointe et la replace verticalement pour qu'elle soit toujours à la même distance de l'échantillon. Généralement, ce mode entraîne moins la dégradation de l'échantillon parce que les forces d'interactions impliquées entre la pointe et l'échantillon sont jusqu'à 1000 fois plus faibles qu'en mode contact (Howland et Benatar, 1993). Il est donc préférable d'utiliser ce mode pour des échantillons biologiques qui sont mous et fragiles.

C'est pour cette raison que nous avons utilisé, dans notre étude, un des modes non-contact disponible : le "magnetic alternative cantilever (MAC) mode". Comme le suggère son nom, ce mode utilise une technique magnétique de vibration de la pointe. En effet, un mince film ferromagnétique sur l'extrémité du levier interagit avec une bobine (système de vibration magnétique) installée sous l'échantillon. Le "MAC mode" a l'avantage de ne faire bouger que la pointe au lieu de faire vibrer l'échantillon au complet, qui est utilisé dans le mode appelé "tapping mode".



## Microscope à force atomique (AFM)

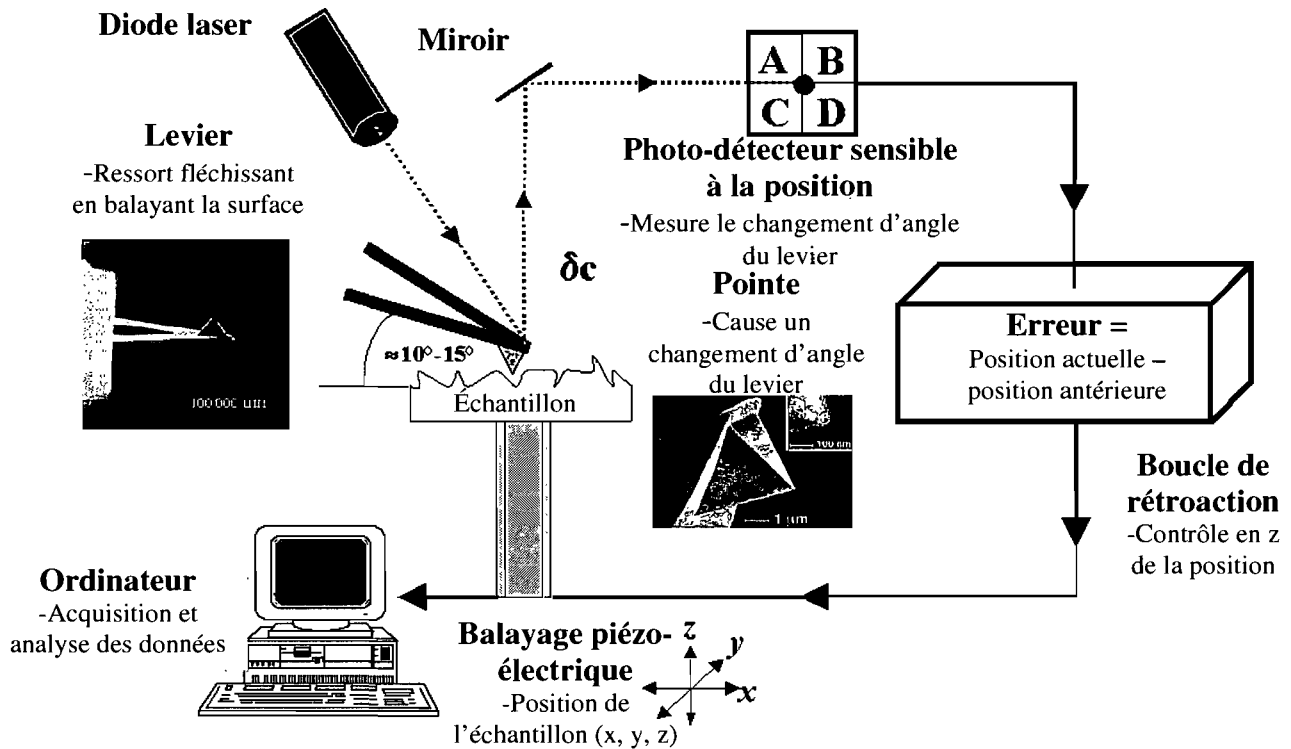


Fig. 3. Schéma du principe de fonctionnement de l'AFM (<http://web.mit.edu/cortiz/www/afm.gif>).

Comme nous avons pu le constater dans ce qui précède, la détermination de l'architecture des pores responsables de l'activité des toxines de Bt a monopolisé beaucoup d'efforts de recherche. Jusqu'à l'utilisation de l'AFM, toutes les approches ont été indirectes. Plusieurs études antérieures ayant montré que les toxines Cry1 s'insèrent dans les membranes sans la présence de récepteurs (Schwartz *et al.*, 1993 ; Peyronnet *et al.*, 2002), deux études, et ce sont les seules jusqu'à présent, ont tenté de visualiser en AFM la formation de structures oligomériques par les toxines du Bt (Puntheeranurak *et al.*, 2005 ; Vié *et al.*, 2001 ;) en utilisant des lipides purifiés ou synthétiques (Vié *et al.*, 2001). Ils ont suggéré, en s'appuyant sur leurs images, que la Cry1Aa forme une structure tétramérique présentant un pore de 1.5 nm de diamètre (Fig. 3). Ces résultats vont dans le sens du modèle théorique de quatre sous-unités proposé par Masson et Schwartz (Schwartz *et al.*, 1997a ; Masson *et al.*, 1999). Par contre, ils ont conclu qu'une large proportion de la toxine serait enfouie dans la membrane, ce qui contredit le modèle du canif ou celui en parapluie (Knowles, 1994). Contrairement aux structures enfouies dans la membrane observées par Vié *et al.* avec la Cry1Aa, la Cry4Ba forme, sur une bicouche lipidique déposée sur le mica, des structures, localisées en bordure des lipides, de 20 à 30 nm de large et 2 à 4 nm de haut (Puntheeranurak *et al.*, 2005).

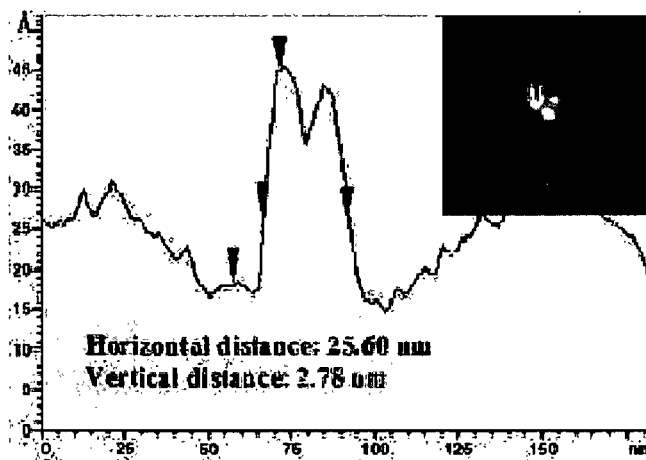


Fig. 4. Structure oligomérique de Cry4Ba de 20 à 30 nm de large et de 2 à 4 nm de haut se formant sur une bicouche lipidique (Puntheeranurak *et al.*, 2005).

## 1.6 Présentation des travaux

Ces deux premières études des toxines Cry1 avec l'AFM ont permis de visualiser les interactions

non spécifiques de toxines du Bt avec des lipides. Afin d'approfondir nos connaissances sur la nature des interactions spécifiques de la toxine avec ses récepteurs et sa membrane cible, et de déterminer l'architecture des pores qu'elles forment dans ces membranes, l'AFM a été utilisé dans le présent travail pour imager quatre toxines de Bt (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1C) interagissant avec des membranes de bordure en brosse de *Maduca sexta*. La Cry1Aa, la Cry1Ac et la Cry1C, qui ont toutes une homologie de séquence au dessus de 67% (Höfte et Whiteley, 1989), sont actives sur les larves de *M. sexta* tandis que la Cry1Ba, qui a une homologie autour de 55% avec ces dernières, n'est pas active sur ce même insecte (Höfte *et al.*, 1988 ; Van Rie *et al.*, 1989). Afin de comparer nos résultats, nous avons aussi étudié l'insertion de la Cry1Aa dans une bicouche de dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine (DPPC-DOPC), c'est-à-dire une membrane lipidique sans récepteurs.

Ces travaux présentent la première démonstration à l'échelle nanométrique des interactions spécifiques des toxines du Bt avec leur membrane cible dans des conditions pseudo-physiologiques. Ces images montrent que les toxines du Bt forment des structures d'environ 35 nm de diamètre et 5.1 à 6.7 nm de hauteur et que leur distribution et organisation au niveau de la membrane varient selon la toxine. Ces différences sont probablement associées à des interactions spécifiques protéine-protéine puisque qu'aucune interaction spécifique n'a été observée avec la Cry1Ba, une toxine inactive sur les larves de *Manduca sexta*.

### **1.7 Contribution des co-auteurs**

J'ai effectué seul la totalité des expériences présentées dans ce mémoire. Une fois par semaine, je discutais avec Raynald Laprade de la direction à donner à mes expériences suite à mes résultats hebdomadaires. Nous avons aussi des rencontres avec Antonella Badia, experte en AFM et en lipides (qui a mis à notre disposition le microscope à force atomique), Michel Lafleur, expert en interactions lipide-protéine, et Jean-Louis Schwartz, expert en Bt, afin de discuter des résultats et des prochaines étapes à suivre. La rédaction de l'article a été faite majoritairement par moi, mais tous les co-auteurs ont contribué à valider ou questionner l'interprétation des résultats, ainsi qu'à la correction de l'anglais.

## Chapitre II

### Imagerie par microscopie à force atomique de toxines Cry1 de *Bacillus thuringiensis* interagissant avec des membranes apicales de l'intestin de *Manduca sexta*

Eric Laflamme, Antonella Badia, Michel Lafleur, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade

Soumis au *Journal of membrane biology* le 14 décembre 2007

Accepté le 23 mars 2008.


#### Résumé

La microscopie à force atomique (AFM) a été utilisée afin d'imager des toxines Cry1 du *Bacillus thuringiensis* (Bt) interagissant avec leur membrane cible, c'est à dire les membranes de bordure en brosse de la larve du *Manduca sexta*. De plus, pour fins de comparaison, ces toxines ont été imagées en interaction avec une bicouche de lipides synthétiques purs de dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine (DPPC-DOPC). Avec la bicouche de DPPC-DOPC, la Cry1Aa forme des structures se retrouvant principalement à l'interface entre deux domaines lipidiques distincts ou en bordure des domaines de DOPC. Les dimensions de ces structures sont d'environ 30 par 60 nm de large et 3 à 7 nm de haut. Avec une préparation de vésicules de membrane de bordure en brosse (BBMV), on observe, sur le mica et en l'absence de toxine, des fragments membranaires plats pouvant atteindre  $25 \mu\text{m}^2$  et 4.2 nm de hauteur. Il est aussi possible de voir, dans ces fragments, des structures irrégulières plus élevées. Après incubation avec la Cry1Aa, la Cry1Ac et la Cry1C, qui sont des toxines actives contre *M. sexta*, de nouvelles structures de 35 nm de large et de 5.1 à 6.7 nm de haut apparaissent sur certains fragments membranaires, parfois dans des régions particulières de ceux-ci. Leur densité sur la membrane, qui atteint un plateau au bout de 4h, dépend de la toxine et de sa concentration. Les structures formées par la Cry1Ac sont souvent groupées selon un arrangement serré à deux dimensions. Aucune interaction spécifique n'a pu être observé avec la Cry1Ba, une toxine inactive contre *M. sexta*. Cette étude fournit la première visualisation à l'échelle nanométrique des interactions entre les toxines de Bt et leur membrane cible. Les structures observées représente vraisemblablement un complexe protéinique formant un pore fonctionnel dans la membrane.

Atomic force microscopy imaging of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins interacting  
with insect midgut apical membranes

Eric Laflamme<sup>1</sup>, Antonella Badia<sup>2</sup>, Michel Lafleur<sup>1, 2</sup>, Jean-Louis Schwartz<sup>1</sup> and Raynald  
Laprade<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GÉPROM and <sup>2</sup>Département de Chimie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Centre ville  
station, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Corresponding author : Raynald Laprade. Université de Montréal, GÉPROM, C.P. 6128, Succ.  
centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Office phone: (514) 343-7924. Lab. phone:  
(514) 343-6111 #3291. Fax number: (514) 343-7146. email : 

## Abstract

Atomic force microscopy (AFM) was used to image *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins interacting with their natural targets, *Manduca sexta* midgut brush border membranes (BBMs), as well as with dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine (DPPC-DOPC) solid-supported lipid bilayers. In lipid bilayers, Cry1Aa formed structures 30- by 60-nm wide and 3- to 7-nm high, mostly at the interface of domains formed by the two different lipids or at the edge of DOPC-enriched domains. Brush border membrane vesicles (BBMVs), in the absence of toxin, formed flat membrane fragments of up to 25  $\mu\text{m}^2$  and 4.2-nm high, with irregular embedded structures. After incubation with Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C, which are active against *M. sexta*, new structures, 35-nm wide and 5.1- to 6.7-nm high, were observed in some membrane fragments, sometimes only in particular regions. Their density, which reached a plateau within 4 h, was toxin- and concentration-dependent. The structures formed by Cry1Ac were often grouped into dense, two-dimensional arrangements. No such specific interactions were observed with Cry1Ba, which is inactive against *M. sexta*. This study provides the first visual demonstration of specific interactions of *Bt* toxins with insect midgut BBMs at the nanometric scale. The observed structures likely represent the protein complexes forming functional *Bt* pores in target membranes.

**Keywords** : Brush border membrane, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1C, target membrane, BBMV.

## Introduction

Delta endotoxins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are presently the most widely used biological insecticides (Schnepf *et al.*, 1998 ; Whalon and Wingerd, 2003). Following ingestion by the larvae, solubilisation in the gut and activation by intestinal proteases, the toxin binds to receptors at the apical membrane of the midgut epithelium and inserts into the membrane to form pores that abolish transmembrane ionic and electrical gradients, leading to cell death (Knowles and Ellar, 1987). However, several details of the mode of action of *Bt* toxins remain largely unknown, in particular the oligomerization step that leads to the formation of functional pores in the membrane. Structural models have been proposed in which several toxin molecules come together to form a pore (Hodgman and Ellar, 1990 ; Gill *et al.*, 1992) and the first spatial arrangement of domain-I helices of Cry1Aa toxin in lipid bilayers was suggested (Schwartz *et al.*, 1997a) and, subsequently, refined (Masson *et al.*, 1999). These oligomeric models were based on X-ray crystallography data of the three-domain Cry3Aa and Cry1Aa toxins (Li *et al.*, 1991 ; Grochulski *et al.*, 1995). However, the actual arrangement of the toxin molecules in artificial lipid bilayers with or without receptors, in native apical membranes, or *in vivo*, may be quite different. Furthermore, recent studies suggest a two-step insertion process in which an oligomeric prepore is formed first, when several toxins bind to cadherin receptors anchored to the membrane by a single transmembrane segment. In the second step, functional membrane pores are formed in lipid rafts, following the binding of the prepore complexes to aminopeptidase N (APN) receptors attached to the rafts by their glycosylphosphatidylinositol (GPI) tails (Zhuang *et al.*, 2002 ; Bravo *et al.*, 2004).

Atomic force microscopy (AFM) is a recent, powerful tool that allows the imaging of various types of materials at the nanometric scale, including soft biological samples (reviewed in El Kirat *et al.*, 2005). Indeed, lipid bilayers, natural membranes as well as proteins have been imaged by AFM. In addition, lateral resolution of up to 0.5 nm could be obtained with proteins forming regular two-dimensional arrays (Müller *et al.*, 2000). Several experimental approaches have been used, such as patch-clamp pipette excision to isolate and image membranes and protein complexes (Danker *et al.*, 1997), serial thin-sectioning of single cells to reveal their inner ultrastructure (Chen *et al.*, 2005) or isolation of disc membranes by centrifugation to investigate

the organization of the G-protein-coupled rhodopsin receptor in the native membrane (Fotiadis *et al.*, 2004). Of particular interest to the area of *Bt* toxin assembly characterization, Cry1Aa, a *Bt* toxin active against caterpillars, and Cry4Ba, a *Bt* toxin that kills mosquito larvae, have been visualized by AFM after being inserted into supported purified or synthetic lipid monolayers or bilayers (Vié *et al.*, 2001 ; Puntheeranurak *et al.*, 2005). While there is presently no information on how many toxin molecules form the pores, and whether receptor proteins participate in their architecture, the toxins appeared to associate and form tetrameric structures (Vié *et al.*, 2001), supporting the 4-subunit model proposed earlier for the *Bt* pore (Schwartz *et al.*, 1997a ; Masson *et al.*, 1999).

These previous AFM studies implicated non specific interactions between *Bt* toxins and purified or synthetic lipids. In order to address the specificity of these toxins to their target membranes and to elucidate further the structures they form in these membranes in their aqueous environment, AFM was used to image these proteins in the presence of the midgut brush border membrane (BBM) from tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*, Lepidoptera). Three related Cry1 toxins (Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C), all active against *M. sexta* larvae and sharing at least 67% amino acid identity (Höfte and Whiteley, 1989), were used for these studies, as well as Cry1Ba (55-58% or more identity with the former) to which the larvae are not sensitive (Höfte *et al.*, 1988 ; Van Rie *et al.*, 1989). For comparison, the insertion of Cry1Aa into supported Dipalmitoylphosphatidylcholine-dioleoylphosphatidylcholine (DPPC-DOPC) bilayers formed by liposome deposition on mica was also investigated. This work provides the first visual demonstration at the nanometric scale of the interaction between *Bt* toxins and their target native membranes under pseudo-physiological conditions. It shows that the toxins form structures approximately 35-nm in diameter and 5.1- to 6.7-nm in height and that the distribution and organization of these structures varies depending on the toxin. These differences are likely related to specific protein-protein interactions, whereas no such interactions were observed with Cry1Ba, which is not toxic to the target insect.



## Materials and Methods

### Chemicals

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), and phospholipase A2 (PLA2) from honeybee venom (P9279), was obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

### Toxins

The Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1C and Cry1B toxins were obtained from *Bt* strains producing the appropriate single recombinant toxins. The toxins were solubilised, trypsin-activated and purified by fast protein liquid chromatography as described elsewhere (Masson *et al.*, 1989 ; Masson *et al.*, 1994). Stock solutions were prepared in 25 mM Tris-HCl (pH 9.4) at a concentration of 2 mg/ml and kept at 4 °C. They were diluted to the appropriate concentrations in 10 mM HEPES-KOH, pH 7.5, the normal experimental solution (NES).

### Brush border membrane vesicles

Whole midguts were isolated from fifth-instar *M. sexta* larvae (North Carolina State University, Department of Entomology Insectary, Raleigh, NC), freed of attached Malpighian tubules, and cleared of their contents. They were rinsed thoroughly with ice-cold 300 mM sucrose, 17 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 5 mM EGTA, and stored at -80 °C until use. Brush border membrane vesicles (BBMVs) were prepared using a magnesium precipitation and differential centrifugation technique (Wolfersberger *et al.*, 1987). The final membrane preparation was resuspended in NES at a final stock suspension concentration of 0.5 mg/ml of protein and stored at -80 °C until use.

### Formation of supported DPPC/DOPC bilayers and deposition of brush border membranes

Multilamellar liposomes were prepared from stock solutions of DOPC and DPPC in chloroform (1 mg/ml). Two ml of a 1:1 mixture (v/v) of DPPC/DOPC were dried under nitrogen and was left

under vacuum for at least 16 hours. The lipids were reconstituted in 2 ml diluted phosphate saline buffer (dPBS) containing 2.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 16.7 mM NaCl, pH 7.4, to a final concentration of 1 mg/ml. Small liposomes were prepared by sonication at 60 °C for 12 minutes. For Cry1Aa toxin-enriched liposomes, 5 to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of toxin was added to the liposome suspension immediately after sonication, after which the suspension was vortexed for 1 minute and allowed to settle for 30 minutes. Pure liposomes or toxin-enriched liposomes were then deposited on freshly cleaved mica and incubated at 60 °C for 2 hours to form, through liposome fusion, a supported bilayer which was then rinsed with dPBS, ready for imaging.

For BBM deposition, a BBMV stock suspension was diluted in NES to a final concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  protein (final volume of 400  $\mu\text{l}$ ), incubated overnight on mica at room temperature and rinsed with NES prior to imaging. Overnight incubation significantly increased the probability of finding membrane fragments on the mica surface and proved practical given the long duration of the experiments due to the time required to locate the membrane fragments, image them in the absence of toxin and then after as much as 4 additional hours.

### **Atomic force microscopy imaging**

AFM imaging was performed at room temperature in the magnetic alternating current (MAC) mode using a PicoSPM microscope (Molecular Imaging, Tempe, AZ) equipped with a 30- $\mu\text{m}$  scanner and a fluid cell. AFM tips (MAC levers T1, Molecular Imaging) with nominal spring constants of either 0.95 N/m or 0.6 N/m were used. The cantilever frequency was between 20 and 60 kHz and the scanning rate between 1.15 and 2.0 Hz. Except for toxin-enriched liposome preparations, imaging was always performed before addition of the toxin, either with the supported bilayer or with BBMs alone. After withdrawing the AFM tip by 5  $\mu\text{m}$  and turning off the drive of the MAC mode controller, toxin (500  $\mu\text{l}$  of either 8 or 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of toxin in NES) was added in the fluid cell through a solution exchange system made of a small polyethylene tube (0.86 mm inside diameter) and a 1-ml syringe, and the same area of the BBM sample was imaged. Each sample was incubated with either 8 or 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of toxin for one and four hours,

and in some experiments, for two hours. After each incubation period, the preparation was rinsed with NES and the same observation area was imaged in this solution for variable periods of time (20-120 min). Each experimental condition was repeated at least 10 times. Given the intrinsic size overestimation by the AFM tip in the horizontal plane (Markiewicz and Goh, 1994), the diameter of the observed structures was defined as their width at half height. Measurements are given as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Results and Discussion

### Imaging of Cry1Aa toxin on DPPC-DOPC bilayers

The interaction of Cry1Aa toxin with a DPPC-DOPC (1:1 v/v) bilayer deposited on mica by liposome fusion was investigated (Milhiet *et al.*, 2001). In the absence of toxin, the substrate was almost completely covered by the bilayer. Figure 1A shows a typical image where three height levels are observed corresponding to bare mica (dark brown), fluid-phase DOPC-enriched (light brown) and gel/solid-phase DPPC-enriched domains (yellow-brown). The bilayer consisted, at room temperature, of DPPC-enriched domains in the gel phase, surrounded by DOPC-enriched matrix in the fluid phase, as evidenced by the difference of their measured thickness above the mica surface ( $5.6 \pm 0.3$  nm ( $n = 8$ ) vs  $4.2 \pm 0.2$  nm ( $n = 8$ ), respectively) (Fig.1A). DPPC-enriched represented about 22%, DOPC-enriched ones, 72% and mica, 6% of the total surface, consistent with other observations of mixtures of gel and fluid phase lipids (Milhiet *et al.*, 2006; Rinia *et al.*, 2001). After a two hour incubation of the DPPC-DOPC bilayer with Cry1Aa, either at room temperature or at 55 °C to promote toxin incorporation, no structural changes were observed. With toxin-enriched liposomes, bilayer coverage of the mica surface was only partial (Fig.1B) and appeared to be inversely related to toxin concentration (not shown) likely due to preferential interaction of the toxin with the DOPC-enriched fluid phase and consequent interference with the fusion process. Indeed, in the typical image shown in Fig. 1B, at a toxin dose of 40  $\mu$ g/ml, DPPC-enriched domains covered about 33%, DOPC-enriched domains, 27% and mica, 40% of the total image area. However, in this case, a few isolated structures of about 30 nm x 60 nm with heights varying from 3 to 7 nm were observed protruding from the bilayer surface, mostly at the interface of the DPPC-DOPC regions, as well as at the periphery of DOPC

domains alone (Fig.1B). As shown in Fig. 1C, D and E, these structures appear to be composed of smaller substructures, as demonstrated by the vertical profile lines shown below the AFM images. These assemblies may represent oligomers of several toxin molecules.

Previous studies (Schwartz *et al.*, 1993 ; Peyronnet *et al.*, 2002) have shown that Cry1 toxins insert into lipid bilayers and form pores in the absence of *Bt* receptors. Of particular interest to the present study is the first attempt to visualize the architecture of the pores formed by Cry1Aa toxin in a lipid bilayer environment using AFM imaging (Vié *et al.*, 2001). The images showed toxin aggregates of 30 to 100 nm in diameter. In addition, substructures could be resolved, primarily at the periphery of these aggregates suggesting a tetrameric arrangement with a central depression of 1.5 nm in diameter, and with a large part of the toxin molecules likely imbedded in the bilayer. In the latter study, the toxin was first allowed to insert into a monolayer at the air/water interface, followed by the deposition of the latter onto a second monolayer supported on mica. This insertion process was different from the actual mechanism in which the toxin partitions into a free-standing bilayer membrane directly from the aqueous phase. In the only other AFM study with *Bt* Cry toxins, Cry4Ba, was found to form, in supported bilayers, structures of 20 to 30 nm in cross-section and 2 to 4-nm high that were preferentially localized along the edges of membrane defects (Puntheeranurak *et al.*, 2005). In the latter study as well as the present one, substructures at the nm-scale resolution could not be observed. This limited resolution may be linked to the particular geometry of these protein molecules over and into the lipids. Limited resolution may also be a characteristic of imaging isolated proteins, as inspection of recent literature strongly suggests that extended two-dimensional arrays or closely packed arrangements are a prerequisite for high-resolution AFM imaging of membrane proteins (Janovjak *et al.*, 2006).

### **Imaging of brush border membranes from *M. sexta* midgut**

To mimic the biological situation, we proceeded to image *M. sexta* midgut BBMs. These membranes contain the receptors that bind *Bt* toxins and promote pore formation (Schnepf *et al.*, 1998). We have used the same brush border membrane preparation under the same environmental conditions as used in our osmotic swelling permeabilization assays (Fortier *et al.*,

2007). After incubation with the BBMV solution, the mica was mostly covered by irregularly dispersed bumps of heights varying from a few to hundreds of nanometers, which could possibly represent unfused vesicles (Wielert-Badt *et al.*, 2002) or protein aggregates after membrane remodeling, namely lateral segregation of lipids in a fluid phase (Fig. 2). From time to time, larger flat areas were also seen (one to two regions on a scanned surface of  $250 \mu\text{m}^2$ ), with a surface area ranging from 1 to  $25 \mu\text{m}^2$  and a height of  $4.2 \pm 0.1 \text{ nm}$  ( $n = 15$ ) (Fig. 2). Moreover, thicker flat domains of  $5.1 \pm 0.1\text{-nm}$  in height ( $n = 8$ ) and up to  $1 \mu\text{m}^2$ , indicative of lipid phase separation, were also detected within these flat areas (Fig. 3). Interestingly, this difference in thickness of about 1 nm between thinner and thicker regions of the bilayer is identical to that observed on synthetic lipid mixtures of phosphatidylcholine with sphingolipids and cholesterol, mimicking biological membrane lipid rafts (Rinia *et al.*, 2001, Zhuang *et al.*, 2002). Furthermore, the flat areas also contained higher and irregular regions of various dimensions that sometimes appeared as ring-like domains containing more of these higher structures which may represent protein aggregates (Fig. 2). Phospholipase A2 (PLA2) was used to confirm the lipidic nature of these flat areas. PLA2 is an interfacially active, calcium-dependent enzyme which catalyzes cleavage of the *sn*-2 ester linkage of glycerophospholipids, yielding fatty acid and lysophospholipid (Six and Dennis, 2000). Following the addition of PLA2 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), gradual erosion of the flat areas was observed (Fig. 4), in a way similar to that reported for phospholipid bilayers (Moraille and Badia, 2005), demonstrating the essentially phospholipidic nature of the eroded areas. From the above, it appears that the flat areas originate from fragments of BBMV material deposited onto mica, with the smooth domains being bilayers of native lipid, the higher ones with longer chain lipids. These membrane fragments likely result from the fusion of BBM patches or BBMVs. On the other hand, the irregular regions are likely constituted by protein aggregates (Schillers *et al.*, 2001 ; Fotiadis *et al.*, 2004).

### **Imaging of Cry1 toxins on *M. sexta* midgut brush border membrane fragments**

The presence of native membrane material and its receptors was expected to promote *Bt* toxin interaction with the membrane, thereby increasing the toxin density at the surface of the membrane, which should favor the observation of toxin molecules by AFM. After incubation with either 8 or  $40 \mu\text{g/ml}$  of Cry1Aa, a toxin active against *M. sexta*, new structures were

observed that were limited either to certain membrane fragments or to fragment regions (Fig. 5), suggesting specific interactions with these areas, likely through the toxin receptors or other specific membrane proteins or lipids. Similar results were obtained with two other toxins active against *M. sexta*, Cry1Ac and Cry1C, at the same doses as above. Such structures were never observed when identical protocols were conducted in absence of toxin (control conditions). For Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C, the number of structures on the membrane fragments increased with incubation time, and reached a plateau within four hours (Figs. 6 and 7). In certain cases, a few of these structures were closely grouped together (Figs. 5B and 7, blue arrows), suggesting a cluster-like organization as reported elsewhere (Peyronnet *et al.*, 2002). The height of these structures over the membrane surface was  $5.4 \pm 0.2$  nm for Cry1Aa ( $n = 70$ ),  $6.7 \pm 0.2$  nm for Cry1Ac ( $n = 37$ ) and  $5.1 \pm 0.5$  nm ( $n = 8$ ) for Cry1C (Table 1). Their diameters were estimated to be  $36.2 \pm 0.8$  nm ( $n = 70$ ) for Cry1Aa,  $34.6 \pm 1.5$  nm ( $n = 37$ ) for Cry1Ac and  $39 \pm 4$  nm ( $n = 8$ ) for Cry1C (Table 1). These dimensions did not depend on toxin concentration. Interestingly, these structures appear quite similar to those observed on DPPC-DOPC bilayers. This result can be set in parallel with the finding of similar pore sizes determined in functional assays on planar receptor-free lipid bilayers and on receptor-containing brush border membrane vesicles (Peyronnet *et al.*, 2002, Tran *et al.* 2001). Similarly, previous single ion channel measurements on planar lipid bilayers showed similar values of conductance in the presence or absence of purified toxin receptors (Schwartz *et al.*, 1997b). Together, these findings strongly suggest that the general features of the pore architecture in the membrane are similar, whether the receptors are present or not. The AFM-measured values, when compared to X-ray crystallography data of Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) which indicates that a single toxin molecule in solution measures  $8.0 \times 5.5 \times 5.5$  nm, suggest that the observed structures contain most likely several toxin molecules possibly with a large portion of each molecule lying on the membrane surface (Schwartz *et al.*, 1997a, Masson *et al.*, 1999). The oligomerization mechanism of Cry1 toxins is still largely unknown and several schemes have been envisaged (Schwartz and Laprade, 2000). For example, the toxin molecules could form an oligomeric prepore either before, or after docking onto a particular receptor (e.g. a cadherin in the case of Cry1Ab (Bravo *et al.*, 2004). Alternatively, oligomerization may be a progressive process taking place in the membrane, starting with a single toxin molecule binding to its receptor and inserting into the membrane, followed by the sequential addition of other toxin molecules. Such a process may well

correspond to what is illustrated in Fig. 6, where the observed structures increased in size, up to about 35 nm in diameter, as a function of time.

In order to characterize the appearance of these structures on membrane fragments and attempt to identify and quantify differences in the way these toxins interact with their target membrane, our observations were divided into four categories (Table 2) : [1] fragments that show no obvious structures; [2] fragments in which structures are observed mostly at their edges, i.e., either at the periphery of the fragments or at the edges of defects created by AFM tip erosion ; [3] fragments in which structures are observed both on the surface and the borders of the fragments but with a clear preponderance for the surface and [4] fragments in which structures form dense two-dimensional (2-D) arrangements. Each experiment consisted of observations of the same fragments after one hour and four hours of incubation with a single dose (either 8 or 40  $\mu\text{g/ml}$ ) of each toxin. For each toxin and each concentration, 10 membrane fragments were imaged. With Cry1Aa, after an incubation time of one hour, 1 of the 10 observed membrane fragments showed structures distributed over most of their area at 8  $\mu\text{g/ml}$ , and two of them at 40  $\mu\text{g/ml}$  (Table 2). At 40  $\mu\text{g/ml}$ , incubating the toxin for four hours did not increase the surface coverage, suggesting a saturating mechanism. On the other hand, larger toxin concentrations and longer incubation times increased the probability of toxin insertion at the edges of the membrane fragments. The number of membrane fragments (out of 10) observed with the toxin mainly at their edges increased from none after one hour to 5 after four hours at 8  $\mu\text{g/ml}$ , and from 5 after one hour to 8 after four hours at 40  $\mu\text{g/ml}$ . In situations such as those of Fig. 5 and Fig. 6, where a good coverage of the fragment surface by the toxin structures was obtained (category 3 above), 89% presented a density of 40 to 60 structures/ $\mu\text{m}^2$ , which could represent an estimate of the density of Cry1Aa *Bt* receptors in particular regions of the *M. sexta* midgut apical membrane.

In contrast to Cry1Aa, Cry1Ac did not form evenly distributed structures on the surface of the membrane fragments (Table 2). However, like Cry1Aa, Cry1Ac formed structures at the edges of the fragments, and its density and distribution depended on toxin concentration and incubation time (Table 2). Indeed, while at 8  $\mu\text{g/ml}$  and after one hour incubation virtually no structures were observed at the edges, 3 fragments out of 10 showed such structures after four hours. At 40  $\mu\text{g/ml}$ , 5 fragments out of 10 showed toxin structures at the edges after one hour, similar to

Cry1Aa. Also, in contrast to Cry1Aa, Cry1Ac, at 40  $\mu\text{g/ml}$ , formed dense 2-D arrangements on 1 fragment out of 10 after one hour and on 7 fragments out of 10 after four hours (Table 2 and Figs. 7 and 8). The height of these 2-D arrangements was  $6.1 \pm 0.3$  nm ( $n = 5$ ), similar to that of the single structures formed by Cry1Ac ( $6.7 \pm 0.2$  nm,  $n = 37$ ) (Table 1). It appears that the formation of these arrangements is initiated by a few isolated toxins mostly located at the edges of the fragments, in a time- and dose-dependent manner, eventually reaching saturation (Fig. 7). Indeed, addition of more Cry1Ac toxin after formation of dense 2-D arrangements did not increase their size (not shown), suggesting a limited number of specific binding sites on the toxin structures and/or the membrane. Cry1Ac thus demonstrates a much higher level of toxin-toxin interaction than Cry1Aa.

With Cry1C, good surface coverage (category 3 above, Table 2) was never observed after one hour, either at 8  $\mu\text{g/ml}$  or at 40  $\mu\text{g/ml}$ . However, after four hours, a good coverage was observed on 1 out of 10 fragments with 8  $\mu\text{g/ml}$  of the toxin, and on 2 fragments out of 10 at 40  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 9 and Table 2), similar to what was observed with Cry1Aa after four hours (Figs. 5 and 6). Like Cry1Aa and Cry1Ac, Cry1C interacted with the membrane fragments at the edges, but to a lesser extent. Indeed, the percentage of fragments showing Cry1C structures at their edges did not change (1 out of 10) between one and four hours of 8  $\mu\text{g/ml}$  toxin exposure, and increased slightly (from 2 fragments to 3, out of 10) between one and four hours of exposure to 40  $\mu\text{g/ml}$  Cry1C.

Cry1Aa toxin distribution in particular regions of some fragments (Fig. 5B, D, E and F) strongly suggests that its receptors are localized in these regions, although the latter could not be imaged in the absence of toxin, possibly because of their flexibility over the BBM, like that of GPI-anchored proteins (Ikezawa, 2002). Indeed most of these receptors are members of the APN, ALP or cadherins families, the two former types being attached to the membrane by a highly flexible GPI-anchor whereas the latter possess a single membrane-crossing region (Wheelock and Johnson, 2003). On the other hand, certain membrane fragments were devoid of toxins (Table 2). It is possible that the imaged BBMs originated from different regions of the midgut, which would potentially affect the receptor type and density found in AFM samples. Furthermore, BBMV deposition on mica, followed by the formation of a single bilayer



membrane, may not always result in the outside-out configuration in which receptors would be properly exposed to the bathing solution and thus, to the toxins. Therefore, the number and the availability of the receptors may be different under our AFM conditions from those found either in binding or light-scattering assays on BBMV, or in planar lipid bilayer experiments in which BBMV were reconstituted. Nevertheless, our data clearly demonstrate that AFM images of BBMs in the presence of *Bt* toxins are dramatically different from those of BBMs alone and that the toxin interacts only with certain regions of the membrane fragments. This provides the first AFM evidence for the existence of specific interactions between *Bt* toxins and target insect midgut membranes.

Detergent resistant microdomains of plasma membrane, or lipid rafts, have been proposed as a critical site in the mode of action of the *Bt* toxin Cry1Ab, i.e. the site of toxin pre-oligomer binding to APN and insertion into the gut membrane (Bravo *et al.*, 2004). Such lipid rafts have been imaged by AFM in artificial lipid mixtures (Yuan *et al.*, 2002 ; Milhiet *et al.*, 2002 ; Giocondi *et al.*, 2000), but their biological existence or relevance is still a matter of debate (Heerklotz, 2002 ; Munro, 2003). Detailed analysis of lipids bound to APN from *M. sexta* BBM, which act as receptors of Cry1Ac and Cry1C toxins, revealed that long, unsaturated-chain free fatty acids and diacylglycerol are involved (Sangadala *et al.*, 2001) while detergent-insoluble lipids extracted from *M. sexta* and *Heliothis virescens* midgut BBMV showed a large amount of cholesterol and sphingomyelin (Zhuang *et al.*, 2002). Such a mixture of lipids may also be present in our AFM samples and explain the different domains that were observed, some differing in height by about 1 nm. In our experiments, however, the higher lipidic domains seemed to be largely deprived of the toxin structures (Fig. 5D, E and F), suggesting that the toxin receptors are localized in the lower domains. The *Bt* toxin molecules may actually be considered as reporters of the presence on the brush border membrane of the *Bt* receptors to which they bind. Our data suggests therefore that these receptors are localized in the lower areas of the lipid surface and that their distribution depends on the receptor-toxin pair under consideration.

### *Toxin dose*

Interestingly, while Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ba and Cry1C toxins have been shown to form ion channels in receptor-free planar lipid bilayers at 5-10  $\mu\text{g/ml}$  doses, much lower toxin concentrations were required either when a *Bt* receptor complex from *M. sexta* was reconstituted in the membranes (20-100 ng/ml Cry1Ac (Schwartz *et al.*, 1997b) or when *Lymantria dispar* (gypsy moth, Lepidoptera) BBMV's were fused to the bilayers (60-80 ng/ml Cry1Aa) (Peyronnet *et al.*, 2001). In the former case, native lipids were associated with the receptor (Sangadala *et al.*, 2001) and in the latter case, the planar lipid bilayers were enriched with several *Bt* receptors and other membrane proteins in addition to native lipids, including possibly some structural proteins (Terra *et al.*, 2006 ; Kirouac *et al.*, 2006). In the present AFM study, rather high doses (8 and 40  $\mu\text{g/ml}$ , i.e., in the range of those used in receptor-free planar lipid bilayer experiments) were required to observe the interaction between *Bt* toxins and BBMs. In addition, the time course of these interaction was considerably longer than that needed for pore formation in membrane vesicles (Fortier *et al.*, 2007 ; Fortier *et al.*, 2005 ; Vachon *et al.*, 2004). This may be related to the difference in sensitivity of the methods. Indeed, permeability measurements are very sensitive whereas in AFM, a certain number of structures must be present on a given surface to allow the observer to identify their presence with a reasonable level of certainty. Alternatively, this may result from the fact that the fluidity of the membrane was reduced due to the vicinity of the mica substrate, thus reducing the probability of insertion of the toxin (Stottrup *et al.*, 2004). It could also be due to long range repulsive electrostatic forces exerted by the negatively charged mica. These would be significant at the low ionic strength used in the present experiments which is that used in permeability essays (Fortier *et al.*, 2005 ; Müller *et al.*, 1999). The need for high doses may be related also to a lower accessibility of the receptors at the sample surface.

### *Toxin specificity*

To verify the specificity of the interactions of Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C with the membrane fragments, Cry1Ba, a toxin that is inactive against *M. sexta*, was tested. At the maximum concentration and incubation time used, no structures were observed on 9 of the 10 membrane fragments. Moreover, when observed, the structures were sparse and located at the edge of the

lipid areas and in defects of the membrane fragments (not shown). The fact that Cry1Ba, for which there is no receptor in *M. sexta* midgut (Höfte and Whiteley, 1989), could only be observed at edges and defect sites under maximum concentration and incubation time seems to indicate that this protein interacted directly with the lipids, similar to what has been observed electrophysiologically in planar lipid bilayers (Schwartz *et al.*, 1997b).

The relation between the *Bt* toxin deposition patterns observed on the AFM images and the localisation of their receptors on the midgut apical membrane may be relevant to the *in vivo* specificity of *Bt* toxins. The fact that the Cry1Aa and Cry1C receptors are likely to be more numerous in BBMs than the Cry1Ac receptors (Höfte and Whiteley, 1989 ; Höfte *et al.*, 1988 ; Van Rie *et al.*, 1989 ; Van Rie *et al.*, 1990) could explain the evenly distributed patterns observed with the two former toxins and their absence with the latter. Indeed, good surface coverage was attained with Cry1Aa and Cry1C. Interestingly, Cry1Ac was the only of the three toxins that formed dense 2-D surface arrangements, which may be related to the higher toxicity of this protein (reviewed in Tran *et al.*, 2001). For this protein, favorable conformation changes may have promoted toxin-toxin interaction of free toxin molecules, either with those inserted at the edges of membrane fragments, which would explain the way these 2-D arrangements developed from the fragment edges, or with other toxin molecules bound to their receptors, resulting in the dense 2-D arrangements observed. Finally, the observation of the various toxins, including Cry1Ba, at the edges of the membrane fragments, is likely related to facilitated toxin-lipid interaction in membrane defect areas. These are known to promote protein-lipid interactions (Puntheeranurak *et al.*, 2005). Taken together, these observations strongly suggest that Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C interactions with the membrane fragments are specific and most likely mediated through membrane receptors and toxin-toxin interactions. However, the different patterns of interaction of these three toxins with the membrane suggest that they associate with different receptor molecules or toxin regions.

## Conclusion

This study provides the first visualisation of the interaction between *Bt* toxins and BBMs derived from midgut cells of *M. sexta* larvae. These membranes are the natural targets of *Bt* toxins which

have been shown to bind to specific receptors located on their surface, and in a subsequent step, to form pores and permeabilize the membranes, leading to cell swelling and lysis. AFM measurements established that Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C proteins, three closely related toxins active against *M. sexta*, formed structures approximately 35-nm in diameter and 5.1- to 6.7-nm in height after exposure of the BBMs to the toxins. The three toxins did not interact in the same way with the BBM, neither in terms of kinetics nor localization and assembly. In addition to toxin-toxin and toxin-lipid interactions, these structures, in regions where they are evenly distributed, appear to be formed largely through toxin-receptors interactions, thus possibly making the toxin molecules the reporters of their receptors, and therefore providing an indirect way to visualize both the location and density of these receptors on the BBM. Our data therefore suggest that these receptors are localized in the thinner regions of the lipid surface observed by AFM and that their distribution depends on the receptor-toxin pair under consideration. Finally, the dimensions and distribution of the toxins imaged by AFM on natural midgut membrane may well reflect those of the functional pores formed by *Bt* proteins *in vivo*.

## Acknowledgements

We thank Stéphanie Juneau (Department of Astronomy, University of Arizona), who initiated the project as a research trainee, Patricia Moraille and Jacqueline Sanchez, Department of Chemistry, Université de Montréal, for technical advice on AFM, Lucie Marceau, Marc Juteau and Mireille Marsolais, Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, for producing the purified *Bt* toxins and for other technical support. We are indebted to Frédéric Girard, Martin Kirouac and Vincent Vachon for stimulating discussions.

Eric Laflamme was supported by a scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT).

## References

- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S., and Soberon, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1667:38-46.
- Chen, Y., Cai, J. Y., Zhao, T., Wang, C. X., Dong, S., Luo, S. Q., and Chen, Z. W. 2005. Atomic force microscopy imaging and 3-D reconstructions of serial thin sections of a single cell and its interior structures. *Ultramicroscopy*. 103:173-182.
- Danker, T., Mazzanti, M., Tonini, R., Rakowska, A., and Oberleithner, H. 1997. Using atomic force microscopy to investigate patch-clamped nuclear membrane. *Cell Biology International*. 21:747-757.
- El Kirat, K., Burton, I., Dupres, V., and Dufrene, Y. F. 2005. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*. 218:199-207.
- Fortier, M., Vachon, V., Kirouac, M., Schwartz, J. L., and Laprade, R. 2005. Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Journal of Membrane Biology* 208:77-87.
- Fortier, M., Vachon, V., Marceau, L., Schwartz, J. L., and Laprade, R. 2007. Kinetics of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Biochimica Biophysica Acta-Biomembranes* 1768:1291-1298.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., and Palczewski, K. 2004. The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Letters*. 564:281-288.
- Gill, S. S., Cowles, E. A., and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Giocondi, M. C., Vie, V., Lesniewska, E., Goudonnet, J. P., and Le Grimellec, C. 2000. In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology* 131:38-43.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., and Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology*. 254:447-464.

- Heerklotz, H. 2002. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophysical Journal* 83:2693-2701.
- Hodgman, T. C., and Ellar, D. J. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by computational analysis. *DNA Sequence-J. DNA Sequencing and Mapping*. 1:97-106.
- Höfte, H., and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53:242-255.
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H., and Vaeck, M. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental Microbiology*. 54:2010-2017.
- Ikezawa, H. 2002. Glycosylphosphatidylinositol (Gpi)-Anchored Proteins. *Biological-and-Pharmaceutical-Bulletin* 25:409-417.
- Janovjak, H., Kedrov, A., Cisneros, D. A., Sapra, K. T., Struckmeier, J., Muller, D. J. 2006. Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. *Neurobiology of Aging*. 27(4) : 546-561.
- Kirouac, M., Vachon, V., Fortier, M., Trudel, M. C., Berteloot, A., Schwartz, J. L. and Laprade, R. 2006. A mechanical force contributes to the "osmotic swelling" of brush-border membrane vesicles. *Biophysical Journal* 91:3301-3312.
- Knowles, B. J., and Ellar, D. J. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta*. 924 : 509-518.
- Li, J., Carroll, J., and Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. 353:815-821.
- Markiewicz, P., and Goh, M. C. 1994. Atomic force microscopy probe tip visualization and improvement of images using a simple deconvolution procedure. *Langmuir*. 10:5-7.
- Masson, L., Préfontaine, G., Péloquin, L., Lau, P. C. K., and Brousseau, R. 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp.

*kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269:507-512.

Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V., and Brousseau, R. 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Molecular Microbiology.* 14:851-860.

Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R., and Schwartz, J. L. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *Journal of Biological Chemistry.* 274:31996-32000.

Milhiet, P. E., Vié, V., Giocondi, M. C., and Le Grimmeléc, C. 2001. AFM characterization of model rafts in supported bilayers. *Single Molecules* 2:109-112.

Milhiet, P. E., Giocondi, M. C., Baghdadi, O., Ronzon, F., Roux, B., and Le Grimmeléc, C. 2002. Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. *EMBO Reports.* 3:485-490.

Milhiet, P. E., Gubellini, F., Berquand, A., Dosset, P., Rigaud, J. L., Le Grimmeléc, C., and Lévy, D. 2006. High-resolution AFM of membrane proteins directly incorporated at high density in planar lipid bilayer. *Biophysical Journal.* 91:3268-3275.

Moraille, P., and Badia, A. 2005. Enzymatic lithography of phospholipid bilayer films by stereoselective hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society.* 127:6546-6547.

Müller, D. J., Fotiadis, D., Scheuring, S., Müller, S. A., and Engel, A. 1999. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 76:1101-1111.

Müller, D. J., Heymann, J. B., Oesterhelt, F., Möller, C., Gaub, H., Büldt, G., and Engel, A. 2000. Atomic force microscopy of native purple membrane. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics.* 1460:27-38.

Munro, S. 2003. Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell* 115:377-388.

Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J. L., and Laprade, R. 2001. Ion Channels Induced in Planar Lipid Bilayers by the *Bacillus Thuringiensis* Toxin Cry1aa in the Presence of Gypsy Moth (*Lymantria Dispar*) Brush Border Membrane. *Journal-of-Membrane-Biology* 184:45-54.

- Peyronnet, O., Nieman, B., Génèreux, F., Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J. L. 2002. Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochimica-Et-Biophysica-Acta-Biomembranes*. 1567:113-122.
- Puntheeranurak, T., Stroh, C., Zhu, R., Angsuthanasombat, C., and Hinterdorfer, P. 2005. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. *Ultramicroscopy* 105:115-124.
- Rinia, H., Snel, M., van der Eerden, J., de Kruijff, B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Letters*. 501: 92-96.
- Sangadala, S., Azadi, P., Carlson, R., and Adang, M. J. 2001. Carbohydrate Analyses of *Manduca sexta* Aminopeptidase N, Co-Purifying Neutral Lipids and Their Functional Interactions With *Bacillus Thuringiensis* CryIac Toxin. *Insect-Biochemistry-and-Molecular-Biology* 32:97-107.
- Schillers, H., Danker, T., Madeja, M., and Oberleithner, H. 2001. Plasma membrane protein clusters appear in CFTB-expressing *Xenopus laevis* oocytes after cAMP stimulation. *Journal of Membrane Biology*. 180:205-212.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:775-806.
- Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., and Rousseau, E. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membrane Biol.* 132:53-62.
- Schwartz, J. L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. 1997a. Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Letters*. 410:397-402.
- Schwartz, J. L., Lu, Y. J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., and Adang, M. J. 1997b. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *Febs Letters*. 412:270-276.
- Schwartz, J.L., and Laprade, R. 2000. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *In Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to*



Field Application. Charles, J. F., Delécluse, A., and Nielsen-LeRoux, C., editors. Kluwer Associate Publishing, Norwell, MA. 199-218.

Six, D. A., and Dennis, E. A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular & Cell Biology of Lipids*. 1488:1-19.

Stottrup, B. L., Veatch, S. L., and Keller, S. L. 2004. Nonequilibrium behavior in supported lipid membranes containing cholesterol. *Biophysical Journal* 86:2942-2950.

Terra, W. R., Costa, R. H., and Ferreira, C. 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias* 78:255-269.

Tran, L. B., Vachon, V., Schwartz, J. L., and Laprade, R. 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:4488-4494.

Vachon, V., Préfontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., Frutos, R., Laprade, R., and Masson, L. 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Applied & Environmental Microbiology* 70:6123-6130.

Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., and Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins - Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.

Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., and Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1378-1385.

Vié, V., Van Mau, N., Pomarède, P., Dance, C., Schwartz, J. L., Laprade, R., Frutos, R., Rang, C., Masson, L., Heitz, F., and Le Grimellec, C. 2001. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *Journal of Membrane Biology* 180:195-203.

Whalon, M. E., and Wingerd, B. A. 2003. Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*. 54:200-211.

Wheelock, M. J. and Johnson, K. R. 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Current*

*Opinion in Cell Biology* 15:509-514.

Wielert-Badt, S., Hinterdorfer, P., Gruber, H. J., Lin, J. T., Badt, D., Wimmer, B., Schindler, H., and Kinne, R. K. H. 2002. Single molecule recognition of protein binding epitopes in brush border membranes by force microscopy. *Biophysical Journal*. 82:2767-2774.

Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, V. F., Giordana, B., and Hanozet, G. M. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A:301-308.

Yuan, C. B., Furlong, J., Burgos, P., and Johnston, L. J. 2002. The size of lipid rafts: An atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophysical Journal* 82:2526-2535.

Zhuang, M. B., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A. K., Soberón, M., Bravo, A., and Gill, S. S. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in cry1a toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *Journal-of-Biological-Chemistry*. 277:13863-13872.

Table 1. Measured heights and diameters of Cry toxins interacting with membrane fragments.

Data are mean  $\pm$  SEM.

	Height (nm)	Diameter (nm)
Cry1Aa (n=70)*	5.4 $\pm$ 0.2	36.2 $\pm$ 0.8
Cry1Ac (n=37)*	6.7 $\pm$ 0.2	34.6 $\pm$ 1.5
Cry1C (n=8)*	5.1 $\pm$ 0.5	39 $\pm$ 4
Cry1Ac 2-D arr. (n=5)*	6.1 $\pm$ 0.3	N. A.

\* n = number of toxin structures or dense 2-D arrangements that have been cross-sectioned.

Table 2. Toxin structures interacting with membrane fragments. Each experiment was conducted on the same membrane fragment after one and four hours of incubation with the toxin.

Toxin type (Cry)	Toxin dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Incubation time (h)	Number of fragments with particular localization of structures :			
			1) None*	2) Edges*	3) Surface*	4) 2-D arrangement*
1Aa	8 <sup>†</sup>	1	9	0	1	0
		4	3	5	2	0
	40 <sup>†</sup>	1	3	5	2	0
		4	0	8	2	0
1Ac	8 <sup>†</sup>	1	10	0	0	0
		4	7	3	0	0
	40 <sup>†</sup>	1	4	5	0	1
		4	0	3	0	7
1C	8 <sup>†</sup>	1	9	1	0	0
		4	8	1	1	0
	40 <sup>†</sup>	1	8	2	0	0
		4	5	3	2	0

\* The appearance of these structures on membrane fragments were divided into four categories :

- 1) Number of fragments without structures (None)
- 2) Number of fragments presenting structures mainly at edges (Edges)
- 3) Number of fragments presenting structures mainly on the surface (Surface)
- 4) Number of fragments presenting dense 2-D arrangement of structures (2D-arrangement)

Each experiment consisted of observations of the same fragments after one hour and four hours of incubation with a single dose (either 8 or 40  $\mu\text{g/ml}$ ) of each toxin.

<sup>†</sup> For each toxin and each concentration, 10 membrane fragments were imaged ( $n = 10$ ).

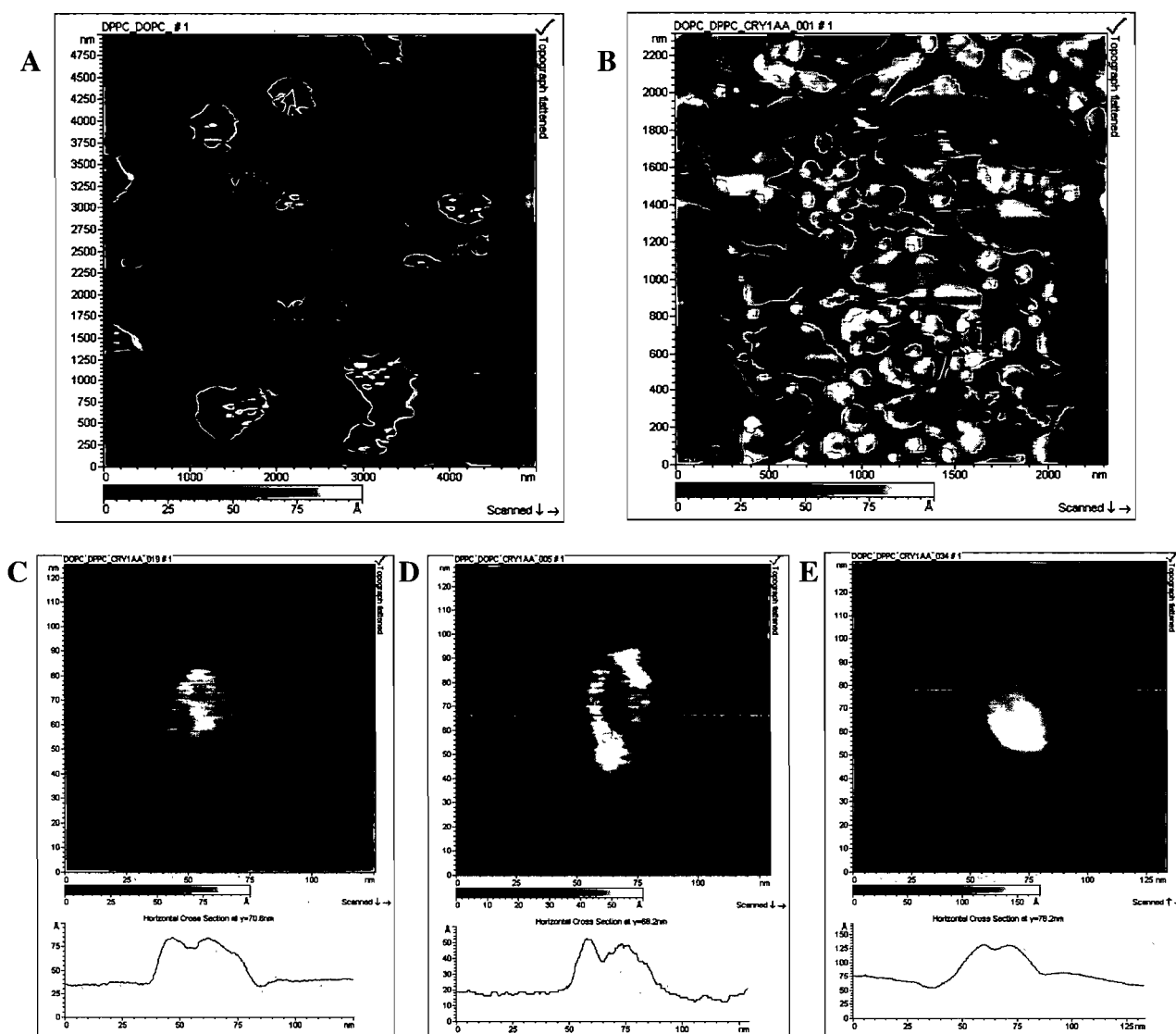


Fig. 1. AFM imaging of a typical DPPC-DOPC (1:1 v/v) supported bilayer on mica prepared by liposome fusion. **A)** In the absence of toxin, DPPC domains occupy about 22%, DOPC 72% and mica 6% of the total image area. **B)** With Cry1Aa toxin preloaded liposomes (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  toxin), DPPC covers about 33%, DOPC 27% and mica 40% of the total image area. Imaging was performed two hours following toxin-enriched liposome deposition on the mica surface at 60°C. Arrows point to structures formed by Cry1Aa (these are never observed in the absence of toxin). **C), D) and E)**, Similar structures observed in independently acquired images recorded under identical conditions and magnified further 20x. These structures measure approximately 30 nm x 60 nm with heights varying from 3 to 7 nm. The horizontal bars below the images represent the color-coded heights on the images. The vertical profiles along the green lines are given below the images.

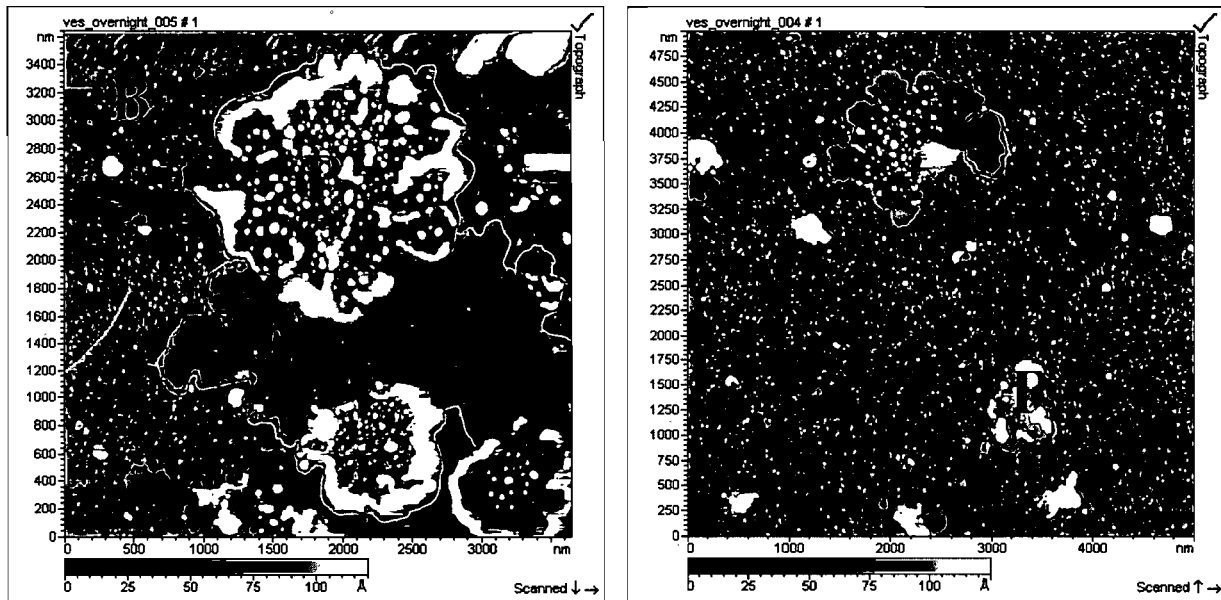


Fig. 2. Representative images of membrane fragments from *M. sexta* midgut BBMs. Most of the mica surface is covered by bumps (**B**) of various heights which could possibly be unfused vesicles. The flat region is a membrane fragment (**F**) (delimited in blue) with height of  $4.2 \pm 0.1$  nm. Ring-like domains (**P**) (delimited in green) were also observed, suggesting the presence of aggregates of membrane proteins.

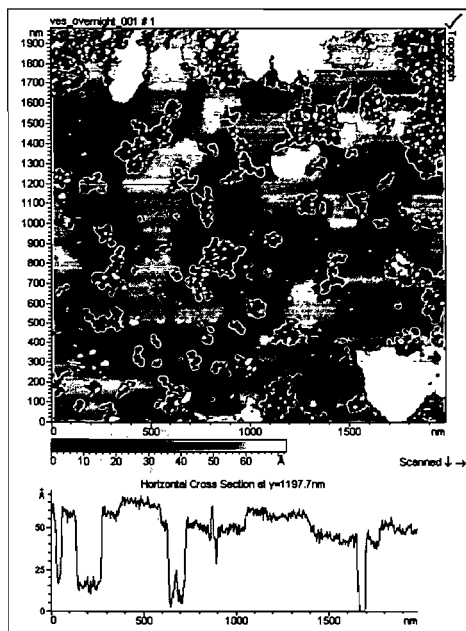


Fig. 3. Lipid domains in BBMs from *M. sexta*. Higher lipidic domains (delimited in blue) were sometimes observed within the membrane fragments. Their height is  $5.1 \pm 0.1$  nm, compared to the that of the fragment themselves, i.e.,  $4.2 \pm 0.1$  nm. The vertical profile along the green line on the image is shown below.

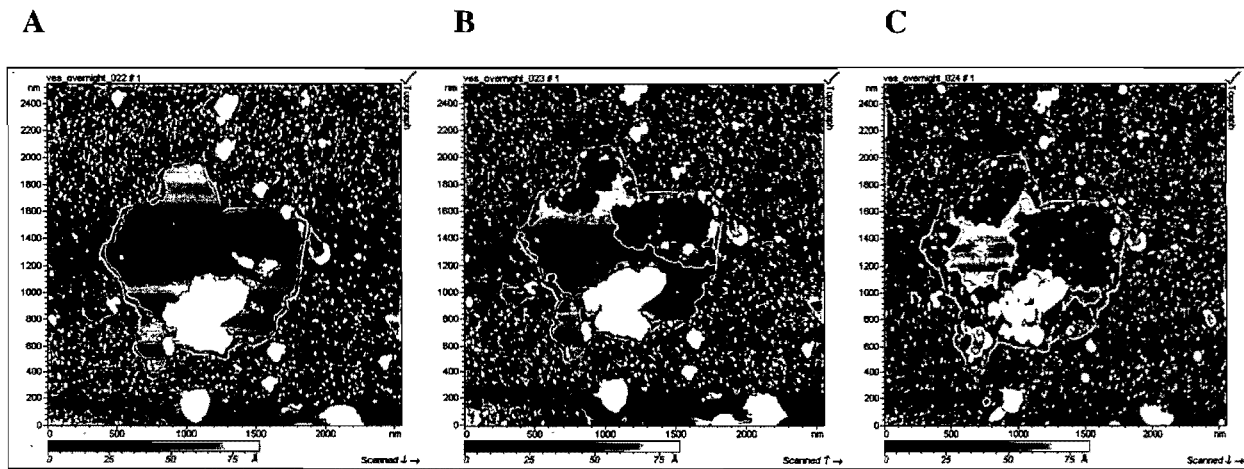


Fig. 4. Effect of PLA2 on BBMs from *M. sexta*. Membrane fragments were gradually eroded by PLA2 (5  $\mu\text{g/ml}$ ), demonstrating the essentially lipidic nature of the fragments. **A)** Membrane fragment before addition of PLA2 (delimited in blue). **B)** Image of the same membrane fragment. PLA2 was added when half of the image was scanned (scanning was performed from the bottom to the top). The effect of PLA2 was immediate, showing at the same time the efficacy of the solution exchange system. **C)** Seven minutes after adding PLA2, most of the membrane fragment was eroded.



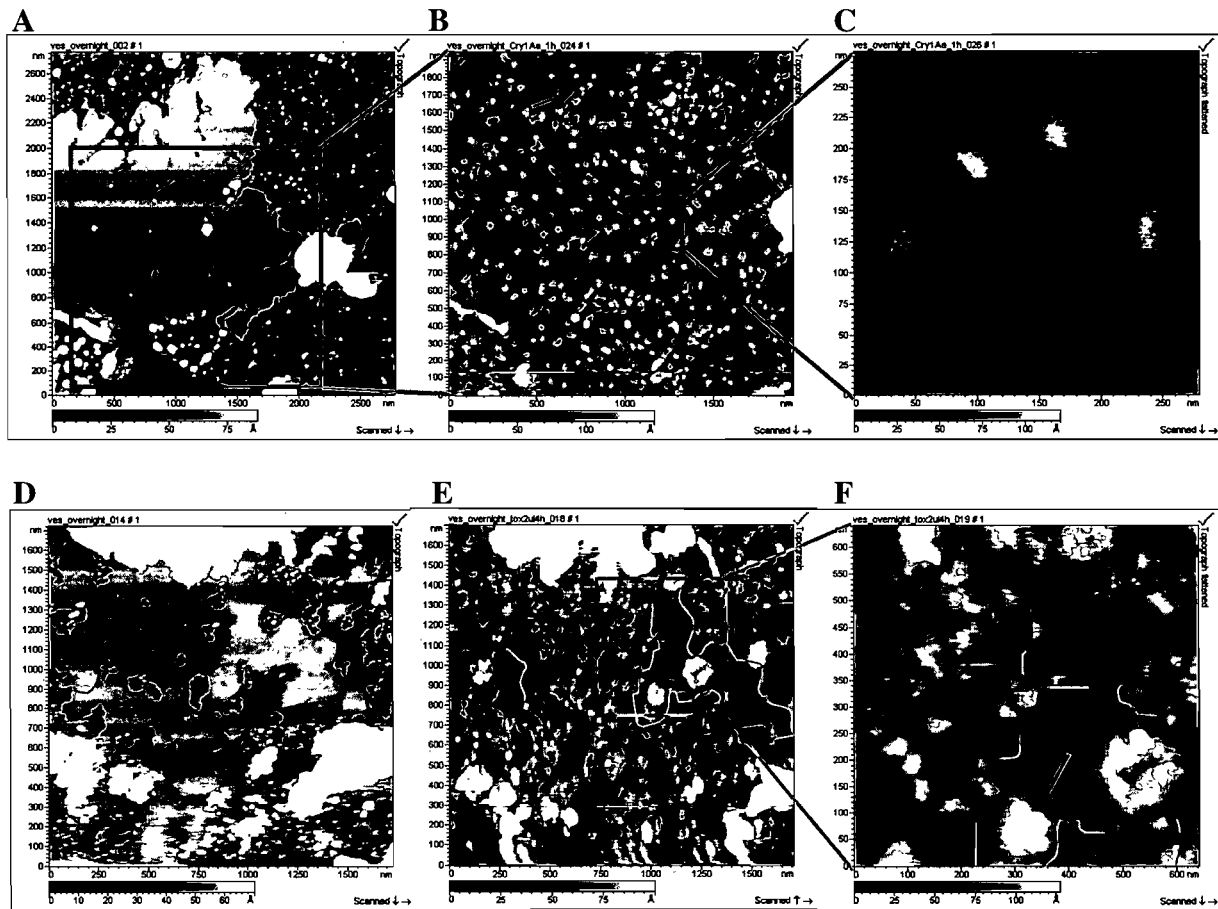


Fig. 5. Interaction of Cry1Aa toxin with BBMs from *M. sexta*. After incubation with Cry1Aa, structures were observed either on certain membrane fragments or on certain regions of the fragments. **A)** Membrane fragment in the absence of toxin. **B)** Same fragment after one hour incubation with Cry1Aa at 40  $\mu\text{g/ml}$ , showing toxin structures (approx. 35 nm in diameter and 5 to 7 nm high), more or less evenly distributed (40 to 60 toxin structures/ $\mu\text{m}^2$ ) over the surface of the fragment. Arrows point to closely positioned structures. **C)** Magnification (approx. 7x) of the structures shown in B. **D)** Another membrane fragment showing a higher lipidic domain (delimited in blue) in the absence of toxin. **E)** Same as **D**, after four hour incubation with Cry1Aa at 8  $\mu\text{g/ml}$ . Toxin structures appeared mainly at the surface of the lower lipidic region. On the higher domains, virtually no such structures were observed. **F)** Magnification (approx. 3x) of an area containing the two lipidic domains observed in **E**. In addition, but very rarely, higher and larger aggregates of toxins could be seen on these higher domains (blue arrows).

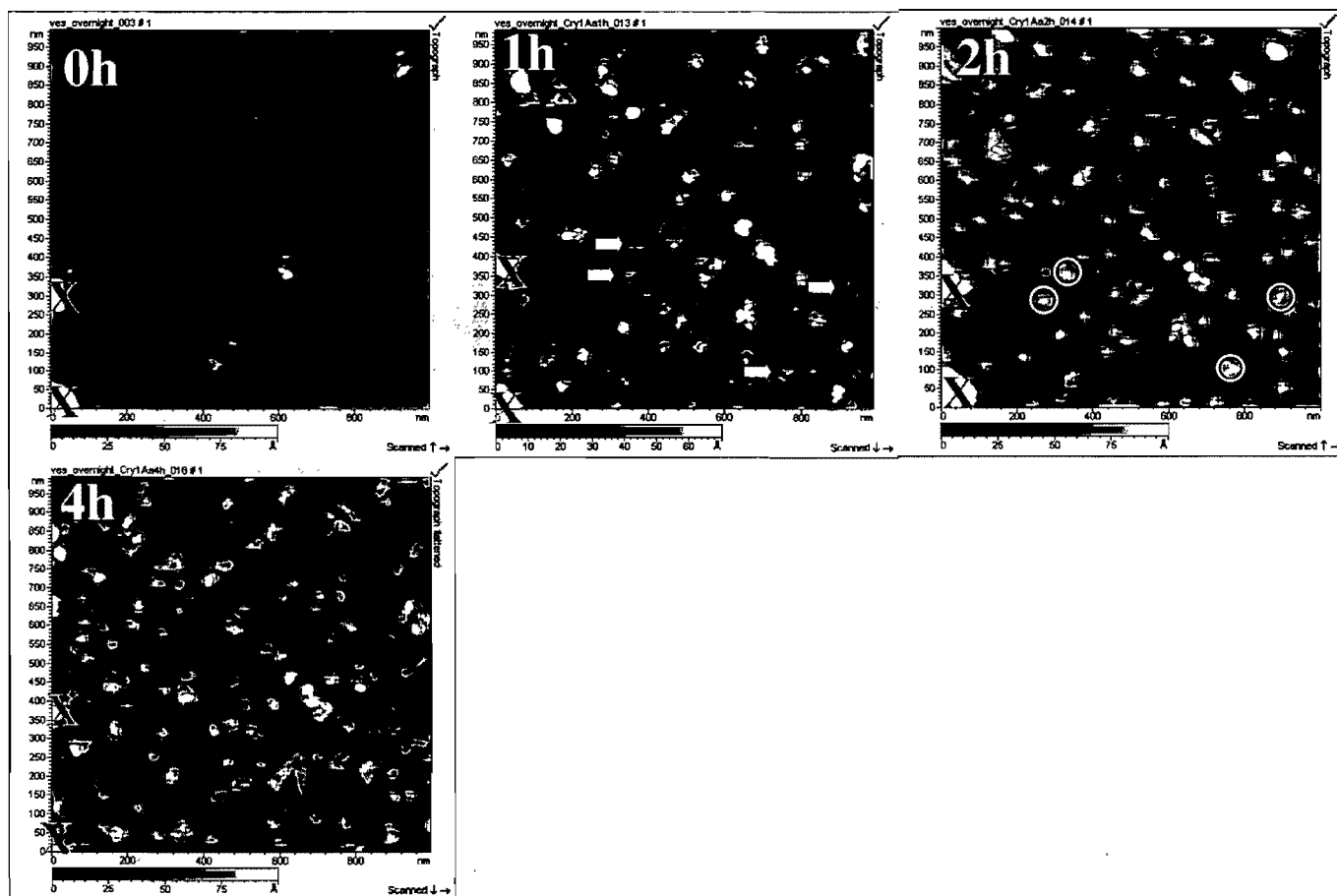


Fig. 6. Time course of Cry1Aa interaction with BBMs from *M. sexta*. The same area was imaged before and after a total of one, two and four hours incubation with Cry1Aa (40  $\mu\text{g/ml}$ ). Blue Xs are reference markers. Small structures appeared after one hour of toxin exposure (yellow arrows) that attained their maximum size of approx. 35-nm in diameter and a height of 5 to 7 nm after two hours (yellow circles). After four hours, the number of such structures reached a plateau and degradation of the membrane by the AFM tip was clearly observed and revealed the mica surface (dark areas).

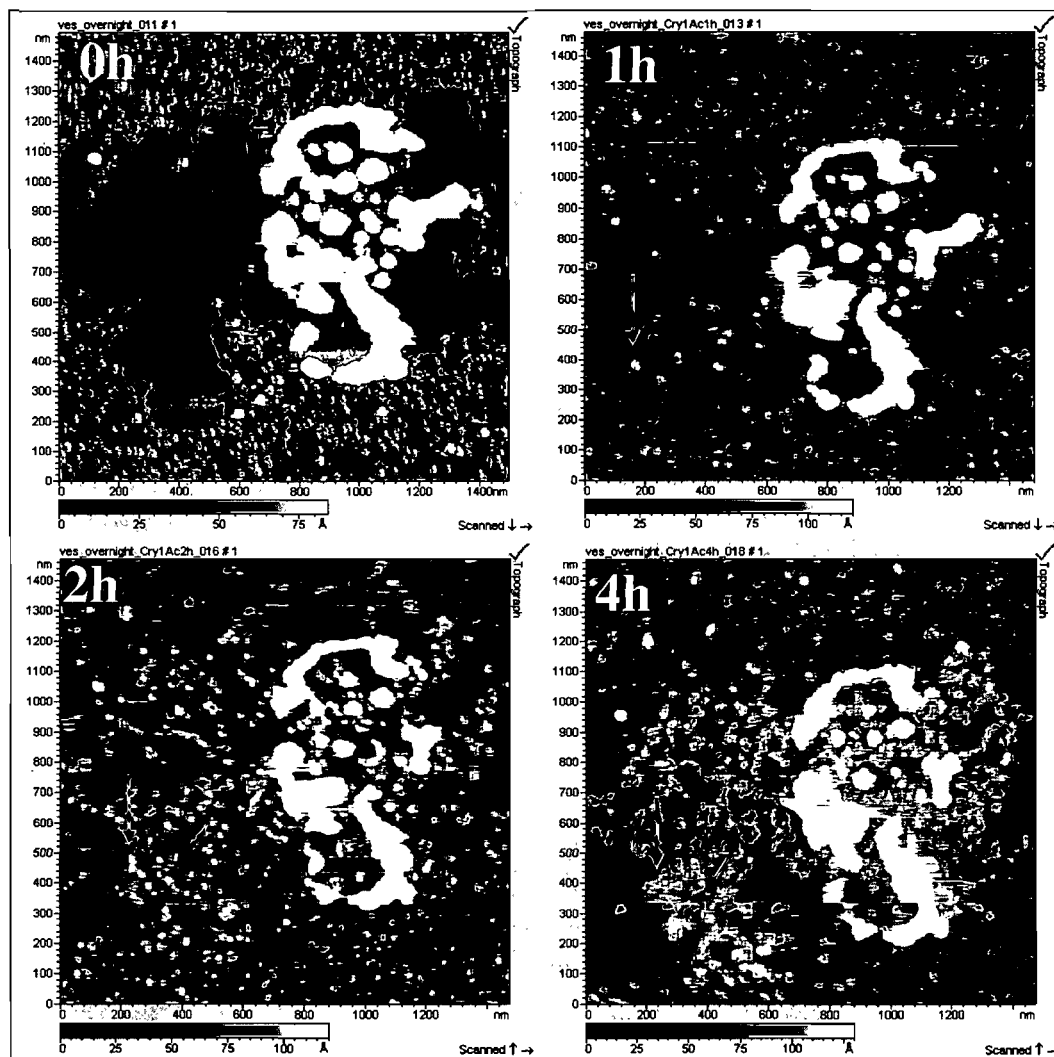


Fig. 7. Time course of Cry1Ac interaction with BBMs from *M. sexta*. The same area was imaged before and after a total of one, two and four hours incubation with Cry1Ac (40  $\mu\text{g/ml}$ ). As shown by the blue arrows, a few toxins observed after one hour in the defects of the membrane fragment generated pearl-like strings of toxin structures after two hours, resulting in a dense 2-D arrangement after four hours. Such arrangements were never observed with Cry1Aa (see Figs. 5 and 6).

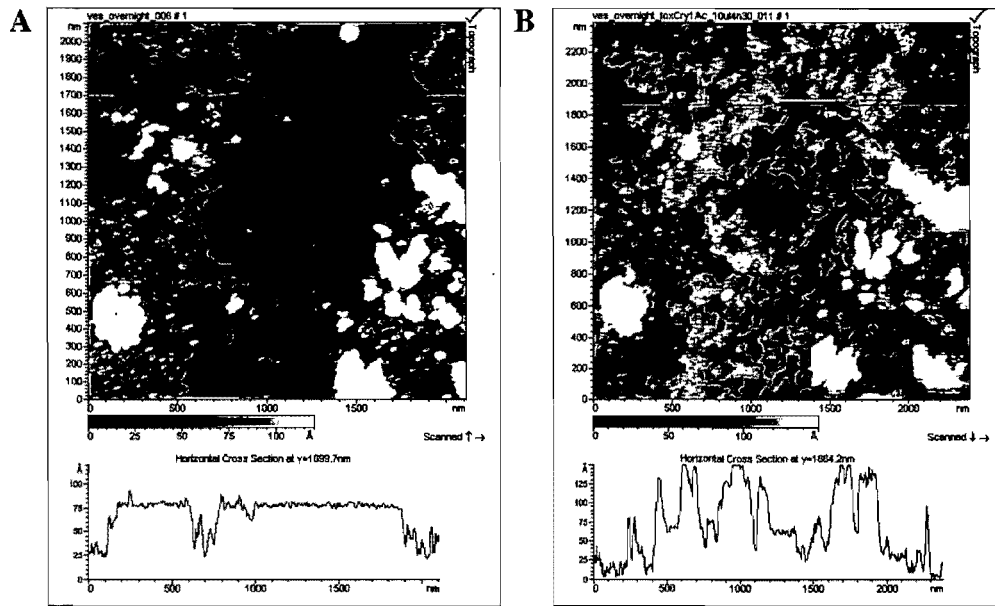


Fig. 8. Dense 2-D arrangements formed by Cry1Ac toxin interacting with BBMs from *M. sexta*. **A)** Large membrane fragment before addition of the toxin. **B)** Same area after four hours of incubation with 40  $\mu\text{g/ml}$  Cry1Ac. The vertical profile along the green line on the image is shown below.

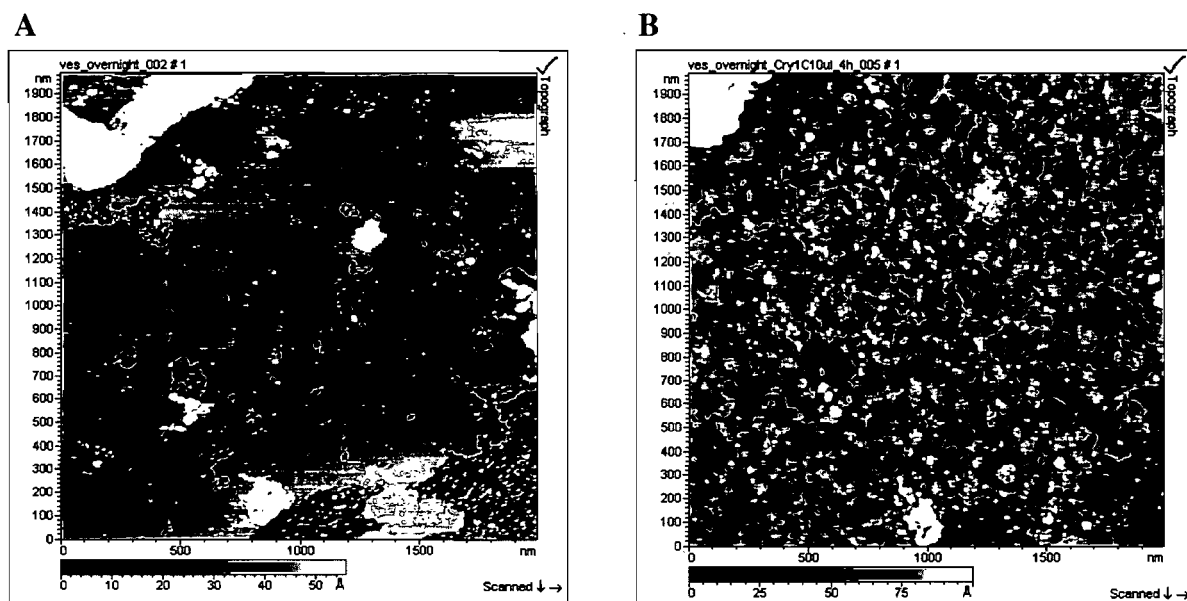


Fig. 9. Interaction of Cry1C toxin with BBMs from *M. sexta*. **A)** Membrane fragment in the absence of toxin. **B)** Same fragment after four hours of incubation with Cry1C at 8 µg/ml. Toxin structures were observed on the fragments, with similar dimensions and distribution to what was observed with Cry1Aa (see Figs. 5 and 6). Degradation of the membrane fragment by the AFM tip is clearly observed (dark areas).

# Chapitre III

## Discussion générale

### 3.1 Imagerie de la Cry1Aa sur une bicouche de DPPC-DOPC

Comme l'avaient démontré les enregistrements de canaux ioniques individuels sur des bicouche lipidiques (Schwartz *et al.*, 1993 ; Peyronnet *et al.*, 2002), les toxines du Bt peuvent former des pores en absence de récepteur, les structures formées dans ce cas particulier étant donc dues à des interactions lipide-protéine. D'autre part, deux études en AFM avaient permis de visualiser des toxines de Bt interagissant avec des lipides (Puntheeranurak *et al.*, 2005 ; Vié *et al.*, 2001 ; ) et c'est pourquoi nous avons d'abord étudié l'interaction de la Cry1Aa avec une bicouche de DPPC-DOPC obtenue par fusion de vésicules lipidiques. Cependant, aucune nouvelle structure n'a pu être observée en ajoutant de la Cry1Aa à une bicouche de DPPC-DOPC déjà formée sur la surface de mica, même après une incubation de deux heures. Par contre, en ajoutant la toxine avant la fusion des vésicules sur le mica, il nous a été possible d'observer quelques structures, principalement à l'interface des bicouches de DOPC et de DPPC ou en bordure des domaines de DOPC seuls. Vraisemblablement, la fluidité plus grande de la membrane dans les vésicules en suspension a facilité l'insertion des toxines. Dans ces conditions, les dimensions des structures étaient d'environ 30 par 60 nm dans le plan de la membrane avec une hauteur de 3 à 7 nm, ce qui pourrait représenter un oligomère de plusieurs molécules (article, figure 1). Mais, comme il apparaissait plus pertinent de pouvoir visualiser les toxines interagissant avec ses récepteurs spécifiques dans les conditions naturelles d'insertion membranaire de la toxine, nous avons imagé les toxines de Bt suite à une incubation avec la membrane en bordure en brosse du *M. sexta*.

### 3.2 Imagerie de membranes de bordure en brosse du *M. sexta*

Afin d'imiter les conditions physiologiques dans lesquelles la formation de pores est observée expérimentalement, nous avons d'abord imagé la membrane de bordure en brosse du *M. sexta*. Les fragments membranaires provenant de la préparation de BBMV avaient l'épaisseur d'une

bicouche lipidique, soit 4.2 nm (article, figure 2), et ils présentaient parfois des domaines possédant une épaisseur supérieure de 1 nm à l'ensemble de la bicouche (article, figure 3), ce qui pourraient être associés à des radeaux lipidiques. Des bosses irrégulières, probablement des agrégats de protéines, ont pu aussi être observées sur ces membranes. La phospholipase A2, un enzyme qui détruit les phospholipides, a érodé ces fragments membranaires, démontrant leur nature phospholipidique (article, figure 4). Ces fragments pourraient résulter de la fusion sur le mica de parties de membranes planes ou de vésicules membranaires.

### **3.3 Imagerie de toxines de Bt sur des fragments de membranes de bordure en brosse de *M. sexta***

La présence de la membrane native et de ses récepteurs devrait, en théorie, améliorer les interactions de la toxine avec les fragments membranaires et ainsi augmenter la densité de la toxine sur la membrane et en faciliter l'observation en AFM. Après l'incubation avec la Cry1Aa, à 8 ou 40 µg/ml, de nouvelles structures sont apparues sur certains fragments membranaires ou certaines régions de celle-ci, ce qui suggère des interactions spécifiques dues aux récepteurs de la toxine ou d'autres lipides ou protéines membranaires (article, figure 5). Des résultats similaires ont été obtenus avec la Cry1Ac et la Cry1C alors qu'aucune interaction spécifique n'a été observée avec la Cry1Ba, une toxine inactive contre le *M. sexta*. Le diamètre des structures est d'environ 35 nm alors que leur hauteur au dessus de la membrane est d'environ 6 nm (Tableau 1). Ces dimensions se rapprochent de celles que nous avons observées avec les bicouches de DPPC-DOPC. Les dimensions de ces structures, si on les compare à celles d'une molécule de toxine obtenues par cristallographie rayon X de 8.0x5.0x5.0 nm (Grochulski *et al.*, 1995), suggèrent qu'elles seraient vraisemblablement composées de plusieurs molécules, avec une partie importante à la surface de la membrane. La figure 6, dans l'article, illustre probablement le processus d'oligomérisation par lequel les molécules, au niveau d'un récepteur spécifique, s'ajoutent graduellement pour former une structure de dimension caractéristique constituant un pore fonctionnel.

Afin de bien caractériser les interactions des toxines avec les fragments membranaires, nous avons séparé nos observations en quatre catégories distinctes : 1- les fragments membranaires où

aucune structure n'a été observée, 2- les fragments où les structures se situaient en bordure, 3- les fragments où les structures se situaient sur leur surface et en bordure, mais avec une prépondérance pour la surface et 4- les fragments pour lesquels on observait des réseaux 2-D de structures. Ces quatre catégories nous ont permis de discriminer de façon objective les interactions non spécifiques protéine-lipide (catégorie 2) des interactions spécifiques protéine-protéine (catégories 3 et 4). Avec la Cry1Aa, nous avons constaté qu'environ 2 fragments sur 10 présentaient un recouvrement de toxine en surface (catégorie 3) à 8 ou 40  $\mu\text{g/ml}$ . Pour la Cry1C, on a atteint cette valeur seulement à une concentration de toxine 40  $\mu\text{g/ml}$  (Tableau 2). De plus, ce recouvrement en surface pour ces deux toxines était similaire et d'environ 40 à 60 toxines par  $\mu\text{m}^2$ , ce qui pourrait fournir une estimation de la densité des récepteurs sur la surface dans ces régions particulières de la membrane apicale du *M. sexta*. Par contre, contrairement à la Cry1Aa et la Cry1C, la Cry1Ac ne présentait pas de recouvrement en surface, mais étalait plutôt, à la plus forte concentration, un dense réseau 2-D suggérant des interactions toxine-toxine (article, figure 7 et 8). En effet, il a été possible d'observer les structures de Cry1Ac s'organisant progressivement comme un collier de perles, puis faisant graduellement place à un arrangement 2-D (article, figure 7). Pour ces trois toxines, une saturation du nombre de structures en surface au bout de 4h suggère un nombre limité de sites spécifiques sur la membrane et/ou la toxine. Par ailleurs, la Cry1Ba, qui est inactive contre *M. sexta*, n'a montré aucune interaction avec la membrane en surface ou en réseau 2-D (catégorie 3 et 4). Cela suggère, une fois de plus, que les catégories d'interaction 3 et 4 sont fort probablement spécifiques. Par contre, il a été possible d'observer la Cry1Ba, la Cry1Aa, la Cry1Ac et la Cry1C en bordure ou dans les défauts des fragments membranaires. Cela indique que les toxines peuvent interagir directement avec les lipides, de façon similaire à ce qui a été observé en AFM dans les bicouches de DOPC-DPPC et en électrophysiologie avec des bicouches planes (Schwartz *et al.*, 1997b).

La distribution de la Cry1Aa dans les domaines lipidiques les plus mince (4.2 nm) semble indiquer que les récepteurs seraient situés dans ces domaines. Par contre, il n'a pas été possible d'imager les récepteurs en AFM en l'absence de toxine, ce qui est probablement dû à leur flexibilité au dessus de la membrane. En effet, la détection de structures en AFM dépend de leur rigidité. Or, la plupart des récepteurs connus de la toxine du Bt sont des membres des APL et des APN, qui sont attachés à la membrane par une ancre lipidique très flexible, ou des cadhérines,



qui ont une seule région trans-membranaire (Ikezawa, 2002). Les échantillons biologiques étant par définition des tissus mous, ils présentent donc un défi additionnel en AFM. D'autre part, que les fragments n'interagissent pas tous de façon spécifique avec la toxine pourrait être dû au fait que bien que nous ayons utilisé une solution purifiée de BBMV, il est possible que certains fragments membranaires se déposant sur le mica ne proviennent pas directement des BBMV mais plutôt d'une autre partie de l'intestin. Une autre possibilité serait que la déposition des fragments sur le mica se fait de telle sorte que les récepteurs font face au mica et sont donc inaccessibles à la toxine. En conséquence, ces conditions particulières en AFM pourraient expliquer des variations dans la disponibilité des récepteurs comparativement à ce qui a été observé dans des expériences de liaison ou de mesure de perméabilité. Par contre, nos images de fragments membranaires montrent des différences évidentes en absence et en présence de toxine et que dans la plupart des cas, les interactions entre les toxines et leur membrane cible sont spécifiques.

Par ailleurs, les radeaux lipidiques, ou domaines lipidiques résistants aux détergents, ont été proposé comme jouant un rôle critique dans le mode d'action de la toxine Cry1Ab (Bravo *et al.*, 2004). L'analyse des radeaux lipidiques indique qu'ils sont composés en majorité de diacylglycerol, de sphingomyelin et de cholestérol (Sangadala *et al.*, 2001 ; Zhuang *et al.*, 2002). Ils devraient former des domaines lipidiques légèrement plus épais que le reste de la membrane dû à cette présence de cholestérol qui étire les chaînes carboniques des lipides environnants. Bien que leur existence soit encore aujourd'hui un sujet de débat, ces radeaux lipidiques pourraient être représentés dans nos images par les domaines lipidiques surélevés observés sur certains fragments membranaires (article, figure 3), quoique la Cry1Aa semble plutôt se lier aux domaines lipidiques les plus bas, contrairement à ce qu'on attendrait.

### 3.3.1. La dose de toxine

Des études sur la Cry1Aa, la Cry1Ac, la Cry1C et la Cry1Ba ont montré que ces toxines peuvent former des canaux ioniques dans des bicouches lipidiques sans récepteur à des concentrations de 5 à 10 µg/ml, alors que des concentrations beaucoup plus faibles de 20 à 100 ng/ml sont suffisantes lorsque des récepteurs sont présent dans la membrane (Kirouac *et al.*, 2006 ;

Peyronnet *et al.*, 2001 ; Sangadala *et al.*, 2001 ; Schwartz *et al.*, 1997b ; Terra *et al.*, 2006). Dans notre étude, des doses comparables aux études en bicouches sans récepteurs (8 à 40 µg/ml) ont été nécessaires afin d'observer des interactions spécifiques entre les toxines du Bt et les membranes de bordure en brosse. De plus, le temps que prenait la toxine pour interagir avec la membrane cible était considérablement plus long que le temps nécessaire à la formation de pores dans des vésicules (de l'ordre d'une dizaine de minutes) (Fortier *et al.*, 2005 ; Fortier *et al.*, 2007 ; Vachon *et al.*, 2004). Cela est peut-être dû au fait que la fluidité de la membrane est réduite en se fusionnant au mica et que cela limiterait la probabilité d'interaction avec la toxine (Stottrup *et al.*, 2004). Il pourrait aussi y avoir une répulsion électrostatique exercée par les charges négatives du mica sur la toxine, particulièrement importante à la faible concentration ionique que nous avons utilisée dans notre étude (Fortier *et al.*, 2005 ; Müller *et al.*, 1999). De façon plus générale, le besoin d'une forte dose de toxine pourrait être due à une accessibilité moins grande aux récepteurs sur l'échantillon.

### 3.3.2. Spécificité de la toxine

En plus d'avoir utilisé la Cry1Ba, une toxine inactive contre le *M. sexta*, afin de vérifier la spécificité des interactions des toxines de Bt avec leur membrane native, nous avons tenté de voir s'il existe une corrélation entre les résultats de notre étude et la spécificité *in vivo* des toxines de Bt. Par exemple, certaines études ont montré que les récepteurs de la Cry1Aa et de la Cry1C sont plus nombreux que ceux de la Cry1Ac (Höfte *et al.*, 1988 ; Höfte et Whiteley, 1989 ; Van Rie *et al.*, 1989 ; Van Rie *et al.*, 1990), ce qui pourrait expliquer la distribution uniforme sur la surface membranaire qui a été observée uniquement avec les deux premières. Par contre, le fait que la Cry1Ac soit la seule de ces toxines à former un arrangement 2D pourrait être relié à sa toxicité relativement plus élevée comparativement à la Cry1Aa et la Cry1C (revue dans Tran *et al.*, 2001). Pour la Cry1Ac, l'arrangement 2D pourrait avoir été provoqué par des interactions toxine-toxine suite à un changement de conformation de la protéine. Certains acides aminés uniques à la Cry1Ac ou une différence de conformation locale due à la présence de ces acides aminés pourraient favoriser une conformation particulière de celle-ci et ainsi permettre ces interactions toxine-toxine. Au niveau de la membrane, des toxines libres interagissant directement avec des toxines s'étant liées aux lipides en bordure des fragments membranaires ou avec des toxines

ayant interagi avec des récepteurs spécifiques sur la membrane pourraient déclencher cet arrangement 2D (article, figure 7). Finalement, le fait qu'il ait été possible d'observer les quatre toxines, incluant la Cry1Ba, interagissant avec les bordures ou les défauts des fragments membranaires est probablement dû à des interactions facilitées protéine-lipide. Ensemble, toutes ces observations suggèrent que les interactions de la Cry1Aa, la Cry1Ac et la Cry1C avec les fragments membranaires sont majoritairement dues à des interactions spécifiques avec la membrane par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ou d'interactions toxine-toxine. Par contre, les différents patrons d'interaction des toxines avec la membrane cible semblent indiquer qu'elles s'associent avec différents récepteurs ou régions de toxine.

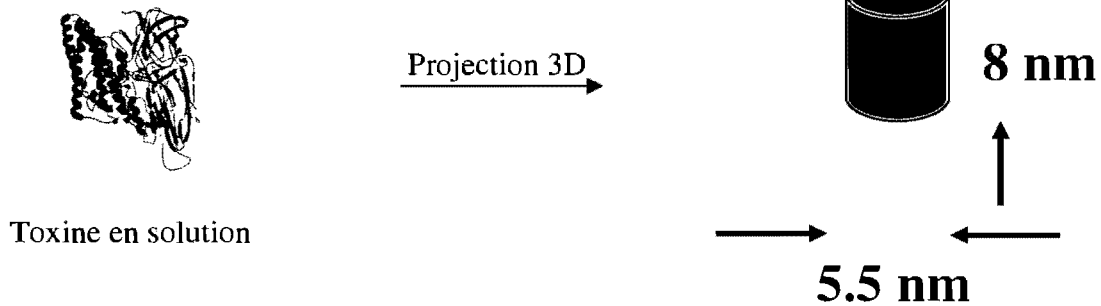
### 3.3.3 Comparaison des dimensions de la toxine Cry

Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle en parapluie, dans lequel les hélices  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  seraient insérées dans la membrane et où le reste du domaine I et les domaines II et III serait déployé à la surface de la membrane (Knowles 1994 ; Aronson et Shai, 2001) demeure le plus plausible (Biggin et Sansom, 1996 ; Cumming *et al.*, 1994 ; Gazit *et al.*, 1994, 1998 ; Gerber et Shai, 2000 ; Masson *et al.*, 1999) (Fig. 2C). D'autre part, en 1995, Grochulski *et al.* ont découvert, par cristallographie rayon X, que les dimensions des toxines de la Cry1Aa en solution sont de 8.0 x 5.0 x 5.0 nm (Fig. 5A). De plus, le modèle théorique le plus réaliste serait celui dans lequel la toxine formerait un oligomère de quatre sous-unités (Schwartz *et al.*, 1997a ; Masson *et al.*, 1999) (Fig. 5B).

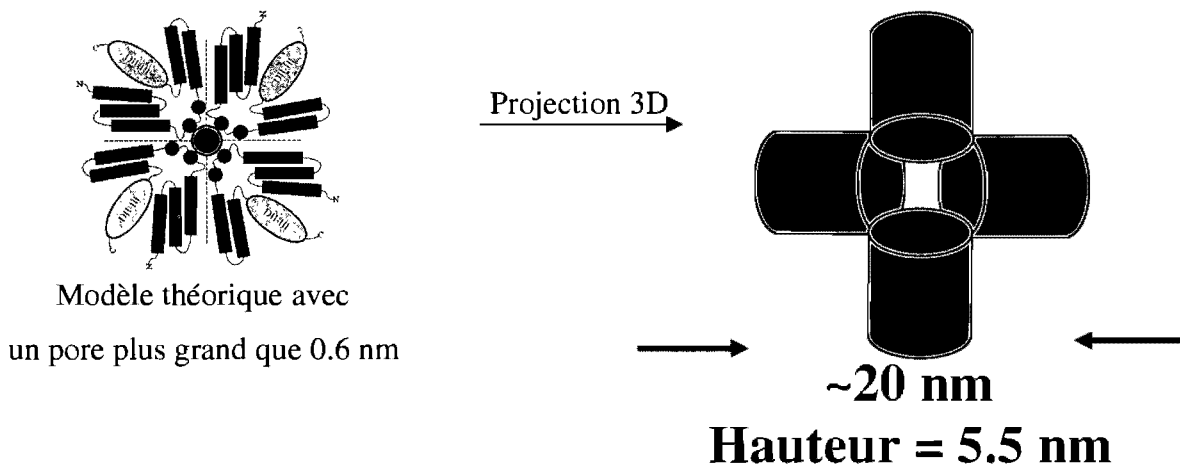
Néanmoins, l'architecture du pore des toxines de Bt, responsable de son activité, demeure encore un mystère et seulement deux études ont tenté d'en visualiser la structure oligomérique (Puntheeranurak *et al.*, 2005 ; Vié *et al.*, 2001 ;). Vié *et al.* (2001) ont suggéré, en utilisant des lipides purifiés ou synthétiques, que la Cry1Aa forme une structure tétramérique présentant un pore de 1.5 nm de diamètre (Fig. 5C), ce qui corrobore le modèle théorique de Schwartz *et al.* et de Masson *et al.* Par contre, ils ont conclu qu'une large proportion de la toxine serait enfouie dans la membrane, ce qui contredit le modèle du canif ou celui en parapluie (Knowles, 1994). Notons que dans ce travail, la toxine a d'abord été insérée dans une monocouche à l'interface air/eau pour ensuite être déposée sur une deuxième monocouche accolée au mica. Ce procédé est

très différent du mécanisme naturel d'insertion de la toxine où cette dernière s'insère directement dans la bicouche lipidique à partir de la phase aqueuse. La méthode utilisée par Puntheeranurak *et al.* (2005), dans laquelle les structures de la CryIAa et de la Cry4Ba se forment sur une bicouche lipidique déposée sur le mica, s'approche déjà un peu plus de la réalité malgré l'absence de récepteurs et donc de liaisons spécifiques avec les toxines. D'ailleurs, les structures de 20 à 30 nm de large et 2 à 4 nm de hauteur observées par ces auteurs (Fig. 5D) suggèrent qu'elles seraient vraisemblablement composées de plusieurs molécules, comme dans le modèle théorique de Schwartz *et al.* et de Masson *et al.* De plus, une partie importante de la structure serait à la surface de la membrane, en accord avec le modèle du canif ou du parapluie (Knowles, 1994). Notre étude va aussi en ce sens puisque les structures formées sur la surface des fragments membranaires provenant d'une membrane cible ont des dimensions de 35 nm de diamètre et une hauteur d'environ 6 nm. Par contre, la résolution limitée de l'AFM avec des matériaux biologiques mous et flexibles, plutôt qu'avec des réseaux compacts de protéines, ne nous a pas encore permis de révéler l'architecture oligomérique de ces structures. Ce que l'on peut dire, par contre, c'est que les structures observées dans notre étude (diamètre : 35 nm, hauteur : 6 nm sur BBMV (Fig. 5E); dimensions : 30x60 nm, hauteur : 3-7 nm sur bicouches de DPPC-DOPC) sont comparables à celles observées par Puntheeranurak *et al.* (diamètre : 20-30 nm, hauteur : 2-4 nm) (Fig. 5D) et compatibles avec le modèle tétramérique de Schwartz *et al.* (diamètre : 20 nm, hauteur : 5.5 nm (Fig. 5B), en utilisant les dimensions mesurées par Grochulski *et al.* (Fig. 5A)). En effet, la dimension des protéines à la surface des fragments membranaires pourrait être fort différente de celle de la conformation compacte trouvée avec la diffraction rayon X par Grochulski *et al.* (5.5x5.5x8 nm) et ainsi ne fournir qu'une limite inférieure de la taille du tétramère. En résumé, notre étude suggère une structure oligomérique de plusieurs molécules, compatible avec les modèles de Schwartz *et al.*, et de Knowles *et al.*

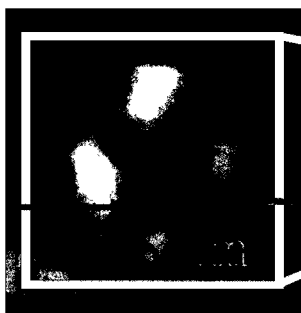
A) Monomère de Cry1Aa en diffraction rayon X de Grochulski *et al.*, 1995 :



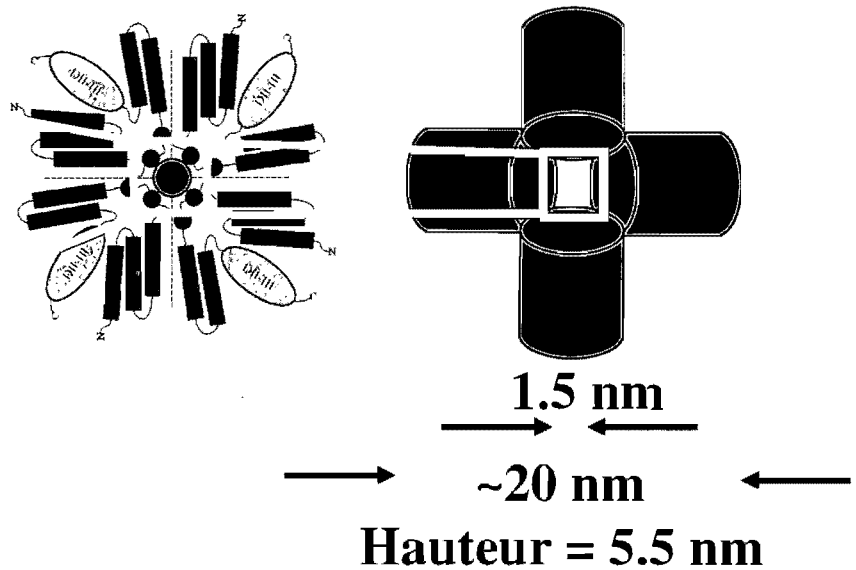
B) Modèle théorique d'oligomérisation tétramérique de Schwartz *et al.*, 1997 :



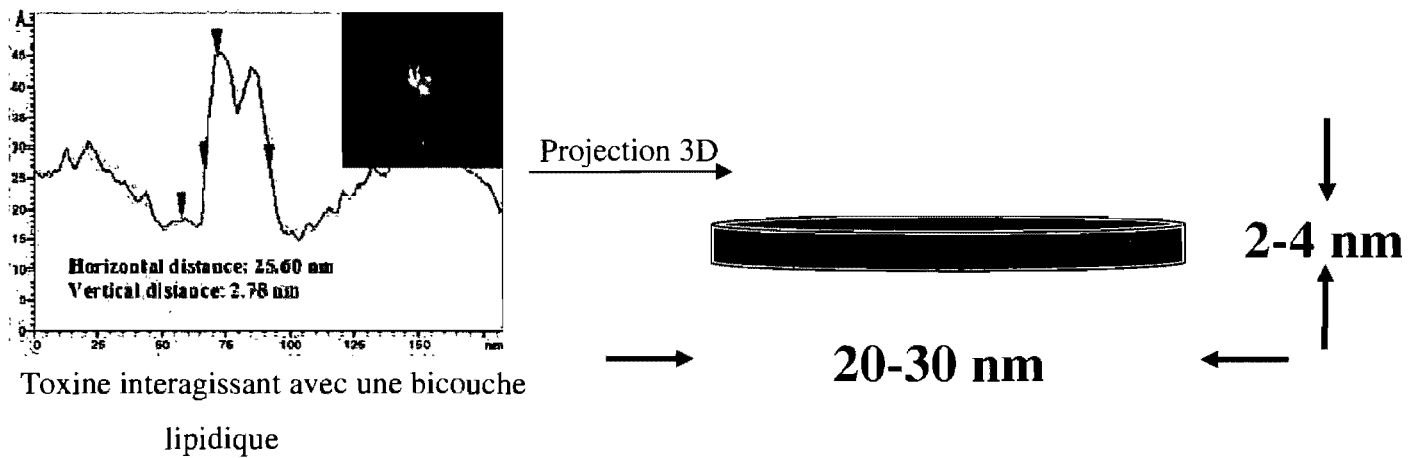
C) Pore tétramérique de la Cry1Aa interagissant avec une bicouche lipidique selon Vié *et al.*, 2001 :



Toxine interagissant avec une bicouche lipidique avec un pore de 1.5 nm



D) Structure formée par la toxine Cry4Ba sur une bicouche lipidique (Puntheeranurak et al., 2005) :



E) Structures formées par la toxine CryIAa sur sa membrane cible (Laflamme *et al.*, 2008) :

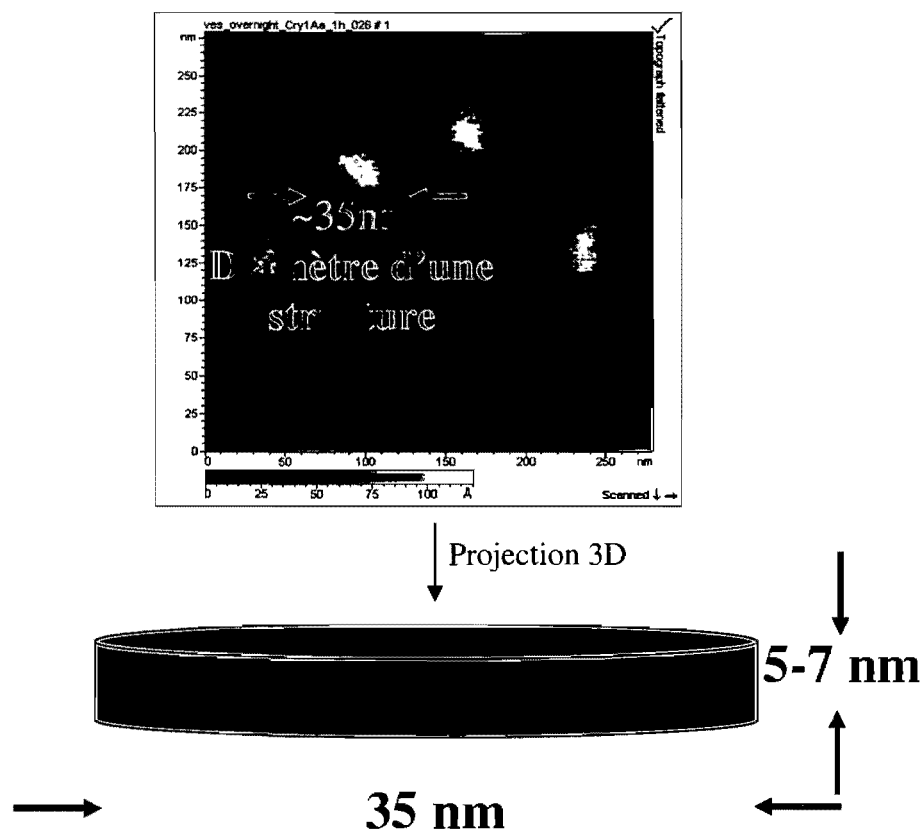


Fig. 5. Comparaison des dimensions des toxines Cry et de ses structures mesurées par diffraction aux rayons X, par AFM dans différentes conditions et estimées selon le modèle théorique de Schwartz et al.

## Chapitre IV

### Conclusion et perspective

Cette étude procure la première visualisation des interactions entre des toxines de Bt et la membrane de bordure en brosse de l'intestin de larves de *M. sexta*. Ce type de membrane est la cible naturelle des toxines de Bt dont on a démontré qu'elles se lient à des récepteurs spécifiques localisés à la surface membranaire, pour ensuite former des pores qui perméabilisent la membrane, entraînant ainsi la lyse des cellules. Nos mesures en AFM ont établi que la Cry1Aa, la Cry1Ac et la Cry1C, trois toxines homologues, forment des structures similaires d'environ 35 nm de diamètre et de 5.1 à 6.7 nm en hauteur après leur incubation avec des membranes de bordure en brosse. Ces trois toxines n'ont pas interagi de la même façon avec les membranes de bordure en brosse, ni en terme de cinétique, de localisation ou d'assemblage. En plus des interactions toxine-toxine et toxine-lipide, ces structures, dans des régions où elles présentaient une distribution uniforme, semblaient se former majoritairement par des interactions toxine-récepteur, faisant ainsi de la toxine un rapporteur des récepteurs et fournissant une façon indirecte de visualiser la localisation et la densité des récepteurs sur les membranes de bordure en brosse. Nos données suggèrent donc que les récepteurs sont localisés dans la région la plus mince des lipides. Finalement, les dimensions et distributions des toxines imagées par AFM sur des membranes intestinales naturelles pourraient refléter celles des pores fonctionnels formés *in vivo* par les toxines de Bt.

Il serait intéressant d'améliorer la résolution afin de révéler la sous-structure des structures que nous avons observées. Pour cela, il faudrait probablement utiliser des pointes de plus faible rayon, à la limite des nanotubes, quoique le risque d'endommager la membrane et/ou de contaminer la pointe de protéines et de lipides est alors potentiellement beaucoup plus grand, ce qui provoquerait des artefacts indésirables et rendrait les images difficilement interprétables. Comme un des problèmes est la flexibilité de la membrane et des protéines, il y aurait aussi la possibilité de rigidifier l'échantillon en abaissant la température. De plus, afin d'augmenter la probabilité d'interactions entre la toxine et les fragments membranaires, il serait intéressant de développer une méthode pour obtenir un plus grand nombre de fragments membranaires déposés

sur le mica puisqu'en ce moment, la proportion est plus faible que 1% de surface. D'autre part, on pourrait prendre des récepteurs isolés des toxines Cry1 pour essayer de les incorporer aux vésicules lipidiques de DPPC-DOPC et ainsi former une bicouche lipidique remplie de récepteurs disponibles à interagir avec les toxines. On pourrait aussi profiter des interactions toxine-toxine de la Cry1Ac pour tenter de former des réseaux étendus de toxine sur des bicouches lipidiques sans récepteur. On serait alors dans une situation idéale pour avoir la résolution nanométrique puisque tous les cas de haute résolution ont été observés alors qu'il y avait un agencement serré de protéines et/ou un réseau étendu de celles-ci. On pourrait aussi utiliser des anticorps afin de vérifier quelles parties de la toxine sont accessibles de l'extérieur ou afin de vérifier quels types de récepteurs sont disponibles sur les fragments membranaires de BBMV. Finalement, il serait intéressant d'utiliser l'AFM en mode reconnaissance en attachant, au bout de la pointe, une toxine ou un anticorps. La pointe balayerait la surface et il serait possible de détecter les endroits où la toxine ou l'anticorps a des interactions avec la surface. Il y aurait fort probablement, à ces endroits, les récepteurs des toxines Cry1. On pourrait ensuite faire incuber la toxine et voir si les structures apparaissent aux mêmes endroits que l'AFM en reconnaissance l'avait prédit.



## BIBLIOGRAPHIE

- Aimanova, K.G., Zhuang, M. et Gill, S.S. (2006)** Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **92**: 178-187.
- Aronson, A.I. et Shai, Y. (2001)** Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 1-8.
- Beegle, C.E. et Yamamoto, T. (1992)** History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* **124**:587-616.
- Bietlot, H.P.L., Vishnubhatla, I., Carey, P.R, Pozsgay, M. et Kaplan, H. (1990)** Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**:309-315.
- Biggin, P.C. et Sansom, M.S.P. (1996)** Simulation of voltage-dependent interactions of  $\alpha$ -helical peptides with lipid bilayers. *Biophys. Chem.* **60**:99-110.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J. et Li, J. (2005)** Crystal structure of the mosquitolarvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**:363-382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. et Lescar, J. (2006)** Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**:3391-3401.
- Borrer, D.J. et White, R.E. (1991)** *Les insectes du Québec et de l'Amérique du Nord*. Les Guides Peterson. Broquet, Québec, 408 pp.
- Bourassa, J.-P. (2000)** *Le moustique par solidarité écologique*. Les éditions du Boréal, Montréal, 240 pp.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. et Peferoen, M. (1992)** Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:247-253.
- Bravo, A., Gómez, I., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S. et Sobéron, M. (2004)** Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1667**:38-46.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M. (2007)** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* **49(4)**: 423-435.
- Carroll, J. et Ellar, D.J. (1997)** Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus*

- thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-bordermembrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **245**:797-804.
- Chen, Y., J. Y. Cai, T. Zhao, C. X. Wang, S. Dong, S. Q. Luo, and Z. W. Chen. (2005)** Atomic force microscopy imaging and 3-D reconstructions of serial thin sections of a single cell and its interior structures. *Ultramicroscopy.* **103**:173-182.
- Cioffi, M. (1979)** The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell.* **11**:467-479.
- Côté, J.-C. (1998)** *Bacillus thuringiensis*. État actuel, perspectives d'avenir. *Antennae* **5(1)**:13-15.
- Crickmore, N. (2006)** Beyond the spore - past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a bioinsecticide. *J. Appl. Microbiol.* **101**:616-619.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R, Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. et Dean, D.H. (1998)** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:807-813.
- Cumming, C.E., Armstrong, G., Hodgman, T.C. et Ellar, D.J (1994)** Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* **11**:87-92.
- Danker, T., Mazzanti, M., Tonini, R., Rakowska, A., and Oberleithner, H. (1997)** Using atomic force microscopy to investigate patch-clamped nuclear membrane. *Cell Biology International.* **21**:747-757.
- Derbyshire, D.J., Ellar, D.J. et Li, J. (2001)** Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAc and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Cryst.* **D57**:1938-1944.
- Dorsch, J.A., Candas, M., Griko, N.B., Maaty, W.S.A., Midboe, E.G., Vadlamudi, RK. et Bulla, L.A., Jr. (2002)** CryIA toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**:1025-1036.
- Dow, J.A.T. (1984)** Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246**:R633-R635.
- Dow, J.A.T. (1986)** Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**:187-328.

- Dow, J.A.T. et Peacock, J.M. (1989)** Microelectrode evidence for the electrical isolation of goblet cell cavities in *Manduca sexta* middle midgut. *J. Exp. Biol.* **143**: 101-114.
- El Kirat, K., Burton, I., Dupres, V., and Dufrene, Y. F. (2005)** Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of Microscopy.* **218**:199-207.
- English, L.H., Readdy, T.L., et Bastian, A.E. (1991)** Delta-endotoxin-induced leakage of  $^{86}\text{Rb}^+$ - $\text{K}^+$  and  $\text{H}_2\text{O}$  from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* **21**:177-184.
- English, L., Robbins, H.L., Von Tersch, M.A., Kulesza, C.A., Ave, D., Coyle, D., Jany, C.S., et Slatin, S.L. (1994)** Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**: 1025-1035.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. et Koziel, M.G. (1996)** Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal prote in with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5389-5394.
- Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J. et Bravo, A. (1997)** Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* **414**:313-318.
- Forsberg, C.W. (1977)** *Bacillus thuringiensis* : ses effets sur l'état de l'environnement. Conseil national de recherches du Canada, Comité associé du CNRC sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, Ottawa, 127 pp.
- Fortier, M., Vachon, V., Kirouac, M., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2005)** Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Journal of Membrane Biology* **208**:77-87.
- Fortier, M., Vachon, V., Marceau, L., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2007)** Kinetics of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Biochimica Biophysica Acta-Biomembranes* **1768**:1291-1298.
- Fortier, M. (2007a)** *Étude biophysique des facteurs influençant l'activité des toxines du bacille de Thuringe*. Thèse de doctorat, Département de physique, Faculté des arts et sciences, Université de Montréal. 161 pp.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A., and Palczewski, K. (2004)**

- The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Letters*. **564**:281-288.
- Frutos, R., Rang, C. et Royer, M. (1999)** Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**:227-276.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W. et English, L. (2001)** Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst.* **D57**: 1101-1109.
- Garczynski, S.F. et Adang, M.J. (1995)** *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**:409-415.
- Garczynski, S.F. et Adang, M.J. (2000)** Investigations of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin receptor structure and function. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-Le Roux, éd.) pp. 181-197, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gazit, E., Bach, D., Kerr, I.D., Sansom, M.S.P., Chejanovsky, N. et Shai, Y. (1994)** The  $\alpha$ -5 segment of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* **304**: 895-902.
- Gazit, K, La Rocca, P., Sansom, M.S.P. et Shai, Y. (1998)** The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12289-12294.
- Gerber, D. et Shai, Y. (2000)** Insertion and organization within membranes of the  $\delta$ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**:23602-23607.
- Gill, M. et Ellar, D. (2002)** Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* **11**:619-625.
- Giordana, B., Sacchi, V.F., Parenti, P. et Hanozet, G.M. (1989)** Amino acid transport systems in intestinal brush-border membranes from lepidopteran larvae. *Am. J. Physiol.* **257**:R494-R500.
- Goldberg, L.J. et Margalit, J. (1977)** A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and

*Culex pipiens*. *Mosq. News* **37**:355-358.

- Gómez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda-Ríos, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J.C., Bravo, A. et Soberón, M. (2006)** Specific epitopes of domain II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **281**:34032-34039.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. et Soberón, M. (2002)** Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -I in domain I oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**:242-246.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R. et Cygler, M. (1995)** *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447-464.
- Harvey, W.R. et Nedergaard, S. (1964)** Sodium-independent active transport of potassium in the isolated midgut of the cecropia silkworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**:757-765.
- Heerklotz, H. (2002)** Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophysical Journal.* **83**:2693-2701.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J. et de Maagd, R. (2005)** *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* Vol. 6, article 96, 10 pp.
- Hofmann, C. et Lüthy, P. (1986)** Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin to invertebrate cells. *Arch. Microbiol.* **146**:7-11.
- Hofmann, c., Lüthy, P., Hütter, R. et Pliska V. (1988a)** Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**:85-91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. et Van Mellaert, H. (1988b)** Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7844-7848.
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H., and Vaeck, M. (1988)** Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and*

*environmental Microbiology*. **54**:2010-2017.

**Höfte, H. et Whiteley, H.R (1989)** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.

*Microbiol. Rev.* **53**:242-255.

**Howland, R. and Benatar, L. (1993)** A practical guide to scanning probe microscopy. *Park scientific instruments*. 74 p.

**Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L. et Adang, M.J. (2004)** Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R<sub>1a</sub> cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 193-202.

**Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A. et Himeno, M. (1993)** Specific toxicity of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**:200-204.

**Ikezawa, H. (2002)** Glycosylphosphatidylinositol (Gpi)-Anchored Proteins. *Biological-and-Pharmaceutical-Bulletin* **25**:409-417.

**Jaquet, F., Hütter, R. et Lüthy, P. (1987)** Specificity of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:500-504.

**Janovjak, H., Kedrov, A., Cisneros, D. A., Sapra, K. T., Struckmeier, J., Muller, D. J. (2006)** Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. *Neurobiology of Aging*. **27**(4) : 546-561.

**Keeton, T.P. et Bulla, L.A., Jr. (1997)** Ligand specificity and affinity of BT-R<sub>1</sub>, the *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3419-3425.

**Kirouac, M., Vachon, V., Fortier, M., Trudel, M.-C., Berteloot, A., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2006)** A mechanical force contributes to the "osmotic swelling" of brush-border membrane vesicles. *Biophys. J.* **91**:3301-3312.

**Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J.-F., Girard, F., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2002)** Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1561**: 171-179.

**Knight, P.J.K., Crickmore, N. et Ellar, D.J. (1994)** The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**:429-436.

- Knowles, B.H. (1994)** Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275-308.
- Knowles, B.H. et Ellar, D.J. (1987)** Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* **924**:509-518.
- Kumar, P.A., Sharma, R.P. et Malik, V.S. (1996)** The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**:1-43.
- Kumaraswami, N. S., Maruyama, T., Kurabe, S., Kishimoto, T., Mitsui, T., and Hori, H. (2001)** Lipids of brush border membrane vesicles (BBMV) from *Plutella Xylostella* resistant and susceptible to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology.* **129**:173-183.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. et Vail, P. (2001)** Insect pathogens as control agents: Do they have a future? *Biol. Control.* **21**:230-248.
- Lacoursière, J.O. et Boisvert, J. (2004)** *Le Bacillus thuringiensis israelensis et le contrôle des insectes piqueurs au Québec.* Document préparé par l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le Ministère de l'environnement du Québec. Envirodoq : ENV /2004/0278, 101 pp.
- Lambert, B. et Peferoen, M. (1992)** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* **42**: 112-122.
- Lane, N.J., Harrison, J.B. et Lee, W.M. (1989)** Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial  $\delta$ -endotoxin. *J. Cell Sci.* **93**:337-347.
- Lane, N.J. et Skaer, H.L. (1980)** Intercellular junctions in insect tissues. *Adv. Insect Physiol.* **15**:35-213.
- Lecadet, M.M. et Martouret, D. (1967)** Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae*. II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* **9**:322-330.
- Leonardi, M. G., Marciani, P., Montorfano, P. G., Cappellozza, S., Giordana, B., and Monticelli, G. (2001)** Effect of fenoxycarb on leucine uptake and lipid composition of midgut brush border membrane in the silkworm, *Bombyx Mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **70**:42-51.
- Li, J., Carroll, J. et Ellar, D.J. (1991)** Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from

- Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815-821.
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B. et Ellar, D.J. (2001)** Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins from water soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571-577.
- Liang, Y., Patel, S.S. et Dean, D.H. (1995)** Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**:24719-24724.
- Luo, K., Lu, Y.-J. et Adang, M.J. (1996)** A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:783-791.
- Masson, L., Lu, Y.-J., Mazza, A., Brousseau, R. et Adang, M.J. (1995)** The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* **270**:20309-20315.
- Masson, L., B. E. Tabashnik, Y. B. Liu, R. Brousseau, and J. L. Schwartz. 1999.** Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *Journal of Biological Chemistry.* **274**:31996-32000.
- Moffett, D.F. et Koch, A.R. (1988)** Electrophysiology of K<sup>+</sup> transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae. I. The transbasal electrochemical gradient. *J. Exp. Biol.* **135**:25-38.
- Morse, R.J., Yamamoto, T. et Stroud, R.M. (2001)** Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409-417.
- Munro, S. (2003)** Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell.* **115**:377-388.
- Müller, D. J., Fotiadis, D., Scheuring, S., Müller, S. A., and Engel, A. (1999)** Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscopy. *Biophysical Journal.* **76**:1101-1111.
- Müller, D. J., Heymann, J. B., Oesterhelt, F., Möller, C., Gaub, H., Büldt, G., and Engel, A. (2000)** Atomic force microscopy of native purple membrane. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics.* **1460**:27-38.
- Oddou, P., Hartmann, H., Radecke, F. et Geiser, M. (1993)** Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b)  $\delta$ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.* **212**:145-150.



- Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2001)** Ion Channels Induced in Planar Lipid Bilayers by the *Bacillus Thuringiensis* Toxin CryIaa in the Presence of Gypsy Moth (*Lymantria Dispar*) Brush Border Membrane. *Journal-of-Membrane-Biology* **184**:45-54.
- Peyronnet, O., Nieman, B., Génereux, F., Vachon, V., Laprade, R. et Schwartz, J.L. (2002)** Estimation of the radius of the pores formed by *Bacillus thuringiensis* CryIc  $\delta$ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1567**:113-122.
- Puntheeranurak, T., Stroh, C., Zhu, R., Angsuthanasombat, C., and Hinterdorfer, P. (2005)** Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. *Ultramicroscopy.* **105**:115-124.
- Sacchi, V.F. et Wolfersberger, M.G. (1996)** Amino acid absorption. *Biology of the Insect Midgut* (Lehane, M.J. et Billingsley, P.F.) pp. 265-292, Chapman & Hall, Londres, Royaume-Uni.
- Sanchis, V. (2000)** Biotechnological improvement of *Bacillus thuringiensis* for agricultural control of insect pests: benefits and ecological implications. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-Le Roux, éd.) pp. 441-459, Kluwer Academie Publishers, Dordrecht.
- Sangadala, S., Walters, F.S., English, L.H. et Adang, M.J. (1994)** A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and  $^{86}\text{Rb}^+$ - $\text{K}^+$  efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**: 10088-10092.
- Sangadala, S., Azadi, P., Carlson, R., and Adang, M. J. (2001)** Carbohydrate Analyses of *Manduca Sexta* Aminopeptidase N, Co-Purifying Neutral Lipids and Their Functional Interactions With *Bacillus Thuringiensis* CryIac Toxin. *Insect-Biochemistry-and-Molecular-Biology* **32**:97-107.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. et Dean, D.H. (1998)** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Schultz, S.G. et Solomon, A.K. (1961)** Determination of the effective hydrodynamic radii of small molecules by viscometry. *J. Gen. Physiol.* **44**: 1189-1199.
- Schwartz, J.-L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. et Rousseau, E. (1993)** Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-

- selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**:53-62.
- Schwartz, J.-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R. et Masson, L. (1997a)** Restriction of intramolecular movements within the CryIAa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**:397-402.
- Schwartz, J. L., Lu, Y. J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., and Adang, M. J. (1997b)** Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *Febs Letters.* **412**:270-276.
- Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2000)** Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-Le Roux, éd.) pp. 199-217, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schwartz, J.-L., Potvin, L., Chen, X.J., Brousseau, R., Laprade, R. et Dean, D.H. (1997c)** Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3978-3984.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J.-F., Ais-Nielsen, J., Colman, D.R et Hendrickson, W.A. (1995)** Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**:327-337.
- Siegel, J.P. (2001)** The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**: 13-21.
- Slatin, S.L., Abrams, C.K. et English, L. (1990)** Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765-772.
- Stottrup, B. L., Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2004)** Nonequilibrium behavior in supported lipid membranes containing cholesterol. *Biophysical Journal* **86**:2942-2950.
- Terra, W. R., Costa, R. H., and Ferreira, C. (2006)** Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias.* **78**:255-269.
- Tojo, A. et Aizawa, K. (1983)** Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx morio*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:576-580.
- Tran, L.B. (2000)** *Effets du pH sur l'activité biologique des toxines du bacille de Thuringe dans l'intestin moyen du sphinx du tabac.* Mémoire de maîtrise,

Département de physique, Faculté des arts et des sciences, Université de Montréal.  
89 pp.

- Tran, L.B., Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R. (2001)** Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488-4494.
- Vachon, V., Préfontaine, G., Rang, C., Coux, F., Juteau, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., Frutos, R., Laprade, R., and Masson, L. (2004)** Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Applied & Environmental Microbiology* **70**:6123-6130.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. et Van Mellaert, H. (1989)** Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**:239-247.
- Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. et Van Mellaert, H. (1990)** Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-entotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378-1385.
- Vié, V., Van Mau, N., Pomarède, P., Dance, C., Schwartz, J.-L., Laprade, R., Frutos, R., Rang, c., Masson, L., Heitz, F. et Le Grimellec, C. (2001)** Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* **180**:195-203.
- Wang, G.-R., Liang, G.-M., Wu, K.-M. et Guo, Y.-Y. (2005)** Gene cloning and sequencing of aminopeptidase N3, a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ac toxin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Eur. J. Entomol.* **102**:13-19.
- Wolfersberger, M.G. (2000)** Amino acid transport in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **45**:111-120.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L. et Bulla, L.A., Jr. (2005)** Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* **12**:1407-1416.
- Zhu, Y.-C., Kramer, K.J., Oppert, B. et Dowdy, A.K. (2000)** cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**:215224.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez 1., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A. et Gill, S.S. (2002)** *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* **277**: 13 863-13 872.