

Université de Montréal

**Rôle des boucles interhélicales du domaine I dans la formation de pores
transmembranaires par la toxine insecticide Cry1Aa du bacille de Thuringe**

Par

Geneviève Lebel

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en physiologie

option biophysique et physiologie moléculaires

Mars 2003

©Geneviève Lebel, 2003



W

4

158

2003

15.093

AVIS

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

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
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Rôle des boucles interhélicales du domaine I dans la formation de pores
transmembranaires par la toxine insecticide Cry1Aa du bacille de Thuringe**

présenté par :

Geneviève Lebel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christiane Malo

Dr. Jean-Louis Schwartz

Dr. Roland Brousseau

Mémoire accepté le :

26 mai 2003

SOMMAIRE

La formation de pores dans la membrane apicale de l'intestin moyen des insectes sensibles constitue une étape cruciale dans le mode d'action des toxines insecticides de *Bacillus thuringiensis*. Afin d'étudier le mécanisme d'insertion des toxines dans la membrane, plusieurs mutants ont été employés. Chacun d'eux a été créé par la substitution d'un acide aminé dans une des sept boucles interhélicales du domaine I de la Cry1Aa par une cystéine, un résidu absent dans la toxine activée. La capacité de ces mutants à perméabiliser des vésicules de la membrane intestinale du sphinx du tabac (*Manduca sexta*) a été analysée par des mesures de gonflement osmotique. Tous les mutants, sauf V150C, sont capables de former des pores. L'augmentation du pH de 7,5 à 10,5, qui introduit une charge négative sur la cystéine, entraîne une diminution significative de la capacité à former des pores pour plusieurs mutants sans modifier celle de la Cry1Aa. La vitesse de formation et les propriétés des pores pour plusieurs mutants diffèrent significativement des valeurs obtenues pour la Cry1Aa. Ces résultats mettent en évidence le rôle des boucles du domaine I dans les changements conformationnels menant à l'insertion de la toxine dans la membrane et la formation des pores. Aucun des mutants n'a pu être totalement biotinylé avec des réactifs spécifiques aux cystéines, ce qui suggère que ces résidus sont faiblement réactifs dans la forme soluble de la toxine. Ceci résulte probablement d'une oxydation du groupement thiol de la cystéine en acide sulfénique et ses dérivés.

Mots-clé : *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*, perméabilité membranaire, formation de pores, toxine insecticide, mutagenèse dirigée, résidus cystéine, topologie membranaire, modifications chimiques, acide sulfénique et dérivés.

ABSTRACT

Pore formation in the apical membrane of the midgut epithelial cells of susceptible insects constitutes a key step in the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. To study the mechanism of toxin insertion into the membrane and the topology of the pores, several mutants have been used. Each of them were created by substituting an amino acid in one of the seven pore-forming domain (domain I) interhelical loops of Cry1Aa by cysteine, a residue which is absent from the activated toxin. The ability of each activated mutant to permeabilize midgut brush border membrane vesicles isolated from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, was examined with an osmotic swelling assay. All mutants except V150C were able to form pores. Increasing pH from 7.5 to 10.5, a procedure which causes the ionization of the thiol group of the cysteine, resulted in a significant reduction in the pore-forming ability of several mutants without affecting the activity of Cry1Aa. The rate of pore formation and the pore properties of almost all the mutants differed significantly from those of Cry1Aa. These results demonstrate a significant role of domain I interhelical loop residues in the conformational changes leading to toxin insertion and pore formation. None of the mutants could be efficiently labeled with cysteine-specific biotin derivatives, indicating that these residues were poorly reactive in the soluble form of the toxin. This is probably caused by an oxidative modification of the thiol group of the cysteine to sulfenic acid and its derivatives.

Keywords : *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*, membrane permeability, pore formation, insecticidal toxin, site-directed mutagenesis, cysteine residues, membrane topology, chemical modifications, sulfenic acid and derivatives.

TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xii
1. Le bacille de Thuringe.....	1
1.1. Les insectes nuisibles : une lutte très ancienne.....	1
1.2. Une ressource omniprésente.....	3
1.3. Il y a plus d'un siècle.....	5
1.4. Des outils de choix.....	5
1.5. Une bactérie au secours de la planète.....	6
1.6. Une arme biologique encore sous-utilisée.....	7
1.7. Autres bactéries entomopathogènes.....	9
1.8. L'innocuité du bacille de Thuringe vis-à-vis des organismes non visés.....	10
1.9. L'apparition inévitable de cas de résistance.....	13
2. Physiologie intestinale de l'insecte.....	16
2.1. De la larve à l'adulte.....	16
2.2. Notions de physiologie intestinale.....	16
3. Les toxines du bacille de Thuringe.....	22
3.1. Une nomenclature en plein essor.....	22
3.2. Structure atomique des toxines.....	23
3.2.1. Structure primaire.....	25
3.2.2. Structure secondaire et tertiaire.....	28

3.2.3. Structure quaternaire.....	34
3.3. Un mécanisme d'action en trois étapes.....	35
3.3.1. Solubilisation et activation de la protoxine.....	38
3.3.2. Liaison de la toxine activée à son récepteur.....	38
3.3.3. Insertion de la toxine activée dans la membrane intestinale.....	40
3.4. Un mécanisme de formation de pores encore hypothétique.....	43
3.5. Les origines physiologiques de la résistance.....	49
4. Des mutations les boucles interhélicales du domaine I modifient la vitesse de formation des pores par la toxine insecticide Cry1Aa du bacille de Thuringe dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.....	51
4.1. Introduction.....	51
4.2. Matériel et méthodes.....	52
4.2.1. Mutagenèse.....	52
4.2.2. Expression et purification.....	53
4.2.3. Préparation des vésicules de la membrane en bordure en brosse..	54
4.2.4. Gonflement osmotique.....	54
4.2.5. Analyse des données.....	55
4.3. Résultats.....	56
4.3.1. Capacité des mutants cystéine à former des pores.....	56
4.3.2. Propriétés des pores formés par les mutants.....	59
4.3.3. Cinétique de formation des pores par les mutants.....	61
4.4. Discussion et conclusion.....	62
5. Modifications chimiques des mutants cystéine.....	70
5.1. Introduction.....	70
5.2. Matériel et méthodes.....	71
5.2.1. Préparation des toxines et gonflement osmotique.....	71
5.2.2. Modifications chimiques.....	72
5.2.2.1. NEM.....	72
5.2.2.2. MTSEA-biotine.....	72

5.2.3. Analyses de type <i>western</i>	72
5.2.4. Purification sur une colonne d'avidine.....	73
5.3. Résultats et discussion.....	74
5.3.1. Analyse des effets des modifications chimiques sur la vitesse de formation des pores par les mutants cystéine.....	74
5.3.2. Détermination de la réactivité des résidus cystéine dans chacune des boucles interhélicales.....	79
5.3.3. Effet de l'oxydation du groupement thiol sur la réactivité des mutants cystéine.....	83
5.4. Conclusion.....	89
6. Conclusions et perspectives.....	91
7. Références bibliographiques.....	99

LISTE DES FIGURES

Chapitres 1, 2 et 3

Figure 1 : Coupe longitudinale du bacille de Thuringe (<i>Bacillus thuringiensis</i>).....	4
Figure 2 : Principaux types cellulaires de l'intestin moyen du sphinx du tabac.....	18
Figure 3 : Propriétés biophysiques des principales cellules épithéliales de l'intestin moyen du sphinx du tabac.....	20
Figure 4 : Structure tridimensionnelle de différentes toxines produites par le bacille de Thuringe obtenues par cristallographie à rayons X.....	26
Figure 5 : Représentation schématique de la structure primaire des toxines Cry....	27
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la Cry3Aa.....	29
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la Cry1Aa.....	31
Figure 8 : Mécanisme d'action des toxines du bacille de Thuringe.....	37
Figure 9 : Modèles hypothétiques d'insertion des toxines Cry dans la membrane intestinale.....	45

Chapitre 4

Figure 10 : Représentation schématique du domaine I illustrant la position approximative des résidus mutés dans la toxine insecticide Cry1Aa....	53
Figure 11 : Effet de l'introduction de résidus cystéine dans les boucles interhélicales de la Cry1Aa sur le gonflement osmotique des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.....	57
Figure 12 : Capacités des mutants cystéine à former des pores.....	58
Figure 13 : Effets des mutations sur la perméabilité membranaire au NMDG-Cl, KGlu, sucrose et raffinose.....	60
Figure 14 : Cinétique de formation des pores par les mutants cystéine.....	63

Chapitre 5

Figure 15 : Effet du NEM sur la vitesse de formation des pores par différents mutants de la Cry1Aa dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.....	76
--	----

Figure 16 : Effets de la biotine et de la streptavidine sur la vitesse de formation des pores par différents mutants de la Cry1Aa dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.....	78
Figure 17 : Électrophorèse de la Cry1Aa et des mutants activés sur un gel de polyacrylamide en présence de 10% (p/v) de dodécyle sulfate de sodium et coloré au bleu de Coomassie.....	81
Figure 18 : Accessibilité des résidus mutés de la Cry1Aa par analyse de type <i>western</i>	81
Figure 19 : Accessibilité des résidus mutés de la Cry1Aa après dénaturation par analyse de type <i>western</i>	82
Figure 20 : Voies d'oxydation du groupement thiol de la cystéine.....	84
Figure 21 : Effet de l'oxydation du groupement thiol de la cystéine du mutant Y153C sur la vitesse de formation des pores dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.....	86
Figure 22 : Effet du DTT sur l'oxydation du groupement thiol de la cystéine du mutant T122C.....	87
Figure 23 : Effet de l'EDTA et du DTT sur l'oxydation du groupement thiol de la cystéine du mutant T122C.....	89

Chapitre 6

Figure 24 : Étude topologique des pores formés par la Cry1Aa par l'utilisation d'agents modificateurs spécifiques à la cystéine.....	96
---	----

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 3

Tableau I : Classification et spectre d'activité insecticide des principales familles de toxines du bacille de Thuringe.....24

Chapitre 4

Tableau II : Cinétiques de formation des pores par les mutants cystéine dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.....64

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AEC : 3-amino-9-éthylcarbazole

AMSD : Acide 4-acétamido-4'-malinédylstilbène-2,2'-disulfonique

Caps : Acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Éthylènediaminetétraacétate

Hepes : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthanesulfonique

KGlu : Gluconate de potassium

Maléimide de biotine : 3-(*N*-maléimidylpropionyl)biocytine

MIANS : 2-(4'-maléimidylanilino)naphtalène-6-sulfonate de sodium

MTSEA-biotine : *N*-biotinylaminoéthyl méthanethiosulfonate

NEM : *N*-éthyl-maléimide

NMDG : *N*-méthyl-D-glucamine

NMDG-Cl : Hydrochlorure de *N*-méthyl-D-glucamine

PBS : *Phosphate buffered saline*

PM : Poids moléculaire

Tween 20 : Monolaurate de polyoxyéthylènesorbitan

Tris : Tris[hydroxyméthyl]aminométhane

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les professeurs Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade qui m'ont ouvert leur porte et m'ont ainsi donné la chance de réaliser ce captivant projet. Je remercie également l'équipe de l'Institut de recherche en biotechnologie, particulièrement Luke Masson, Gabrielle Préfontaine et Aliou Bah qui ont effectué la mutagenèse dirigée et m'ont fourni les précieux mutants.

Je remercie Lucie Marceau et Marc Juteau pour leur aide technique inestimable, laquelle a contribué à la bonne réalisation de mon travail durant ces trois années de maîtrise.

Je remercie spécialement Dominic Granger, Mireille Marsolais, Jean-François Noulain et Olivier Peyronnet pour leur support moral, leur solidarité et leurs nombreuses réflexions existentielles...

Je remercie l'ensemble du Groupe de recherche en transport membranaire, professeurs et étudiants, pour avoir participé à l'enrichissement de ma formation académique.

Dans ces dernières lignes, je tiens finalement à exprimer mon entière gratitude à Vincent Vachon, sans qui l'aboutissement d'un tel travail n'aurait pu voir le jour. Merci pour tes judicieux conseils et ta présence constante.

1. LE BACILLE DE THURINGE

1.1. Les insectes nuisibles : une lutte très ancienne

La classe des insectes comprend à elle seule plus de la moitié des animaux du globe, soit 67% des un million deux cent mille espèces animales connues (Borror *et al.*, 1992). Si l'on considère leur immense pouvoir reproducteur, incluant des stratégies multiplicatives telles que la parthénogenèse et la polyembryonie, une estimation de leur densité de population à l'échelle planétaire atteint rapidement un nombre prodigieux. En plus de constituer la principale source alimentaire de nombreux animaux, les insectes sont aussi très utiles à l'homme. En effet, plusieurs insectes sont d'importants pollinisateurs des plantes, ce qui génère des gains d'environ 4,5 milliards de dollars par année uniquement aux États-Unis (Borror et White, 1999). De plus, certains d'entre eux synthétisent des produits hautement appréciés, tels que le miel, la cire d'abeille, la soie et la laque, alors que d'autres rendent de grands services à la science en étant des modèles d'étude en génétique et en évolution. Soulignons en outre que beaucoup d'entre eux constituent des petits chefs-d'œuvre de la nature qui sont admirés dans plusieurs musées du monde. Malheureusement, certains insectes s'avèrent aussi extrêmement nuisibles en détruisant les récoltes et les forêts et en transmettant des maladies graves ou mortelles. Il est donc impératif d'exercer un contrôle rigoureux de leur abondance, tout en préservant les insectes bénéfiques.

L'utilisation d'outils de lutte entomologique ne date pas d'hier. En effet, le potentiel insecticide de différentes substances naturelles à base de composés minéraux ou végétaux était déjà connu dans l'Antiquité. Dans le passé, des

substances comme l'arsenic, la roténone et même la nicotine étaient employées par les agriculteurs pour se protéger des insectes (Darriet, 1998). Toutefois, la lutte entomologique à l'aide d'insecticides de synthèse contre les ravageurs agricoles et forestiers et les vecteurs de maladies ne s'amorce qu'au début du siècle dernier avec des armes chimiques telles que les huiles larvicides et les pyréthrinés. À la fin des années trente, le dichloro-diphényl-trichloréthane (D.D.T.), une découverte majeure dans le domaine des agents insecticides, entraîne une réduction considérable des épidémies d'insectes néfastes par son action au niveau du système nerveux. Toutefois, l'utilisation massive du D.D.T. et d'autres organochlorés au cours des années qui suivirent aboutit à l'apparition du phénomène de résistance des insectes à ces produits. La création de nouveaux insecticides neurotoxiques tels que les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes, ainsi que l'élaboration d'agents perturbant le système hormonal des insectes tels que des analogues de l'hormone juvénile, des inhibiteurs de synthèse de chitine et de croissance et des chimiostérilisants ont provoqué une trop forte pression de sélection d'individus résistants (Thiéry *et al.*, 1996). Il en a résulté qu'au début des années quatre-vingt dix, plus de cinq cents espèces d'insectes étaient devenues résistantes à au moins un insecticide (Georghiou, 1988, 1994). De plus, l'utilisation de ces produits chimiques a entraîné des effets désastreux sur l'environnement, telle que la contamination des sols et des cours d'eau, ainsi que l'intoxication de plusieurs organismes non visés. En fait, ils agissent sans discrimination de la cible, tuant ainsi un grand nombre d'insectes bénéfiques et nuisant considérablement à la santé des poissons, des oiseaux et des mammifères, incluant l'homme.

Il s'est donc avéré essentiel de développer des outils de lutte beaucoup plus respectueux de l'environnement et sécuritaires envers les organismes vivants non ciblés. C'est alors que l'étude des ennemis naturels des insectes, tels que certains protozoaires, virus, champignons et bactéries suscita un vif intérêt. La possibilité de développer des produits insecticides à base de ces microorganismes entomopathogènes fut rapidement envisagée, faisant alors apparaître le concept de biocontrôle ou lutte biologique. Ce défi, qui peut sembler irréalisable de prime abord, est admirablement relevé par des bioinsecticides à base du bacille de Thuringe. Depuis plusieurs années, les toxines produites par cette bactérie ont pris une importance considérable et constituent une arme de choix pour le contrôle biologique de par leur action spécifique ainsi que leur innocuité remarquable à l'égard de l'environnement, de l'homme et du reste de la faune.

1.2. Une ressource omniprésente

Le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*) est une bactérie Gram positive qui synthétise une variété de toxines insecticides hautement spécifiques n'agissant que sur certains groupes d'insectes. Il s'agit d'une bactérie aérobie facultative qui fait partie de la famille des Bacillacées, laquelle comprend plusieurs bactéries sporulantes en forme de bâtonnet (Fig. 1, p. 4). C'est un microorganisme ubiquiste présent dans tous les milieux et sous tous les climats, incluant la phyllosphère qui constitue la niche alimentaire des larves de la plupart des insectes sensibles (Martin et Travers, 1989; Smith et Couche, 1991; Kaelin *et al.*, 1994). De plus, les insectes, morts ou vivants, semblent être une niche écologique privilégiée pour le bacille de Thuringe. Il a d'ailleurs été récemment estimé qu'environ 40% des insectes hébergent au moins une spore viable de cette bactérie (Chaufaux *et al.*, 1997).

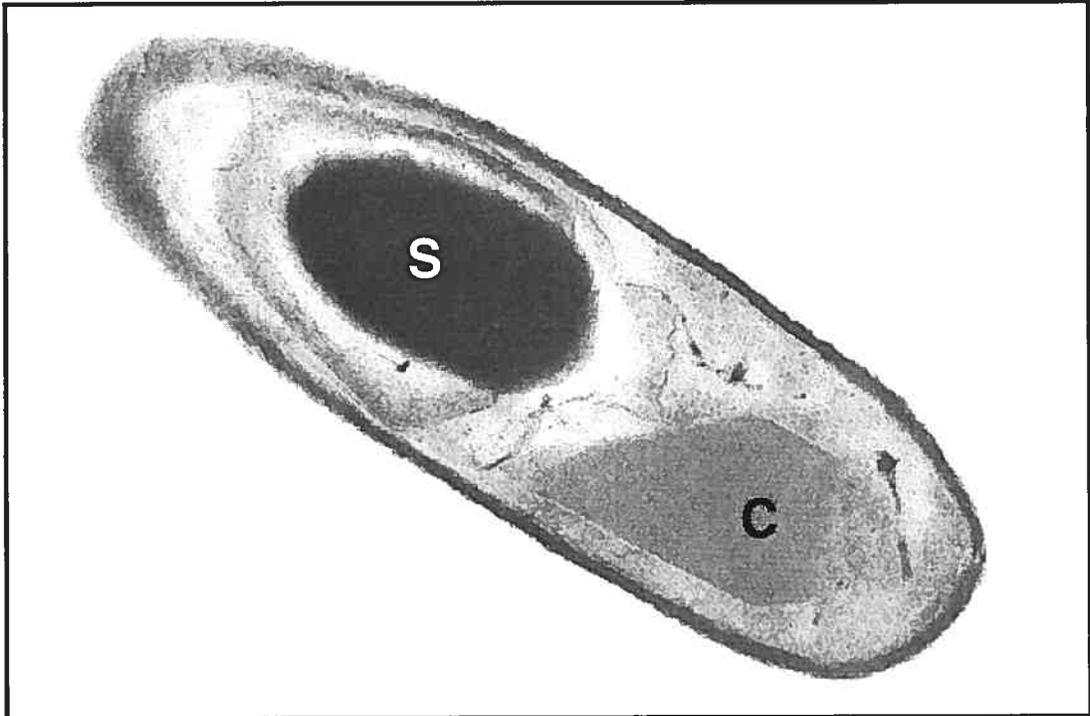


Fig. 1 : Coupe longitudinale du bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*). S : spore; C : cristal parasporal (de forme bipyramidale). Tiré de Sanchis *et al.* (1996).

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, lors d'une carence nutritionnelle ou d'une dessiccation par exemple, la croissance cellulaire de la bactérie s'arrête, celle-ci entre en phase stationnaire et la sporogénèse s'amorce à l'intérieur de la bactérie (Bulla *et al.*, 1980; Aronson, 2002). Les endospores ainsi formées sont des structures dormantes extrêmement résistantes qui offrent un moyen de survie ingénieux pour faire face aux conditions parfois rigoureuses de l'environnement (West *et al.* 1984, 1985; Petras et Casida, 1985). La formation des endospores s'accompagne de la production de corps d'inclusion cristallins parasporaux de forme géométrique variable ou amorphes (Hannay, 1953; Lecadet et Martouret, 1965; Schnepf *et al.*, 1998) (Fig. 1, p. 4). Ces

cristaux solides correspondent en fait à l'assemblage compact d'une ou plusieurs protéines, appelées δ -endotoxines, présentant des propriétés insecticides (Schnepf et Whiteley, 1981, 1985). Par exemple, la souche bactérienne *Bacillus thuringiensis* HD-1, variété *kurstaki*, produit les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2Aa (Höfte et Whiteley, 1989).

1.3. Il y a plus d'un siècle...

La découverte du bacille de Thuringe remonte à 1901 au Japon. Dans une magnanerie, Ishiwata (1901) identifia une souche bactérienne responsable de la flacherie (maladie de "sotto"), une affection mortelle des vers à soie (*Bombyx mori*). Elle fut alors nommée *Bacillus sotto* et considérée comme un fléau majeur pour la sériciculture. Son fort potentiel en tant qu'agent de contrôle biologique ne fut reconnu que dix ans plus tard, lorsque le biologiste allemand Berliner (1911) isola un bacille du même type dans des chrysalides de la teigne de la farine (*Ephestia kuehniella*) infectées. La souche fut alors appelée *Bacillus thuringiensis*, du nom de la province de Thuringe où elle avait été redécouverte.

1.4. Des outils de choix

Durant les années qui suivirent la découverte du bacille de Thuringe, les seuls insectes dont on connaissait la sensibilité à ce nouveau bioinsecticide appartenaient à l'ordre des lépidoptères. Les connaissances scientifiques concernant le spectre d'activité des toxines ne s'élargirent que soixante-cinq ans plus tard, lorsque Golberg et Margalit (1977) isolèrent en Israël une nouvelle souche du bacille (variété *israelensis*) qui s'attaque aux moustiques et à d'autres diptères,

ouvrant ainsi la voie à la lutte biologique contre les vecteurs de maladies. Un peu plus tard, une autre souche (variété *tenebrionis*) dont l'action pathogène est dirigée contre certains coléoptères fut découverte par Krieg *et al.* (1983). Le bacille de Thuringe constitue une espèce de bactéries comportant des dizaines de milliers de souches dont l'action est principalement dirigée contre trois ordres d'insectes, soit les lépidoptères, les diptères et les coléoptères (Dulmage, 1970; Höfte et Whiteley, 1989). D'autres recherches indiquent que certaines souches exercent aussi une activité pathogène contre certains hyménoptères, protozoaires, acariens, trématodes et nématodes (Bone *et al.*, 1988; Feitelson *et al.*, 1992; Garcia-Robles *et al.*, 2001) et même contre certains types de cellules cancéreuses en culture (Prasad et Shethna, 1976; Mizuki *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000).

1.5. Une bactérie au secours de la planète

Des formulations de spores et de cristaux du bacille de Thuringe sont commercialisées dès la fin des années trente (Sporéine[®], Bactospérine[®], Thuricide[®], etc.) (Beegle et Yamamoto, 1992). Les spores et les cristaux sont d'abord obtenus à partir de cultures bactériennes en fermenteurs et sont ensuite conditionnés sous forme de granulés, de suspensions aqueuses, de pastilles, de poudres mouillables ou de tablettes effervescentes pouvant être dispersés dans les forêts, les cultures agricoles ou les gîtes larvaires. Ainsi, ces produits permettent de réduire considérablement les ravages causés par les insectes phytophages, lesquels entraînent des pertes qui se chiffrent globalement à environ 30% par année (Lecadet, 1996). Par exemple, les pertes annuelles dues aux insectes que subit la production de coton passent de 84% sans traitement bioinsecticide à 41% après traitement (Sanchis *et al.*, 1996).

De plus, les insectes vecteurs transmettent chaque année à plus d'un demi-milliard de personnes des maladies graves telles que le paludisme (malaria), la fièvre jaune, la dengue et plusieurs autres encéphalites et filarioses, dont l'onchocercose (cécité des rivières) (Lecadet, 1996). Soulignons que le paludisme entraîne à lui seul la mort de près de deux millions d'Africains par an. Les responsables de la transmission de ces fléaux sont les moustiques et les simulies, deux familles de diptères nématocères. Grâce à l'emploi d'une variété d'insecticides comprenant des bioinsecticides à base du bacille de Thuringe, variété *israelensis*, on a pu réduire considérablement l'abondance de plusieurs vecteurs infectieux du paludisme dans des rizières en Chine (Ziniu et Longsheng, 1990), de la dengue en Colombie (Lecadet, 1996) et de l'onchocercose dans onze pays d'Afrique (Kurtak *et al.*, 1989; Guillet *et al.*, 1990; Federici, 1995).

1.6. Une arme biologique encore sous-utilisée

Le bacille de Thuringe est donc une arme bactériologique précieuse dans la lutte contre les insectes nuisibles et il n'est pas étonnant de constater qu'il représente près de 90% du marché mondial des bioinsecticides (Silvy et Riba, 1999). Paradoxalement, son utilisation demeure encore limitée, avec une part d'à peine plus de 2% du marché mondial des insecticides. En effet, les avantages écologiques du bacille de Thuringe sont souvent perçus comme des inconvénients considérables par l'industrie agrochimique et les agriculteurs. Premièrement, un spectre d'action hautement spécifique implique aussi un spectre d'action très restreint. Afin de cibler plus d'un ravageur pour une même culture, il faut avoir recours à des mélanges comprenant plus d'une souche bactérienne, ce qui occasionne des frais de production plus élevés. Deuxièmement, les formulations

actuelles, avec lesquelles les cultures sont aspergées, n'offrent aucune protection pour les parties non exposées des plantes comme les racines et les tissus internes des tiges et des feuilles. Finalement, la grande dégradabilité des cristaux par les rayons ultraviolets du soleil résulte en une faible persistance dans les champs et les forêts, ce qui nécessite des épandages plus fréquents, augmentant encore une fois les coûts d'utilisation (Pozsgay *et al.*, 1987; Pusztai *et al.*, 1991).

Fort heureusement, la recherche offre de plus en plus de solutions à ces problèmes. Afin d'accroître la longévité des cristaux contre le rayonnement ultraviolet, un bacille de Thuringe sécrétant de la mélanine grâce à une mutation a été obtenu (Saxena *et al.*, 2002). Dans le même but, des souches du bacille de Thuringe ou de *Pseudomonas fluorescens* ont été manipulées génétiquement pour obtenir des toxines encapsulées dans des bactéries asporogènes non viables qui ne lysent pas spontanément (Feitelson *et al.*, 1992; Sanchis *et al.*, 1996, 1999). Des gènes de toxines ont aussi été introduits dans différentes bactéries colonisatrices des racines (Obukowicz *et al.*, 1986; Stock *et al.*, 1990; Udayasuriyan *et al.*, 1995), incluant la bactérie symbiotique et fixatrice d'azote *Rhizobium leguminosarum* (Skot *et al.*, 1990). Lorsque cette bactérie colonise les nodules sur les racines de certaines légumineuses, l'expression des gènes de toxines offre une protection contre les ravageurs souterrains. Finalement, l'avancement des connaissances en génie génétique et en biotechnologie permet l'expression d'un ou plusieurs gènes de toxine dans une même plante. En effet, vers la fin des années quatre-vingts, sont apparues les premières plantes transgéniques à l'intérieur desquelles un gène codant pour une toxine du bacille de Thuringe avait été inséré afin de conférer aux plantes la capacité de produire elles-mêmes la toxine (Barton *et al.*, 1987; Fischhoff *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987; Delannay *et al.*, 1989; Perlak *et al.*, 1990; Fujimoto *et*

al., 1993). Depuis lors, la mise en marché de plusieurs plantes modifiées génétiquement, capables de synthétiser une ou plusieurs toxines insecticides, a été autorisée, notamment pour la pomme de terre, le coton et le maïs (de Maagd *et al.*, 1999c; Frutos *et al.*, 1999). De telles armes biotechnologiques permettent désormais l'atteinte de cibles multiples, la protection de toutes les parties de la plante ou des parties plus sensibles aux attaques et l'abolition des problèmes associés à l'épandage et à la dégradation des cristaux au sol.

1.7. Autres bactéries entomopathogènes

Bien que le bacille de Thuringe demeure le microorganisme de choix dans la lutte biologique de par la grande diversité des toxines qu'il synthétise, d'autres bactéries du genre *Bacillus* produisent des protéines qui s'avèrent toxiques pour certains insectes, ouvrant ainsi de nouvelles voies au développement d'outils entomopathogènes. C'est le cas de *B. sphaericus* dont l'activité pathogène des toxines Bin et Mtx sur les larves de plusieurs espèces de moustiques en a fait un outil grandement employé dans la démoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales en milieux urbain et rural (Kellen et Meyers, 1964; Singer, 1973; Wickremesinghe et Mendis, 1980; Weiser, 1984; Hougard et Back, 1992; Thiéry *et al.*, 1996). Grâce entre autres à ce microorganisme, d'importants programmes de lutte antivectorielle contre le paludisme ont été couronnés de succès en Afrique (Darriet, 1998) et en Amazonie (Rodrigues *et al.*, 1998). Il existe aussi d'autres bactéries possédant des propriétés entomopathogènes, telles que *B. popilliae*, contre certains scarabées, *B. laterosporus*, contre certains moustiques et simulies, *B. larvae*, contre les abeilles, et *B. lentimorbus*, contre certains coléoptères (Darriet, 1998). Toujours dans la famille des Bacillacées, une bactérie appartenant au genre

Clostridium, C. bifermentans, s'est révélée pathogène pour les diptères nématocères (de Barjac, 1990; Lee et Seleena, 1990). Toutefois, les molécules responsables de l'activité insecticide de cette bactérie demeurent encore inconnues (Juárez-Pérez et Delécluse, 2001).

1.8. L'innocuité du bacille de Thuringe vis-à-vis des organismes non visés

L'action hautement spécifique du bacille de Thuringe en fait un bioinsecticide remarquablement sécuritaire. Cette réputation enviable repose entre autres sur le fait que les produits insecticides à base du bacille de Thuringe sont utilisés depuis au moins quarante ans sans qu'aucune toxicité ou hypersensibilité grave associée à leur épandage n'ait été documentée. La plupart des travaux effectués en laboratoire ont démontré l'absence apparente de toxicité envers les vertébrés (McClintock *et al.*, 1995; Organisation mondiale de la santé, 1999; Betz *et al.*, 2000; Siegel, 2001). Quelques études ont aussi montré que l'épandage aérien d'insecticides à base de spores et de toxines du bacille de Thuringe ne présentait pratiquement pas de toxicité pour la population exposée et les travailleurs agricoles participant à l'application du bioinsecticide (Green *et al.*, 1990; Noble *et al.*, 1992; Pearce *et al.*, 2002). Chez ces derniers toutefois, des symptômes d'irritation ont été mentionnés, tels que des gerçures aux lèvres, un assèchement de la peau, des réactions allergiques cutanées et de légères irritations des yeux et des poumons (Noble *et al.*, 1992; Drobniewski, 1994; Bernstein *et al.*, 1999; Organisation mondiale de la santé, 1999). Les données épidémiologiques n'indiquent aucune vulnérabilité particulière pour les personnes immunocompromises (Noble *et al.*, 1992; Siegel, 2001). Les seuls cas d'infections humaines graves au bacille de Thuringe sont consécutives à des lésions traumatiques majeures, soit l'explosion d'une mine antipersonnel

(Hernandez *et al.*, 1998) ou des brûlures graves (Damgaard *et al.*, 1997) et dans les deux cas, les souches identifiées ne sont pas utilisées comme insecticides. Des analyses sanguines de travailleurs agricoles et forestiers exposés aux bioinsecticides indiquent une augmentation du taux d'anticorps, ce qui pourrait éventuellement provoquer une réaction allergique si les concentrations utilisées étaient accrues (Bernstein *et al.*, 1999; Vázquez-Padrón *et al.*, 1999). Ce risque suscite davantage d'inquiétude lorsqu'il est question des plantes transgéniques destinées à la consommation humaine (Bucchini et Goldman, 2002).

Un autre danger associé aux bioinsecticides à base du bacille de Thuringe est la présence d'entérotoxines dans les préparations commerciales. En effet, le bacille de Thuringe, *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* sont trois bactéries du sol qui synthétisent des entérotoxines et les seuls critères de classification permettant de les distinguer est la présence de cristaux parasporaux à action larvicide chez le premier et la production de la toxine du charbon chez le dernier. Toutefois, cela occasionne un problème taxonomique majeur puisque le plasmide portant les gènes qui codent pour les toxines, larvicides ou autres, peut être perdu ou transféré à un autre bacille (González *et al.*, 1982; Carlson *et al.*, 1994; Helgason *et al.*, 2000). Le niveau d'entérotoxine dans les souches commerciales du bacille de Thuringe est néanmoins de dix à cent fois plus faible que dans celui d'une souche pathogène de *Bacillus cereus* à l'origine d'empoisonnements alimentaires (Salamitou *et al.*, 1996). Aucun cas d'intoxication à l'entérotoxine relié aux épandages de souches insecticides n'a été signalé chez les humains, bien que des bactéries de type *Bacillus cereus* possédant des gènes d'entérotoxines aient été isolées à partir de fèces de travailleurs agricoles exposés aux bioinsecticides à base du bacille de Thuringe (Jensen *et al.*, 2002). De plus, il a été démontré que les entérotoxines

retrouvées dans les produits à base des souches *kurstaki* et *israelensis* du bacille de Thuringe ont la capacité de lyser certaines cellules humaines en culture et d'induire des réactions immunitaires (Tayabali et Seligy, 2000).

En ce qui concerne les autres organismes vivants, des travaux (Betz *et al.*, 2000; Meher *et al.*, 2002), incluant de nombreuses expériences réalisées pour le compte de l'Organisation mondiale de la santé (1999) en laboratoire et sur le terrain, ont montré que les préparations à base du bacille de Thuringe n'ont pas d'effets indésirables sur les oiseaux, les poissons et de nombreux autres vertébrés et invertébrés aquatiques non ciblés. Il en est de même pour la majorité des arthropodes non visés. Toutefois, des espèces apparentées de près aux insectes ciblés peuvent être affectées par de fortes doses de *Bacillus thuringiensis israelensis*, comme c'est le cas de certains moucheron qui appartiennent à l'ordre des diptères (Organisation mondiale de la santé, 1999). Rappelons aussi qu'il est connu depuis fort longtemps que le ver à soie est sensible à une toxine du bacille de Thuringe, la Cry1Aa. Finalement, une augmentation du taux de mortalité a été observée chez l'Abeille domestique (*Apis mellifera*) après qu'elle ait été soumise aux souches *thuringiensis* et *kurstaki* du bacille de Thuringe en phase végétative (Organisation mondiale de la santé, 1999). Il est donc clair que l'utilisation des produits à base des toxines du bacille de Thuringe et des nouvelles technologies, telles que les souches bactériennes et les plantes génétiquement modifiées, doit être finement régulée, de manière à préserver le maintien des interactions trophiques qui assurent la survie des espèces bénéfiques.

1.9. L'apparition inévitable de cas de résistance

Bien que les produits à base du bacille de Thuringe se révèlent d'excellents outils pour la lutte biologique, il n'en demeure pas moins que leur utilisation massive devrait, en toute probabilité, conduire à l'apparition de cas de résistance. Il s'agit d'un phénomène normal d'adaptation des insectes qui constitue malheureusement un problème majeur en agriculture, en foresterie et en santé publique lorsqu'il est question des insectes nuisibles. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'apparition d'une tolérance chez les insectes cibles, tels que la biologie de l'espèce, la variabilité génétique, le nombre de générations annuelles, la fécondité, la mono- ou polygamie, la capacité de migration, la durée et la fréquence des expositions aux produits, la dominance génétique de la résistance, le nombre de gènes impliqués et le coût biologique associé à l'acquisition de la résistance (Charles et Nielsen-LeRoux, 1996).

Le premier cas de résistance fut observé en 1979 et concernait des larves de la teigne du blé (*Plodia interpunctella*) provenant de silos à grains traités avec du Dipel®, un produit insecticide à base de la souche *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Kinsinger et McGaughey, 1979). Depuis, plusieurs études ont montré que beaucoup d'espèces d'insectes étaient capables de développer en laboratoire une résistance aux bioinsecticides. C'est le cas de nombreux lépidoptères tels que le légionnaire de la betterave (*Spodoptera exigua*), la noctuelle du tabac (*Heliothis virescens*), la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), la fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*) et le ver du cotonnier (*Spodoptera littoralis*), de quelques coléoptères tels que le doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*) et la chrysomèle du Liard (*Chrysomela scripta*) et finalement d'un diptère, le

moustique urbain (*Culex quinquefasciatus*) (Schnepf *et al.*, 1998; Frutos *et al.*, 1999). Dans la nature, quelques cas de résistance ont aussi été documentés. Le plus spectaculaire d'entre eux concerne la teigne des crucifères (*Plutella xylostella*). Cet insecte, déjà tolérant à presque tous les insecticides chimiques connus, a rapidement développé une résistance aux préparations commerciales de bioinsecticides à base du bacille de Thuringe dans des champs aux Philippines, en Malaisie, en Pennsylvanie, en Hawaï, en Floride et dans l'état de New York (Frutos *et al.*, 1999).

La stratégie à adopter aujourd'hui est la lutte intégrée. Il ne s'agit pas d'éradiquer les populations d'insectes nuisibles (Myers *et al.*, 1998), mais de diminuer leur nombre à un seuil tolérable de nuisance, de manière à réduire la pression de sélection qui favorise l'apparition du phénomène de résistance. Pour ce faire, les méthodes de lutte biologique, incluant l'utilisation de prédateurs naturels, doivent être combinées aux méthodes chimiques. Il n'existe d'ailleurs pas de résistance croisée entre les toxines du bacille de Thuringe et les insecticides chimiques de synthèse. Des formulations de bioinsecticides comprenant plusieurs toxines pourraient aussi s'avérer efficaces pour contrer l'apparition de cas de résistance. Par exemple, la souche *israelensis*, qui produit quatre toxines, Cry4A, Cry4B, Cry11A et Cyt1A, n'a pas entraîné de résistance chez les moustiques ou les simulies, malgré son utilisation massive et prolongée sur le terrain (Charles et Nielson-LeRoux, 1996; Wirth *et al.*, 2001). Des expériences de laboratoire ont cependant démontré une augmentation importante de la fréquence de résistance lorsque le nombre de toxines produites par cette bactérie était réduit à trois ou moins (Georghiou et Wirth, 1997; Wirth *et al.*, 2001). De plus, la diversification des techniques agricoles telles que la rotation des cultures, la création de zones refuges

ou l'amendement des sols constitue une tactique intelligente pour le contrôle des populations d'insectes ravageurs (McGaughey, 1992; Tabashnik *et al.*, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Frutos *et al.*, 1999). De cette façon, une partie de la population échappe à la sélection due aux insecticides, ce qui préserve des individus sensibles qui pourront diluer les gènes de résistance dans la population (Sanchis *et al.*, 1996).

2. PHYSIOLOGIE INTESTINALE DE L'INSECTE

2.1. De la larve à l'adulte

Les lépidoptères, tout comme les coléoptères et les diptères, sont des insectes dits *holométaboles*, c'est-à-dire dont le développement vital est caractérisé par une série de métamorphoses qui se traduisent par des modifications morphologiques majeures entre la phase larvaire et la phase adulte, aboutissant alors à une écologie distincte pour les deux groupes. Ces différences s'expliquent par l'existence d'un stade nymphal, dernier stade spécialisé entre la larve et l'adulte. Par exemple, chez le sphinx du tabac (*Manduca sexta*), un important ravageur des plants de tabac à l'état larvaire, une série de mues permettent la succession de cinq ou six stades larvaires, suivie de la nymphose. La larve se transforme alors en chrysalide, pour finalement aboutir au stade adulte, soit le papillon. Soulignons qu'au cours de ces métamorphoses il y a entre autres une transformation complète des pièces buccales de l'insecte qui s'accompagne d'un changement des habitudes alimentaires, soit d'un régime phytophage chez la larve à une diète nectarivore chez le papillon. C'est lorsque l'insecte est sous la forme d'une larve qu'il est nuisible pour l'environnement, car il consacre la majeure partie de son temps à se nourrir des tissus des plantes, ce qui occasionne des ravages considérables pour les cultures et les forêts.

2.2. Notions de physiologie intestinale

L'intestin de l'insecte constitue l'organe cible des toxines produites par le bacille de Thuringe. En effet, ces bioinsecticides opèrent selon un mécanisme

d'action qui se divise en plusieurs étapes bien définies, lesquelles conduisent à la formation d'un pore dans la membrane intestinale des insectes sensibles. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action détaillé des toxines et leur haute spécificité insecticide, il s'avère indispensable de traiter de la physiologie intestinale de l'insecte. Bien que cet aspect n'ait pas été pas grandement approfondi au cours des dernières années, l'étude de la physiologie intestinale des insectes et du mode d'action des toxines du bacille de Thuringe s'est surtout concentrée sur les lépidoptères, particulièrement au sphinx du tabac.

L'intestin des lépidoptères se divise en trois régions, soit l'intestin antérieur, moyen et postérieur (Dow, 1986) (Fig. 2, p.18). Chez la larve, l'intestin est représenté majoritairement par l'intestin moyen, site d'absorption des nutriments et site d'action des toxines du bacille de Thuringe. L'intestin moyen est lui aussi subdivisé en trois régions, soit les régions antérieure, médiane et postérieure (Fig. 2, p. 18). Cette subdivision repose entre autres sur le degré de repliement de l'épithélium intestinal et sur les variations structurales des principales cellules épithéliales qui composent l'intestin moyen (Cioffi, 1979). Ces dernières sont de deux principaux types, les cellules en colonne et les cellules en gobelet (Fig. 2, p. 18) (Anderson et Harvey, 1966; Akai, 1969; Smith *et al.*, 1969). Les cellules en colonne sont allongées et leur membrane apicale est faite de microvillosités (membrane en bordure en brosse) qui portent les récepteurs spécifiques pour la liaison des toxines du bacille de Thuringe (Hofmann et Lüthy, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a, b; Van Rie *et al.*, 1989, 1990a, b; Oddou *et al.*, 1993). Les cellules en gobelet renferment une large cavité formée par une invagination de la membrane apicale et dont l'extrémité apicale est fermée par une structure faite de microvillosités spécialisées, s'apparentant à une valve (Anderson et Harvey, 1966;

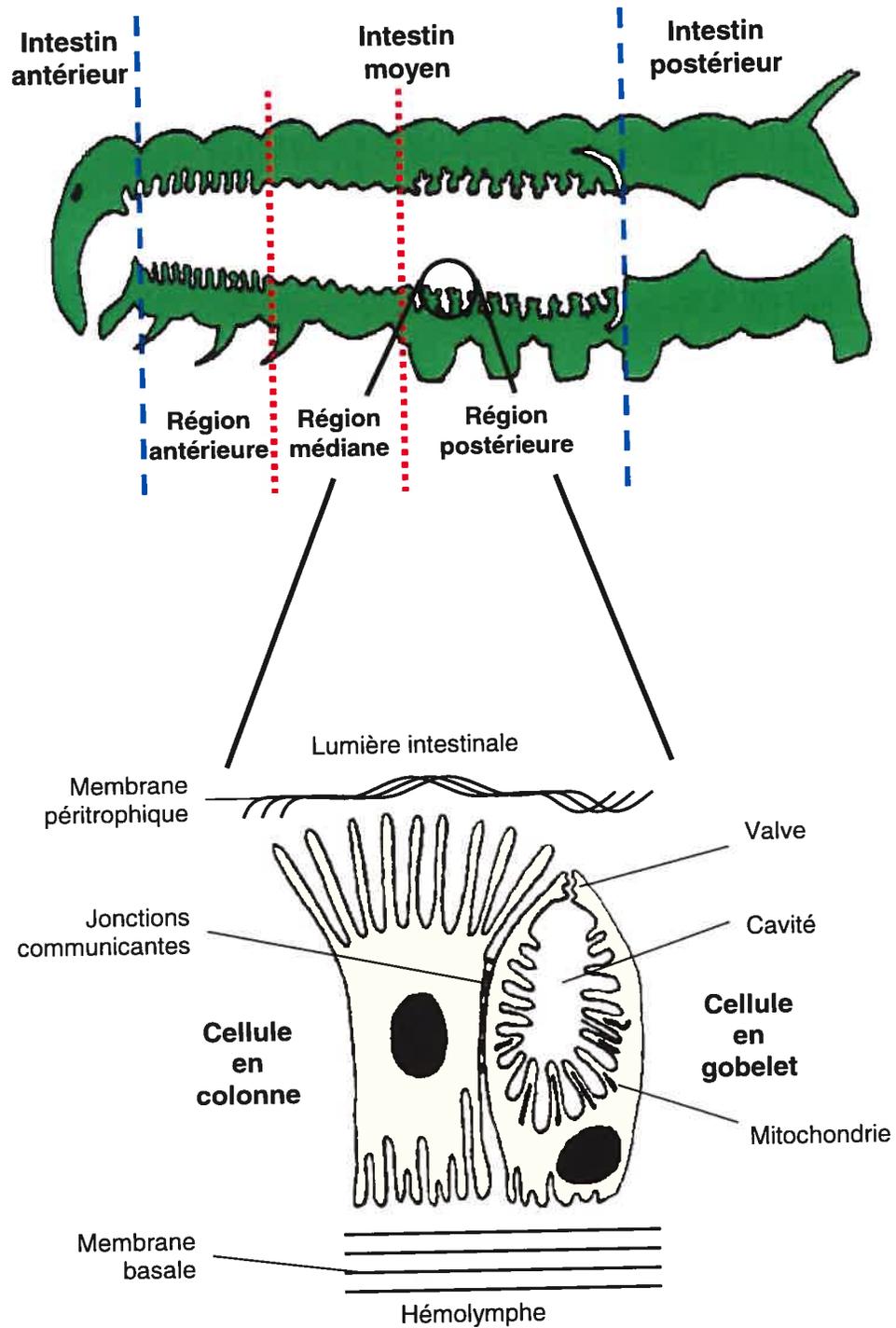


Fig. 2 : Principaux types cellulaires de l'intestin moyen du sphinx du tabac.
Adapté de Dow (1986).

Flower et Filshie, 1976; Cioffi, 1979; Moffett et Koch, 1992). Finalement, on retrouve des petits groupes de cellules régénératrices sous et entre les cellules épithéliales (Dow, 1986). La contribution de ces cellules à la croissance de l'épithélium intestinal, durant chaque stade larvaire, a été peu étudiée et pourrait différer d'un type d'insecte à l'autre (Dow, 1986). En revanche, il est clair qu'elles amorcent leur division cellulaire lorsque la larve cesse de se nourrir pour muer ou suite à une blessure telle qu'occasionnée, par exemple, par l'ingestion d'une dose sub létale de toxines du bacille de Thuringe (Waku et Sumimoto, 1971; Turbeck, 1974; Cioffi, 1984; Spies et Spence, 1985).

Des jonctions communicantes et serrées permettent le couplage électrique et chimique entre les deux principaux types de cellules épithéliales (Lane et Skaer, 1980; Moffet et Koch, 1988; Dow et Peacock, 1989; Lane *et al.*, 1989). L'intestin moyen des lépidoptères est caractérisé par la présence d'une intense activité de transport des ions potassium de l'hémolymphe vers la lumière intestinale (Harvey et Nedergaard, 1964; Blankemeyer et Harvey, 1978; Harvey *et al.*, 1983; Dow et Harvey, 1988). Les ions potassium traversent d'abord les cellules épithéliales grâce à des canaux potassiques situés dans la membrane basale et un échangeur H^+/K^+ couplé à une H^+ -ATPase de type vacuolaire localisés dans la membrane apicale des cellules en gobelet (Moffett *et al.*, 1982; Dow *et al.*, 1984; Moffett et Koch, 1985, 1988; Wieczorek *et al.*, 1989, 1991, 1999; Schirmanns et Zeiske, 1994) (Fig. 3, p. 20). Ils diffusent et quittent ensuite la cavité en passant par la valve des cellules en gobelet. De cette façon, la pompe H^+ -ATPase génère un potentiel transépithélial d'environ 150 mV (Dow et Peacock, 1989). Le gradient de potassium ainsi créé permet l'absorption de nutriments, tels que les acides aminés, par l'intermédiaire de co-transporteurs K^+ /acides aminés, situés dans la membrane en bordure en brosse

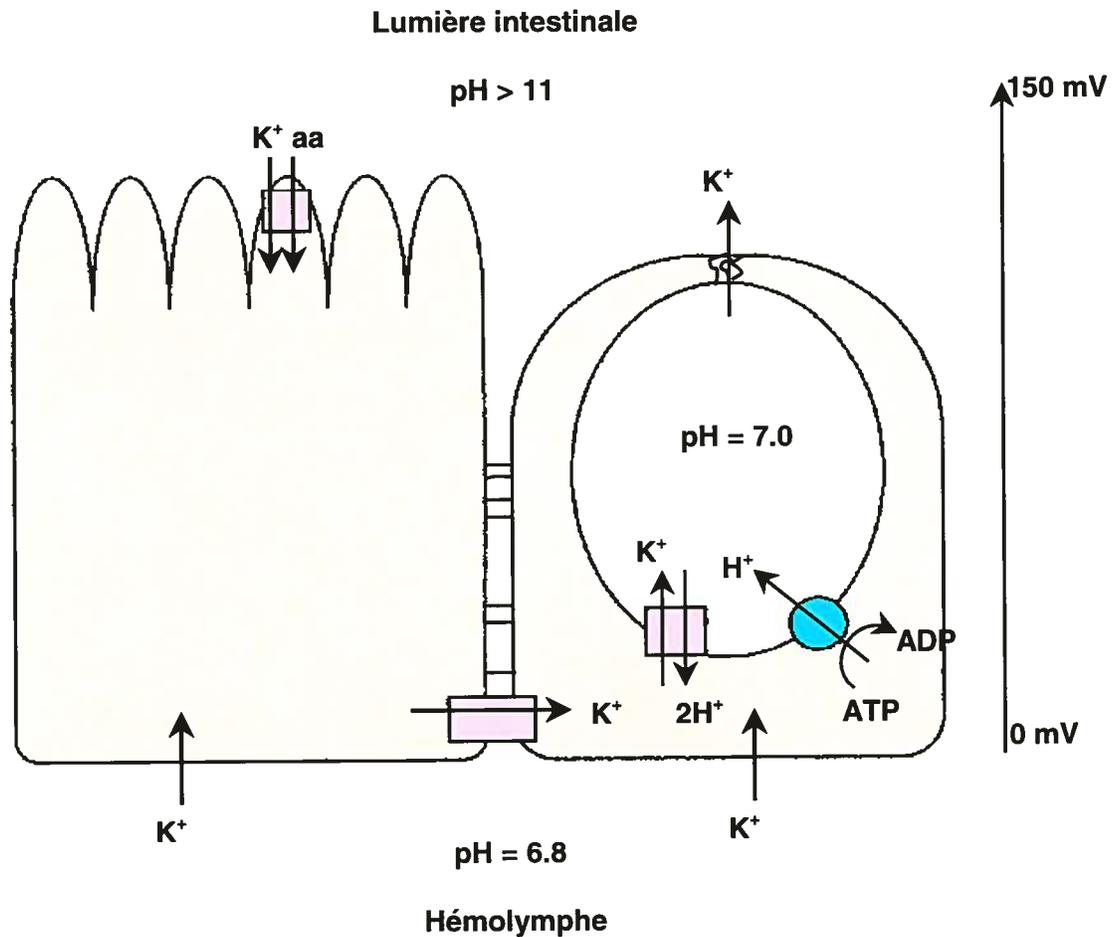


Fig. 3 : Propriétés biophysiques des principales cellules épithéliales de l'intestin moyen du sphinx du tabac. Adapté de Knowles (1994).

des cellules en colonne (Giordana *et al.*, 1989).

Une autre caractéristique importante de l'intestin moyen des larves des lépidoptères est la valeur exceptionnellement élevée du pH luminal, lequel peut atteindre des valeurs allant de 10,5 à près de 12, selon les espèces étudiées (Dow, 1984). Le pH fluctue aussi le long du canal alimentaire, y compris dans l'intestin

moyen. Par exemple, chez le sphinx du tabac, le pH de l'intestin moyen varie entre 8 et 11. Le trajet circulaire effectué par les protons, pompés d'abord dans la cavité des cellules en gobelet par l'ATPase, puis ramenés dans le cytoplasme de ces cellules par l'échangeur H^+/K^+ , dont la stœchiométrie est de $1 K^+/2 H^+$ (Azuma *et al.*, 1995), auquel s'ajoute l'intense gradient électrique produit dans les cellules en gobelet contribue à l'alcalinité du pH (Dow, 1992; Wieczorek *et al.*, 1999). De plus, selon Dow (1984, 1986, 1992), la dissociation d'un ion bicarbonate, provenant du métabolisme cellulaire, dans la lumière intestinale produit un proton qui retourne dans la cavité des cellules en gobelet et un ion carbonate qui s'accumule dans la lumière. Ce dernier s'associe avec deux ions potassium pour former du carbonate de potassium, contribuant ainsi à la valeur élevée du pH (Gringorten, 2001) (Fig. 3, p. 20).

3. LES TOXINES DU BACILLE DE THURINGE

3.1. Une nomenclature en plein essor

Les δ -endotoxines produites par le bacille de Thuringe peuvent être répertoriées dans deux groupes distincts dont les critères de classification reposent sur le spectre d'activité lytique et sur la structure tridimensionnelle des molécules connues à ce jour. Les protéines Cyt (*Cytolytic*) agissent *in vitro* sur un large spectre de types cellulaires, comprenant des cellules de mammifères, mais uniquement sur les diptères *in vivo*. Les protéines Cry (*Crystal*) exercent une activité *in vitro* et *in vivo* uniquement sur certains insectes et autres invertébrés, et sont de loin les toxines les plus utilisées dans la lutte biologique (Höfte et Whiteley, 1989). C'est aussi ce dernier groupe qui comprend le plus de toxines, dont les gènes *cry* se comptent aujourd'hui à plus d'une centaine.

Les gènes codant pour les δ -endotoxines Cry furent d'abord classifiés par Höfte et Whiteley (1989) selon leur homologie de séquence et le spectre d'activité larvicide des protéines produites. Toutefois, cette nomenclature s'est rapidement avérée inapplicable, étant donné que la découverte de nouvelles toxines a montré que l'homologie ne corrèle pas toujours avec l'activité insecticide. Par exemple, bien que la Cry1Aa et la Cry1Ba1 appartiennent à la même famille, leur spectre d'action diffère. La première toxine agit spécifiquement sur certains lépidoptères, alors que la seconde exerce son action entomopathogène à la fois sur certains lépidoptères, coléoptères et diptères (Höfte et Whiteley, 1989; Zhong *et al.*, 2000). En conséquence, un comité d'experts a élaboré une nouvelle nomenclature ne

conservant que l'identité de séquence des acides aminés comme critère de classification (Crickmore *et al.*, 1998). De cette façon, les gènes *cry* sont regroupés dans une quarantaine de familles ou classes identifiées par un chiffre et les toxines ayant moins de 45% d'identité se voient attribuer un nouveau chiffre. Les familles ainsi formées sont ensuite subdivisées en sous-familles et étiquetées par une nouvelle lettre majuscule si elles présentent entre 45 et 75% d'identité. Finalement, ces dernières sont encore subdivisées en sous-sous-familles et arborent une nouvelle lettre minuscule lorsqu'elles présentent entre 75 et 95% d'identité. De plus, afin d'éviter toute confusion entre les deux systèmes de classification, les chiffres romains ont été remplacés par des chiffres arabes et les parenthèses supprimées dans la nouvelle nomenclature. Par exemple, la toxine CryIII(a) de l'ancienne nomenclature s'écrit maintenant Cry3Aa. À l'aide de cette classification, quarante familles de toxines Cry et deux familles de toxines Cyt sont actuellement dénombrées (Crickmore *et al.*, 2003). Le tableau I (p. 24) présente les familles de toxines le plus étudiées.

3.2. Structure atomique des toxines

Le mécanisme par lequel les toxines Cry exercent leur action insecticide comprend trois étapes principales clairement identifiées : la solubilisation et l'activation de la protoxine, la liaison de la toxine activée à son récepteur et l'insertion de la toxine dans la membrane intestinale pour former un pore. Toutefois, avant de décrire chacune de ces étapes, il serait intéressant d'analyser en détail la structure atomique des toxines du bacille de Thuringe. Cette section portera donc sur plusieurs études structuro-fonctionnelles réalisées jusqu'à maintenant, alors qu'une

Tableau I : Classification et spectre d'activité insecticide des principales familles de toxines du bacille de Thuringe.

δ-ENDOTOXINES		PM Protoxines (kDa)	PM Toxines (kDa)	Cibles
Familles	Sous-familles			
Cry1	A	130 - 160	60	Lépidoptères, diptères, coléoptères
	B			
	C			
	D			
	E			
	F			
Cry2	A	70 - 71	65	Lépidoptères, diptères
	B			Lépidoptères
	C			
Cry3	A	73	55	Coléoptères
	B			
	C			
	D			
Cry4	A	134	46 - 48	Diptères
	B	128		
	C	58	?	
	D	72	30	Nématodes
Cry5	A	81,2	?	Lépidoptères, coléoptères
	B			
	C			
	D			
Cyt	A	27	25	Diptères, effets cytolytiques <i>in vitro</i>
	B	29	23	

D'après Höfte et Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992; Li, 1996; Li *et al.*, 1996; Rukmini *et al.*, 2000.

description physiologique du mécanisme d'action des toxines sera abordée dans la section suivante.

À l'heure actuelle, les structures atomiques de quatre toxines Cry, soit la Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), la Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), la Cry3Aa (Li *et al.*, 1991) et la Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), et d'une toxine Cyt, la CytB (Li *et al.*,

1996), ont été élucidées. Les structures des protéines Cry et Cyt présentent des disparités appréciables qui pourraient rendre compte des divergences fonctionnelles. Étant donné que la présente étude ne concerne que les protéines Cry, les sections suivantes traiteront uniquement de ce groupe. Bien que le spectre d'activité des toxines Cry puisse différer, la détermination de leur structure tridimensionnelle par cristallographie a permis de montrer qu'elles possèdent une structure semblable (Fig. 4, p. 26).

3.2.1. Structure primaire

Dans les cristaux produits durant la sporulation, les δ -endotoxines se présentent sous la forme de protoxines. Dans la famille des protéines Cry1, elles possèdent un poids moléculaire se situant entre 130 et 160 kDa. Au niveau de la structure primaire, on peut diviser les toxines en deux fragments fonctionnellement distincts (Gill *et al.*, 1992; Knowles, 1994; Schnepf *et al.*, 1998) (Fig. 5, p. 27). Le premier fragment, situé du côté N-terminal de la protoxine, correspond à la portion toxique de la protéine. Il peut être divisé à son tour en trois régions distinctes, lesquelles donneront naissance aux domaines qui composent la structure tertiaire de la toxine active. Le second fragment correspond à la moitié C-terminale de la protoxine et contribue à la formation du cristal et à sa stabilité structurelle. Ce fragment comporte en effet des cystéines qui forment des ponts disulfures entre les protoxines, ce qui assure le maintien de la structure cristalline compacte (Bulla *et al.*, 1980; Bietlot *et al.*, 1990).

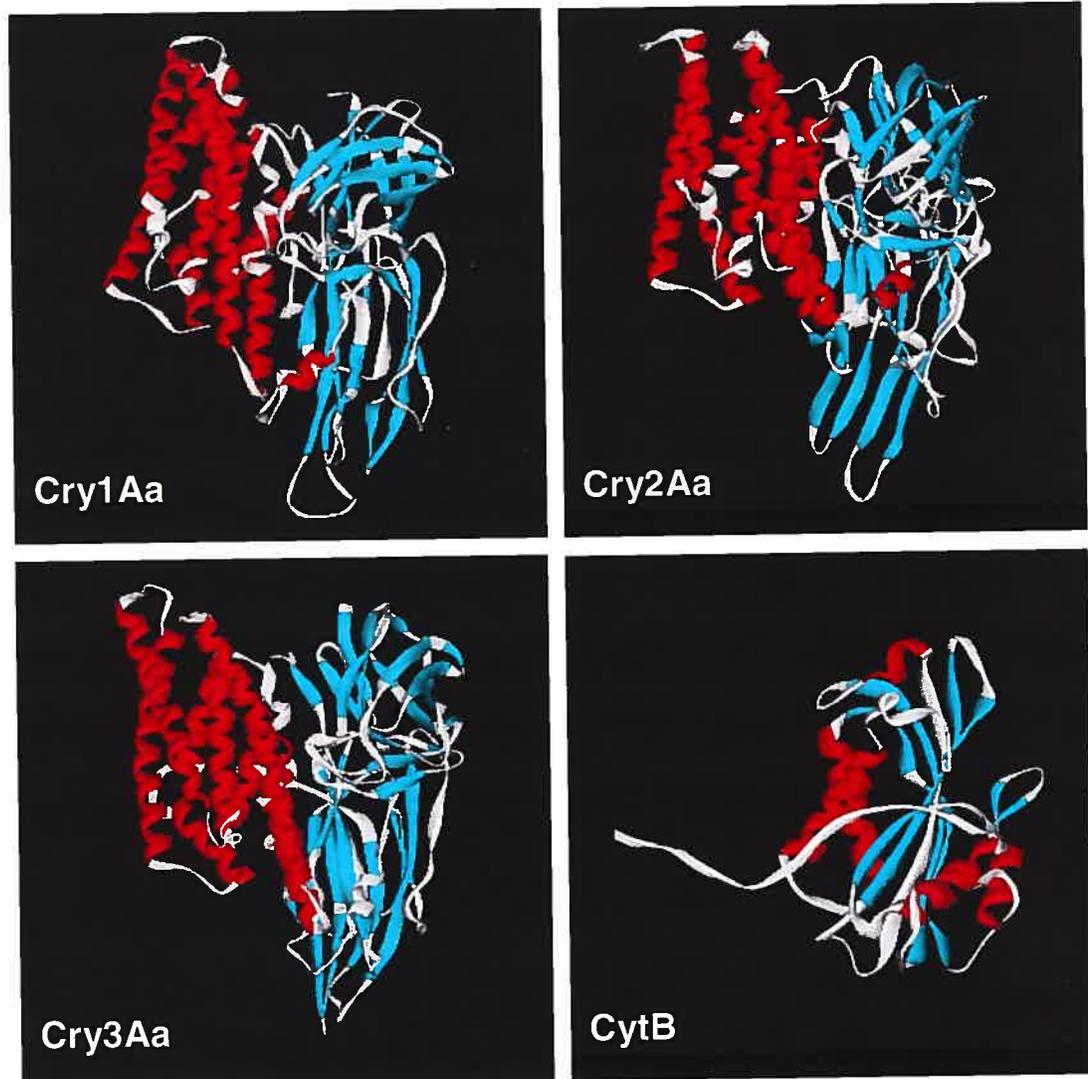


Fig. 4 : Structures tridimensionnelles de différentes toxines produites par le bacille de Thuringe obtenues par cristallographie à rayons X. Tirés de Grochulski *et al.* (1995) (Cry1Aa), Morse *et al.* (2001) (Cry2Aa), Li *et al.* (1991) (Cry3Aa) et Li *et al.* (1996) (CytB).

La structure primaire des toxines Cry comporte huit blocs d'acides aminés hautement conservés, séparés par des régions hypervariables (Höfte et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998) (Fig. 5, p. 27). Les cinq premiers blocs se situent dans

le fragment toxique de la protéine et sont présents chez de nombreuses toxines, ce qui expliquerait leur très grande similitude structurelle. Toutefois, l'élucidation de la structure atomique de la Cry2Aa remet en question le rôle et l'importance de ces motifs conservés. Morse *et al.* (2001) ont effectivement montré que la Cry2Aa arbore une structure tout à fait similaire aux autres toxines de la famille des protéines Cry et ce, même si elle ne possède que le premier et une forme tronquée

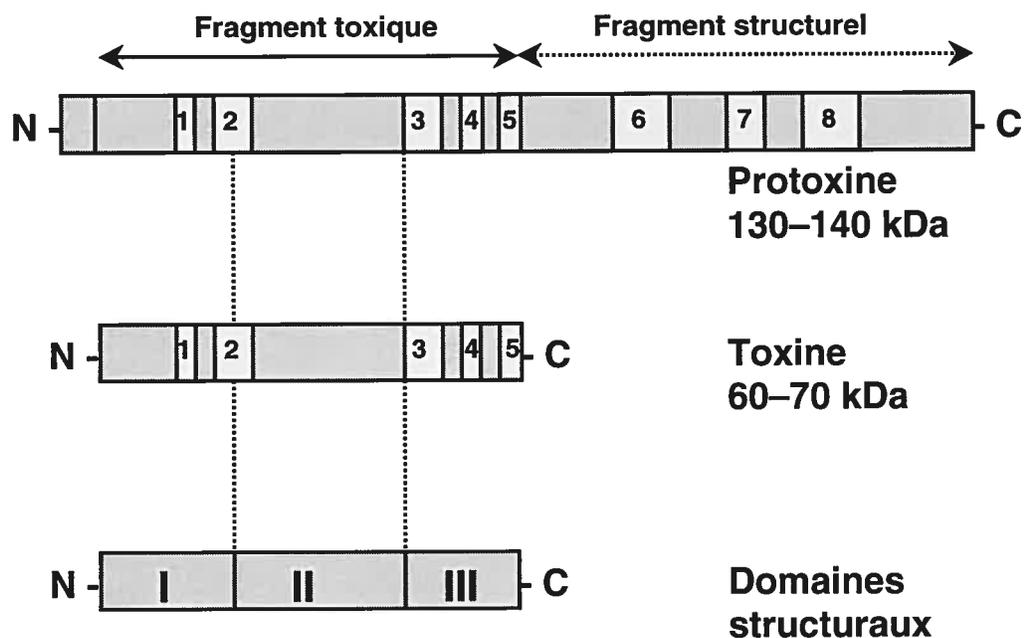


Fig. 5 : Représentation schématique de la structure primaire des toxines Cry.

La protoxine comporte huit blocs d'acides aminés hautement conservés qui sont représentés ici par des rectangles gris pâles. Au cours de l'activation, il y a clivage du fragment structurel et d'une trentaine d'acides aminés en amont du fragment toxique. La toxine activée est divisée en trois domaines structuraux. Adapté de Schnepf *et al.* (1998).

du deuxième des cinq blocs d'acides aminés (Schnepf *et al.*, 1998). Néanmoins, ce bloc semble jouer un rôle crucial dans le mécanisme de formation de pores de toutes les toxines Cry, puisqu'il englobe une hélice du domaine I potentiellement impliquée dans l'insertion membranaire, soit l'hélice 5. Les trois derniers blocs se retrouvent dans le fragment structurel de plusieurs protoxines. Par contre, il arrive que dans certaines toxines, le fragment structurel soit si court qu'il comporte moins de trois blocs. Par exemple, les toxines Cry2A, Cry11A, Cry13A et Cry18A ne possèdent aucun des trois premiers blocs (Schnepf *et al.*, 1998).

3.2.2. Structure secondaire et tertiaire

La structure tridimensionnelle de la toxine activée comprend trois domaines distincts (Fig. 6, p. 29). À l'extrémité N-terminale, le domaine I (acides aminés 29¹ à 253 dans la Cry1Aa) est formé d'un groupe de six hélices alpha amphipathiques, positionnées de manière antiparallèle, et qui entourent une hélice alpha hydrophobe, l'hélice 5 (Grochulski *et al.*, 1995). C'est le domaine I qui pourrait donc être responsable de l'insertion de la toxine dans la membrane, de par le caractère amphipathique de ses hélices et la longueur de certaines d'entre elles. Effectivement, les études cristallographiques effectuées sur certaines toxines ont montré que plusieurs hélices alpha du domaine I mesurent plus de 30 Å, notamment les hélices trois à sept, et sont donc suffisamment longues pour traverser la membrane intestinale des insectes sensibles (Li *et al.*, 1991, 2001; Grochulski *et al.*, 1995; Galitsky *et al.*, 2001; Morse *et al.*, 2001).

¹ Lors de l'activation (section 3.3.1., p. 38), le site de clivage est l'acide aminé en position vingt-huit, une arginine, cible habituelle des enzymes de type trypsine. Par conséquent, le domaine I débute à l'acide aminé vingt-neuf et non trente-trois, comme il a été décrit par Grochulski *et al.* (1995). Les acides aminés des régions N- et C-terminales ne sont pas disposés de façon assez régulière dans le cristal pour être détectés en cristallographie à rayons X et c'est pourquoi la structure atomique de la Cry1Aa élucidée par Grochulski *et al.* (1995) ne débute qu'au résidu trente-trois.

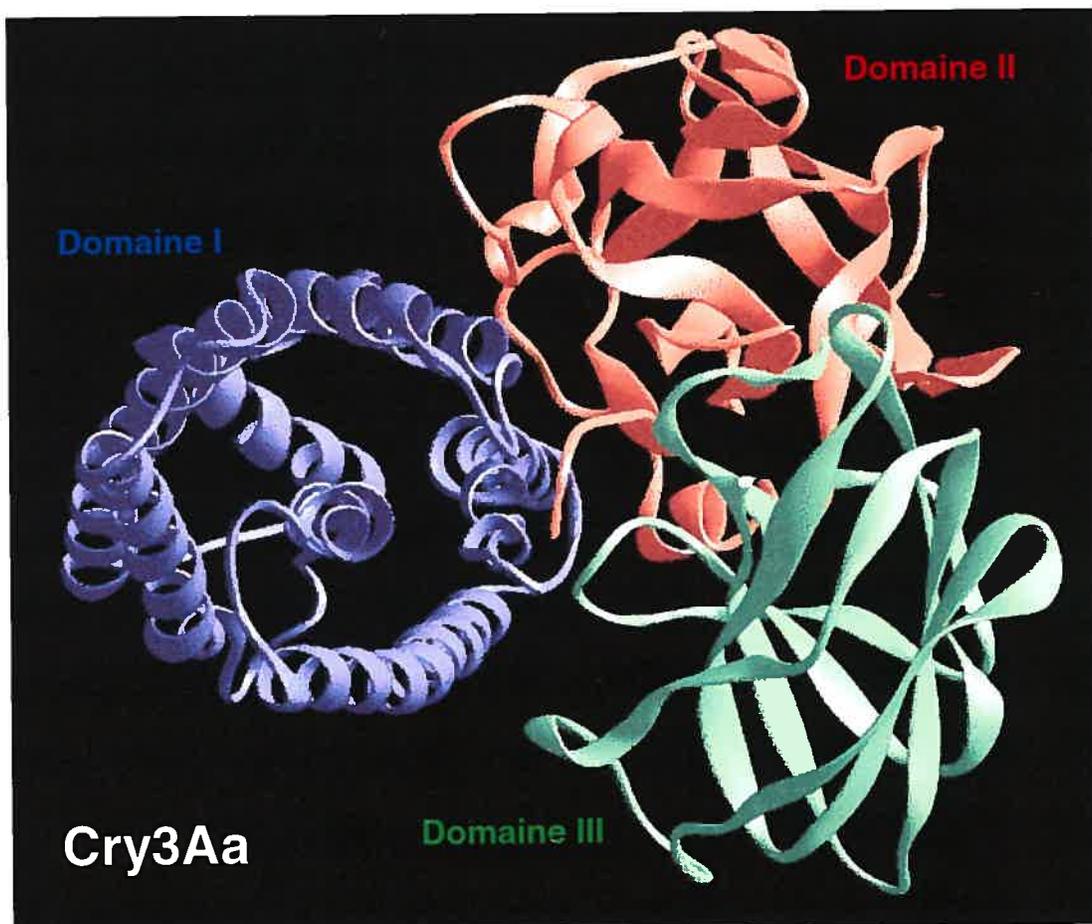


Fig. 6 : Structure tridimensionnelle de la Cry3Aa. Vue de dessus. Le domaine I apparaît en mauve, le domaine II en rouge et le domaine III en vert. Tiré de <ftp://us.expasy.org/databases/swiss-3dimage/IMAGES/GIF/S3D00506.gif>.

Le domaine II (acides aminés 265 à 461 dans la Cry1Aa) est composé de trois feuillets bêta antiparallèles et de deux courtes hélices alpha. La séquence du domaine II varie plus, selon les toxines, que celle des deux autres domaines. De plus, elle ne comporte aucun des blocs hautement conservés, à l'exception de l'extrémité C-terminale du bloc 2 correspondant au premier feuillet bêta du domaine II (β 1b) (Grochulski *et al.*, 1995). Ceci fait du domaine II un excellent candidat pour

assurer la spécificité des toxines. Le domaine de spécificité des toxines avait d'ailleurs été localisé à l'intérieur de la région correspondant au domaine II par Ge *et al.* (1989) avant même que la structure tridimensionnelle des toxines ne soit élucidée. Ces auteurs réalisèrent des toxines chimériques en remplaçant différentes régions d'une toxine agissant sur le ver à soie, la Cry1Aa, par le segment correspondant d'une toxine complètement inactive pour ce même insecte, la Cry1Ac. Toutes les chimères dans lesquelles la région comprise entre les acides aminés 332 à 450 de la Cry1Aa avait été substituée, complètement ou en partie, par le segment correspondant de la Cry1Ac avaient une toxicité significativement réduite ou abolie envers le ver à soie. Réciproquement, le remplacement de ce segment dans la Cry1Ac par celui de la Cry1Aa a produit une protéine dont la toxicité envers cet insecte était comparable à celle de la Cry1Aa. Des études similaires, réalisées à l'aide d'autres toxines chimériques et d'autres insectes, ont confirmé l'importance du rôle joué par le domaine II dans la spécificité des toxines (Schnepf *et al.*, 1990; Widner et Whiteley, 1990; Ge *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1994). De plus, plusieurs analyses fonctionnelles portant sur des protéines mutées ont aussi montré que ce domaine jouait un rôle clef dans la liaison des toxines aux récepteurs spécifiques situés sur la membrane intestinale des insectes cibles (Lu *et al.*, 1994; Smith et Ellar, 1994; Rajamohan *et al.*, 1995, 1996a, b, c; Lee *et al.*, 1996b, 2000, 2001; Smedley et Ellar, 1996; Wu et Dean, 1996; Abdul-Rauf et Ellar, 1999; Jenkins *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2001). Ces travaux ont notamment mis en évidence le rôle crucial des boucles 1, 2 et 3 du domaine II dans la liaison des toxines à leurs récepteurs. Ces trois boucles occupent une région très exposée de la molécule, située du côté opposé au domaine III (Fig. 7, p. 31).

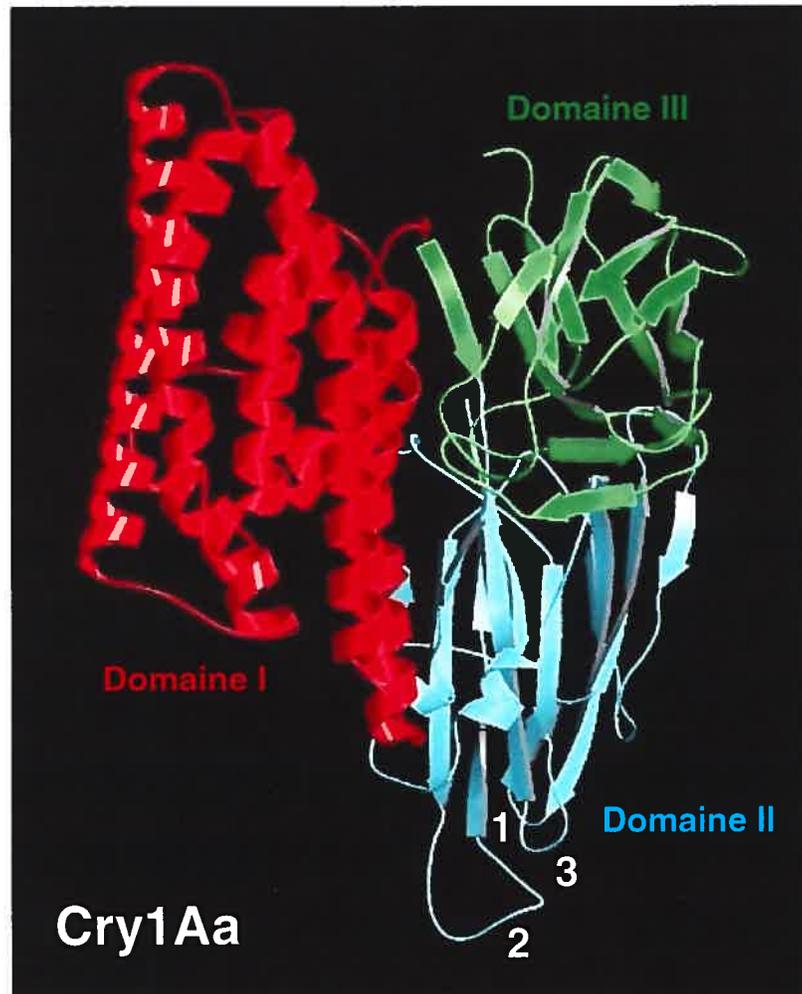


Fig. 7 : Structure tridimensionnelle de la Cry1Aa. Le domaine I apparaît en rouge, le domaine II en bleu et le domaine III en vert. Les numéros correspondent aux trois boucles du domaine II impliquées dans la liaison des toxines à leurs récepteurs. La boucle 1 comprend les acides aminés 310 à 313, la boucle 2 comprend les acides aminés 361 à 379 et la boucle 3 comprend les acides aminés 438 à 446.

Finalement, le domaine III comprend les résidus 463 à 609 ainsi qu'un petit segment (résidus 254 à 269) correspondant au feuillet β 1a situé entre les domaines I et II dans la structure primaire de la Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995). Il s'organise en un

sandwich bêta de deux feuillets bêta antiparallèles et joue plusieurs rôles importants dans le fonctionnement de la toxine. D'abord, différents chercheurs lui ont attribué un rôle clef dans le maintien de la structure de la toxine, puisque certains de ses acides aminés forment des liens hydrogènes et des ponts salins avec les autres domaines (Li *et al.*, 1991, Grochulski *et al.*, 1995). Aussi, des mutations effectuées dans les blocs 4 et 5 du domaine III ont provoqué une diminution de la production de protoxines, suggérant une perte de stabilité (Chen *et al.*, 1993; Nishimoto *et al.*, 1994, Masson *et al.*, 2002b). L'analyse d'autres mutations a révélé que le domaine III pouvait aussi jouer un rôle important dans la spécificité des toxines et la reconnaissance des récepteurs membranaires. Effectivement, la création de mutations dans le domaine III de la Cry1Ac a provoqué une diminution de la liaison de la toxine au récepteur aminopeptidase N du sphinx du tabac (Burton *et al.*, 1999; de Maagd *et al.*, 1999a; Jenkins *et al.*, 1999). L'échange du domaine III de différentes toxines peut également modifier la spécificité (Ge *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995, de Maagd *et al.*, 1996a, b, 1999a, b) selon les toxines et les insectes étudiés. Par exemple, une étude récente réalisée avec des chimères de différentes toxines actives ou non contre la teigne des crucifères a montré que le domaine III n'est en aucun cas impliqué dans la spécificité chez cet insecte et que cette fonction est probablement assurée par le domaine II (Ballester *et al.*, 1999). Finalement, le domaine III semble participer au fonctionnement du pore, peut-être par une modulation de l'activité du domaine I (Chen *et al.*, 1993; Wolfersberger *et al.*, 1996, Schwartz *et al.*, 1997b; Burton *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 2002b).

Malgré les rôles respectifs de chacun des domaines, plusieurs expériences ont démontré la nécessité d'une interaction des trois domaines pour un

fonctionnement optimal de la toxine. Par exemple, des mutations dans le quatrième bloc conservé de la toxine, situé dans le domaine III, entraînent des modifications des propriétés de perméabilité, y compris celles de conduction du canal (Chen *et al.*, 1993; Wolfersberger *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997b). De nombreuses études effectuées à l'aide de protéines chimériques ont aussi permis de mettre en évidence que l'existence d'interactions entre les domaines optimise le fonctionnement des toxines (Schnepf *et al.*, 1990; Ge *et al.*, 1991, Honée *et al.*, 1991; de Maagd *et al.*, 2000). Il a été démontré par Jenkins *et al.* (2000) que la liaison de la Cry1Ac au récepteur aminopeptidase N de la spongieuse (*Lymantria dispar*) s'effectue selon un processus en deux temps. En premier lieu, une région du domaine III reconnaît le récepteur et s'y lie via un site de faible affinité. Une fois l'ancrage effectué, une région du domaine II se lie à un deuxième site, de plus haute affinité, ce qui initie l'insertion membranaire. De plus, Flores *et al.* (1997) ont montré qu'une toxine formée uniquement des domaines II et III de la Cry1Ab ne lie que le récepteur de type cadhérine de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac, ce qui suggère que la liaison au récepteur aminopeptidase N de 120 kDa, lui aussi exprimé dans la membrane de l'insecte, pourrait nécessiter la participation du domaine I, soit en interagissant directement avec le récepteur, soit en modulant l'activité d'un ou des deux autres domaines. Enfin, des expériences réalisées avec des protéines chimériques conduisirent à des conclusions similaires après qu'un hybride comprenant les domaines II et III de la Cry1C, une toxine active contre le légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*), et le domaine I de la Cry1E se soit révélé inactif contre des cellules Sf9 qui sont pourtant sensibles à la Cry1C (Rang *et al.*, 1999). Plusieurs autres chimères combinant les domaines de différentes toxines se sont également révélées déficientes dans la formation du cristal ou non toxiques (Rang *et al.*, 2001).

3.2.3. Structure quaternaire

L'enregistrement de plusieurs niveaux de sous-conductance en bicouches lipidiques planes artificielles (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Racapé *et al.*, 1997) ou auxquelles des vésicules de la membrane en bordure en brosse ont été fusionnées (Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001), ainsi que l'estimation du diamètre du pore de 10-26 Å (Knowles et Ellar, 1987; Carroll et Ellar, 1997; Villalon *et al.*, 1998; Peyronnet *et al.*, 2002), suggèrent fortement qu'il y a oligomérisation de la toxine dans la membrane. Des mutations dans l'hélice 4 (Tigue *et al.*, 2001) et l'hélice 5 (Aronson *et al.*, 1999) du domaine I ont montré qu'elles joueraient un rôle important dans l'oligomérisation. D'autres expériences réalisées avec des peptides synthétiques correspondant à l'hélice 5 ont permis aussi de conclure à sa participation dans ce processus (Gazit et Shai, 1993, 1995; Cummings *et al.*, 1994; Gazit *et al.*, 1994; Gerber et Shai, 2000).

Toutefois, le nombre exact de sous-unités, ainsi que le moment précis où l'oligomérisation s'effectue demeurent encore inconnus. Bien que peu d'études aient véritablement porté sur cette question, l'architecture finale des pores formés par les toxines du bacille de Thuringe est maintenant de plus en plus discutée dans la littérature. Plusieurs expériences réalisées avec différentes toxines en solution donnèrent des indications quant à la structure quaternaire des toxines. Les résultats de ces travaux ont révélé la présence simultanée de monomères et d'assemblages formés de deux (Walters *et al.*, 1994), trois (Masson *et al.*, 2002a), quatre (Feng et Bechtel, 1994) et même plus de dix sous-unités (Güereca et Bravo, 1999). Toutefois, il semblerait que la formation et le maintien de la stabilité de certains agrégats dépendent de plusieurs facteurs physico-chimiques, tels que le pH, la force

ionique, la température et la composition du tampon (Feng et Bechtel, 1994; Masson *et al.*, 2002a).

Néanmoins, les premières démonstrations d'agrégation furent fournies par des études d'extraction de pores formés dans des vésicules membranaires (Aronson *et al.*, 1999; Tigue *et al.*, 2001). Des monomères et des assemblages formés de deux et trois sous-unités ont ainsi été détectés (Aronson *et al.*, 1999; Tigue *et al.*, 2001). D'autre part, la microscopie à force atomique, une technique qui mesure la topographie d'un échantillon à l'échelle nanométrique par les variations de la lumière réfléchie par un levier qui balaie la surface de bicouches lipidiques préalablement traitées avec des toxines, a permis de mettre en évidence la présence de structures tétramériques (Vié *et al.*, 2001). Ce résultat est en accord avec le modèle proposé par Schwartz et son équipe (Schwartz *et al.*, 1997a; Masson *et al.*, 1999).

Quant au moment de l'insertion, quelques études suggèrent que l'oligomérisation aurait lieu une fois la toxine insérée (Gazit *et al.*, 1998; Aronson *et al.*, 1999; Güereca et Bravo, 1999; Masson *et al.* 1999). Toutefois, une analyse récente montre que l'oligomérisation de la Cry1Ac s'amorcerait lors de la liaison au récepteur, puisque l'aminopeptidase N de 115 kDa du sphinx du tabac possède deux sites de liaison et que la toxine monomérique s'y lierait dans un rapport 2:1 (Masson *et al.*, 2002a).

3.3. Un mécanisme d'action en trois étapes

Tel que mentionné à la section précédente, le mode d'action des toxines du bacille de Thuringe comprend trois étapes, soit la solubilisation et l'activation de la

protoxine, la liaison de la toxine à son récepteur et son insertion dans la membrane intestinale de l'insecte cible (Fig. 8, p. 37). Il est important de souligner que ce n'est pas l'insertion proprement dite de toxines bactériennes dans l'intestin des insectes qui provoque leur mort, mais plutôt les perturbations physiologiques conséquentes à ces ouvertures dans la barrière intestinale. En effet, Spies et Spence (1985) ont démontré que l'épithélium intestinal de larves du sphinx du tabac exposé à des doses sublétales de toxines était capable de se régénérer, permettant aux individus de poursuivre leur développement normal.

Lorsque les larves d'insectes nuisibles se nourrissent des feuilles de végétaux préalablement traités avec un insecticide à base du bacille de Thuringe, elles avalent un mélange de spores et de cristaux. En raison du pH alcalin et des conditions réductrices qui caractérisent la lumière intestinale de l'intestin moyen de la plupart des insectes sensibles, les ponts disulfures qui assurent la structure cristalline compacte sont rompus et les cristaux sont solubilisés en une protoxine de 60 à 160 kDa selon les familles (Jaquet *et al.*, 1987; Bietlot *et al.*, 1990) (Fig. 8, p. 37). Le mécanisme d'activation peut également varier d'une toxine à l'autre en fonction des conditions du tube digestif des insectes cibles. Par exemple, la toxine Cry3Aa, active contre les coléoptères, ne compte pas de région C-terminale riche en ponts disulfures dans sa protoxine (Li *et al.*, 1991). Ainsi, le pH du contenu intestinal des coléoptères étant neutre ou légèrement acide, l'activation protéolytique de la protoxine de Cry3Aa s'effectue par le clivage des cinquante-sept premiers acides aminés de la chaîne (Li *et al.*, 1991).

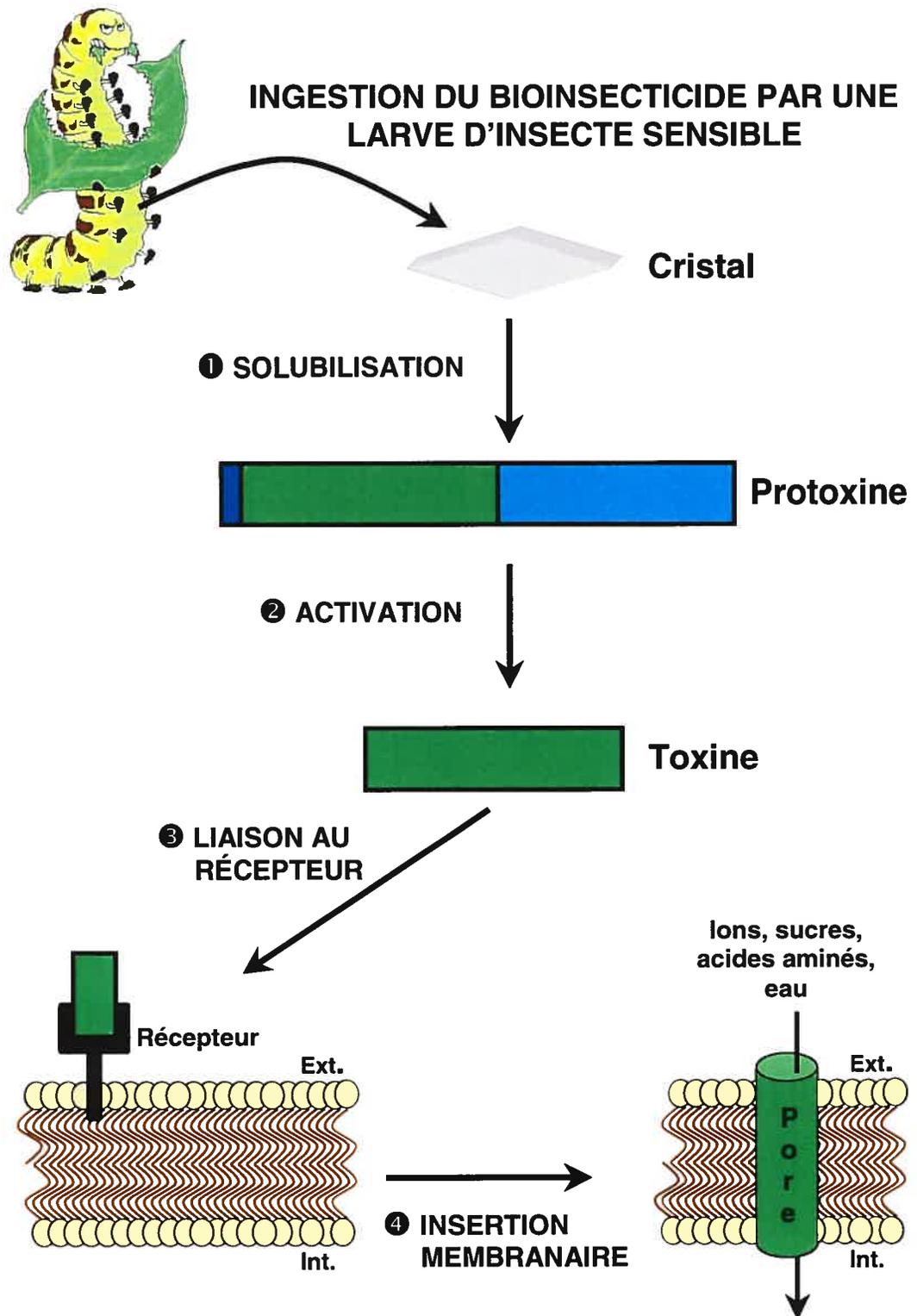


Fig. 8 : Mécanisme d'action des toxines du bacille de Thuringe.

3.3.1. Solubilisation et activation de la protoxine

Une fois le cristal solubilisé, la protoxine subit une protéolyse partielle. L'activation s'effectue grâce à l'action de protéases intestinales qui clivent le fragment structurel de la protoxine. Par exemple, les vingt-huit premiers acides aminés du côté N-terminal et les cinq cent soixante-sept derniers acides aminés du côté C-terminal de la Cry1Aa sont éliminés pour former une toxine active dont le poids moléculaire est de 65 kDa (Schnepf *et al.*, 1985; Grochulski *et al.*, 1995). L'élimination du fragment structurel s'effectue selon un processus séquentiel où sept petits blocs d'acides aminés d'environ 10 kDa sont successivement clivés (Choma *et al.*, 1990, 1991). Chez les lépidoptères, les principales protéases intestinales responsables de cette activation sont des enzymes de type trypsine et chymotrypsine. Elles diffèrent de leurs homologues provenant des mammifères principalement par leur capacité à opérer de façon optimale à des pH alcalins (Rukmini *et al.*, 2000).

3.3.2. Liaison de la toxine activée à son récepteur

Une fois activée, la toxine peut amorcer son activité. Pour ce faire, elle se lie de façon réversible à un récepteur spécifique situé sur la membrane en bordure en brosse, c'est-à-dire au niveau de la membrane apicale des cellules en colonne de l'intestin moyen (Hofmann et Lüthy, 1986; Hofmann *et al.*, 1988a, b; Van Rie *et al.*, 1989, 1990a) (Fig. 8, p. 37). Pour la sous-famille des Cry1A, deux principaux types de récepteurs membranaires ont été identifiés. Le premier type comprend différentes isoformes d'aminopeptidases N. Ces récepteurs ont été détectés dans une variété d'insectes tels que le sphinx du tabac (Knight *et al.*, 1994, 1995;

Sangadala *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996, 1999; Denolf *et al.*, 1997), le ver à soie (Yaoi *et al.*, 1997, 1999; Hua *et al.*, 1998), la noctuelle du tabac (Gill *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997a), la teigne des crucifères (Denolf *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1997b) et la spongieuse (Valaitis *et al.*, 1995; Garner *et al.*, 1999). Il s'agit d'enzymes digestives, ancrées à la membrane par une liaison covalente avec un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Garczynski et Adang, 2000), qui clivent des peptides en acides aminés, lesquels seront par la suite transportés dans les cellules en colonne via les co-transporteurs K^+ /acides aminés (Fig. 2, p. 18). Ces récepteurs se situeraient préférentiellement sur des radeaux lipidiques, caractérisés entre autres par la présence importante de protéines possédant une ancre GPI. Il a d'ailleurs été récemment démontré que l'intégrité de ces microdomaines lipidiques était essentielle à l'activité *in vitro* de la Cry1Ab pour la formation de pores (Zhuang *et al.*, 2002). Le second groupe de récepteurs membranaires correspond à des protéines de 210 kDa s'apparentant aux cadhérines (Vadlamudi *et al.*, 1993; Vadlamudi *et al.*, 1995; Nagamatsu *et al.*, 1999). Bien que ces dernières soient des médiateurs de l'adhérence intercellulaire sous dépendance calcique dans les tissus animaux (Alberts *et al.*, 1995), la fonction physiologique de ces récepteurs chez les insectes demeure encore inconnue. Contrairement aux récepteurs à ancre GPI, les cadhérines possèdent un segment transmembranaire qui pourrait servir à la transduction de signaux (Alberts *et al.*, 1995). Le ver à soie et le sphinx du tabac possèdent chacun un récepteur de type cadhérine auquel se fixent la Cry1Aa (Nagamatsu *et al.*, 1999) et la Cry1Ab (Vadlamudi *et al.*, 1993; Vadlamudi *et al.*, 1995), respectivement.

Différentes toxines peuvent avoir une action insecticide contre un même insecte, soit en se liant chacune à son propre récepteur, soit en rivalisant pour le

même récepteur (Chen *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 1995b; Rajamohan *et al.*, 1995; 1996a, b, c; Fiuza *et al.*, 1996; Lee et Dean, 1996; Lee *et al.*, 1996a). Chez le sphinx du tabac, par exemple, l'aminopeptidase N de 106 kDa n'est reconnue que par la Cry1C (Luo *et al.*, 1996), alors que la Cry1Aa, la Cry1Ab et la Cry1Ac se concurrencent entre elles pour la liaison avec une autre aminopeptidase N de 120 kDa (Masson *et al.*, 1995a; Schnepf *et al.*, 1998).

Malgré le fait que la présence des récepteurs membranaires semble garantir la spécificité des toxines *in vivo*, la formation de pores est également possible dans des bicouches lipidiques planes en absence de récepteurs, bien que les concentrations de toxines doivent être nettement plus élevées, soit de cent à mille fois les doses requises en présence d'un récepteur (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993). La formation de pores dans des bicouches lipidiques auxquels un récepteur purifié a été ajouté (Schwartz *et al.*, 1997b) ou des vésicules de la membrane en bordure en brosse ont été fusionnées (Lorence *et al.*, 1995; Martin et Wolfersberger, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001) s'effectue à des doses comparables à celles requises en conditions naturelles.

3.3.3. Insertion de la toxine activée dans la membrane intestinale

La liaison de la toxine au récepteur entraîne son insertion irréversible dans la membrane des cellules en colonne de l'intestin moyen, d'où l'appellation d'étape de liaison irréversible (Van Rie *et al.*, 1989; Wolfersberger, 1990; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995; Rajamohan *et al.*, 1995) (Fig. 8, p. 37). L'insertion de la toxine dans la membrane conduit à la formation d'un pore, une stratégie employée par plusieurs toxines bactériennes (English et Slatin, 1992; Lesieur *et al.*, 1997) et qui

cause une panoplie d'effets histopathologiques dans l'intestin de l'insecte (Knowles et Dow, 1993). Selon la théorie de la lyse osmotique (Knowles et Ellar, 1987), la formation de pores non spécifiques dans la membrane des cellules en colonne provoque, en raison de la valeur élevée du pH luminal, une sortie massive de protons et une entrée d'ions potassium. Cela a pour effet de dépolariser la cellule et d'alcaliniser le pH cytoplasmique (Crawford et Harvey, 1988). Ces perturbations cellulaires entraînent la fermeture des jonctions communicantes (Loewenstein, 1981; Knowles et Dow, 1993). La pression osmotique générée par les macromolécules présentes à l'intérieur de la cellule en colonne, telles que les acides nucléiques et les protéines, favorise l'entrée d'eau par osmose. La cellule se met alors à gonfler et finit par éclater par un processus de lyse colloïdale (Knowles et Ellar, 1987). Les dommages observés sur les cellules en gobelet sont attribuables à l'effet des toxines sur les cellules en colonne, puisque leurs récepteurs ne sont présents que chez ces dernières (Bravo *et al.*, 1992). Ainsi, la fermeture des jonctions communicantes ne permet plus au potassium de retourner dans les cellules en gobelet, ce qui diminue l'activité de l'échangeur $K^+/2H^+$ qui doit maintenant s'approvisionner uniquement à partir de l'hémolymphe (Wieczorek, 1992). La H^+ -ATPase continue de pomper les protons, ce qui acidifie la cavité et alcalinise le cytoplasme. Puis, la pompe H^+ -ATPase s'inactive, possiblement en raison de l'élévation du pH cytoplasmique qui inhiberait la synthèse mitochondriale d'ATP (Knowles, 1994). La pression osmotique à l'intérieur de la cavité augmente, créant un appel d'eau du cytoplasme vers la cavité. Il en résulte une augmentation du volume de la cavité et une compression du cytoplasme des cellules en gobelet (Endo et Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Gupta *et al.*, 1985; Bravo *et al.*, 1992). Cette perte de fonction de l'épithélium intestinal entraîne non seulement une septicémie, mais elle précipite aussi l'insecte dans un état de jeûne qui occasionnera sa mort. En effet, l'égalité du pH entre la lumière intestinale

et l'hémolymphe offre des conditions favorables à la germination des spores présentes dans l'intestin et permet la prolifération des bactéries intestinales qui se nourrissent alors des tissus et des fluides de l'insecte (Gill *et al.*, 1992; Knowles et Dow, 1993).

Plusieurs travaux visant à élucider les propriétés électriques des pores permettent de conclure qu'ils possèdent une sélectivité cationique (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993, 1997b, c; Lorence *et al.*, 1995). Les pores laissent cependant passer plusieurs types d'ions et de molécules. Il a d'abord été clairement démontré que les pores formés par les toxines du bacille de Thuringe sont perméables au potassium, puisque le co-transport K^+ /acide aminé est aboli lorsqu'il y a formation d'un pore. Cette perméabilité potassique du pore perturbe le gradient normal de potassium qui énergise les co-transporteurs, et ces derniers cessent alors de transporter les acides aminés (Sacchi *et al.*, 1986; Wolfersberger, 1989; Parenti *et al.*, 1993). Ces pores laissent aussi passer des ions monovalents tel que le sodium, des cations et des anions divalents et des acides aminés (Wolfersberger, 1989; Hendrickx *et al.*, 1990; Potvin *et al.*, 1998; Kirouac *et al.*, 2002). Des expériences réalisées sur des cellules Sf9 avec des sondes fluorescentes ont montré que la Cry1C formait des pores perméables aux protons et aux ions potassium et sodium (Vachon *et al.*, 1995). Une étude réalisée en bicouches lipidiques a montré que cette toxine peut former, en plus des pores sélectifs pour les cations, des pores sélectifs pour les anions, bien que ces derniers n'aient été observés qu'à des pH légèrement acides (Schwartz *et al.*, 1993). Finalement, des expériences de gonflement osmotique et d'électrophysiologie ont mis en évidence que les pores formés par les toxines sont perméables à de grosses molécules telles que le *N*-méthyle-D-glucamine, le gluconate, le glucose, le sucrose et le raffinose

(Knowles et Ellar, 1987; Carroll et Ellar, 1993, 1997; Villalon *et al.*, 1997; Rang *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2001. Des polyéthylène glycols de poids moléculaire allant jusqu'à 1500 peuvent aussi pénétrer efficacement le pore (Peyronnet *et al.*, 2002).

3.4. Un mécanisme de formation de pores encore hypothétique

L'étape cruciale qu'est l'insertion de la toxine dans la membrane n'est pas encore bien comprise. En particulier, le rôle que joue le récepteur membranaire dans le mécanisme de formation du pore demeure encore inconnu. Afin de répondre à cette question, plusieurs hypothèses ont été formulées. Le récepteur pourrait soit constituer un canal endogène de la membrane apicale qui s'ouvre lorsque la toxine s'y lie, soit s'associer avec la toxine pour former un pore, ou tout simplement servir d'ancrage à la toxine et initier le changement de conformation nécessaire à son insertion (Knowles et Dow, 1993; Pietrantonio et Gill, 1996; Schwartz et Laprade, 2000). La première hypothèse semble la moins vraisemblable puisque les toxines peuvent former des pores en absence de récepteur. En fait, des expériences réalisées avec différentes toxines ont montré que le domaine I seul était capable de former des pores dans des bicouches lipidiques (Walters *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*, 1994; Franken *et al.*, 1996). De plus, les récepteurs identifiés à ce jour, de type aminopeptidase N ou semblables à des cadhérines (section 3.3.2., p. 38) ne semblent pas posséder les caractéristiques attendues d'une protéine formant des pores. En ce qui a trait à l'implication ou non du récepteur dans la structure et l'activité des pores, les études effectuées jusqu'à maintenant permettent de conclure à sa participation fonctionnelle et possiblement structurale. Effectivement, il contribuerait à diminuer la barrière énergétique permettant les changements de conformation de la toxine nécessaire à l'insertion (Lesieur *et al.*, 1997) et pourrait

faire partie de l'architecture finale du pore puisque l'ajout d'un récepteur membranaire dans une bicouche lipidique plane peut modifier la rectification au voltage (Schwartz *et al.*, 1997b) ainsi que la conductance et la sélectivité ionique (Peyronnet *et al.*, 2001) des pores. Enfin, tel que suggéré par Masson *et al.* (2002a), le récepteur pourrait induire l'oligomérisation et permettre l'insertion d'un complexe protéique.

La nature des changements de conformation que subit la protéine, ainsi que l'identité des hélices du domaine I qui s'insèrent dans la membrane n'ont pas encore été déterminées avec précision. Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer la formation des pores. La découverte du mécanisme d'insertion membranaire de quelques protéines, par l'intermédiaire d'une épingle bihélicale (Engelman et Steitz, 1981; Parker *et al.*, 1989), amena à l'élaboration de deux modèles principaux (Fig. 9, p. 45).

Hodgman et Ellar (1990) fournirent les premières analyses menant à la formulation du modèle en canif. Sur la base de l'alignement des séquences en acides aminés de différentes toxines Cry et des régions hydrophobes prédites, ils conclurent que deux hélices alpha, correspondant aux hélices 5 et 6, formaient possiblement l'épingle hélicale responsable de la formation du pore. L'élucidation de la structure atomique de la Cry3A dans l'année qui suivit a permis de confirmer la présence de ces deux hélices prédites par le modèle et parmi les plus conservées chez beaucoup de toxines Cry (Li *et al.*, 1991). En considérant le fait que l'extrémité de l'épingle se situe du côté opposé de la toxine par rapport à son site de liaison, Knowles (1994) élaborait le modèle en canif (Fig. 9B, p. 45) en précisant que l'épingle hélicale alpha 5 et 6 doit se déplier, telle la lame d'un canif, pour aller s'insérer dans

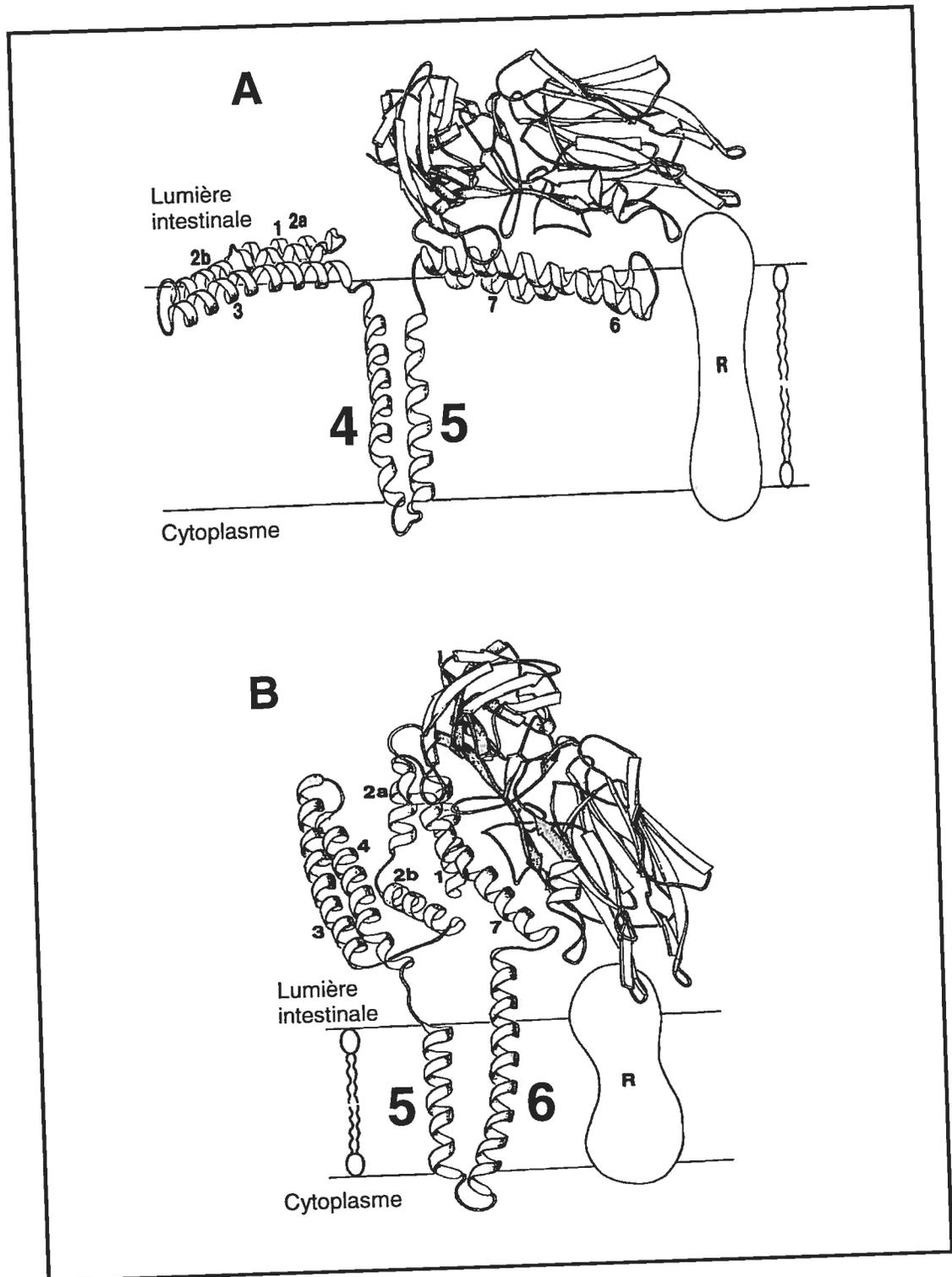


Figure 9: Modèles hypothétiques d'insertion des toxines Cry dans la membrane intestinale. Modèle en parapluie (A) et modèle en canif (B). Adapté de Knowles (1994).

la membrane, alors que le reste de la protéine ne subit pratiquement pas de changement de conformation.

L'obtention de la structure atomique de la Cry3A conduisit Li *et al.* (1991) à proposer un nouveau modèle d'insertion, complètement différent du précédent. Selon eux, deux épingles hélicales sont susceptibles de pénétrer la membrane intestinale. Ces épingles sont jointes près de la membrane, puisque la boucle qui les relie est située du côté de la toxine qui interagit directement avec le récepteur. Leur insertion dans la membrane entraîne l'étalement des autres hélices du domaine I sur la surface membranaire, telle l'armature d'un parapluie. Ce modèle, appelé modèle en parapluie, caractérise le mécanisme de formation de pores de la colicine A et de la toxine diphtérique, lesquelles possèdent un domaine responsable de la formation de pores dont la structure tertiaire est très similaire à celle du domaine I des toxines Cry (Lahey *et al.*, 1991; Parker et Pattus, 1993) (Fig. 5, p. 27). La première candidate pour l'insertion des toxines du bacille de Thuringe est l'épingle hélicale alpha 4 et 5 (Fig. 9A, p. 45). En effet, l'hélice 5 est non seulement la plus conservée des hélices du domaine I dans toutes les toxines Cry, mais des mutations dans cette hélice diminuent la toxicité sans modifier la liaison au récepteur (Ahmad et Ellar, 1990). L'autre candidate, proposée par Li *et al.* (1991), est l'épingle hélicale alpha 6 et 7. Cette paire d'hélices, particulièrement l'hélice 7, assure le contact entre le domaine de formation de pores et le domaine de liaison au récepteur. De plus, l'hélice 7 est elle aussi très bien conservée parmi les toxines Cry, et Gazit et Shai (1995), sur la base d'analyses spectroscopiques, ont suggéré que l'hélice 7 pourrait servir à détecter la liaison de la toxine avec le récepteur.

C'est le modèle en parapluie, où l'hélice 4 tapisserait la lumière du pore et l'hélice 5 servirait à ancrer l'épingle dans la membrane, qui compte de plus de partisans dans la communauté scientifique (Knowles, 1994; Gazit *et al.*, 1998; Uawithya *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999; Gerber et Shai, 2000; Aronson et Shai, 2001; Li *et al.*, 2001) (Fig. 9A, p. 45). Tout d'abord, la topologie du domaine I en solution, où les régions hydrophiles des hélices sont exposées à l'environnement aqueux, alors que les régions hydrophobes sont protégées à l'intérieur du cercle entourant l'hélice 5, laisse supposer qu'il doit nécessairement y avoir un changement de conformation de la toxine avant ou pendant son insertion dans la membrane hydrophobe (Cabiaux *et al.*, 1997). L'importance de la flexibilité intramoléculaire pour la formation de pores a d'ailleurs été démontrée par les travaux de Schwartz *et al.* (1997a) et Schwartz et Masson (2000). Grâce à l'introduction successive de résidus cystéine par mutagenèse dirigée, ces auteurs ont stabilisé la toxine par des ponts disulfures stratégiquement situés à l'intérieur de la protéine. Ils ont alors observé une incapacité de la toxine à former des pores dans des bicouches lipidiques planes dans le cas où le domaine I était relié au domaine II. La rupture du pont disulfure par l'ajout d'un agent réducteur comme le β -mercaptoéthanol a rétabli la flexibilité du domaine I, lui permettant de s'éloigner du reste de la protéine pour s'insérer dans la membrane. De façon similaire, le retrait de certains ponts salins reliant normalement le domaine I au domaine II de la Cry1Aa par l'introduction de mutations, augmente les taux de formation de pores dans des vésicules de bordure en brosse (Coux *et al.*, 2001). Bien que ces ponts salins contribuent naturellement à la stabilité et à la protection de la toxine contre la dégradation par les protéases intestinales, leur abolition offre davantage de flexibilité à la toxine, ce qui facilite son insertion dans la membrane (Coux *et al.*, 2001).

La mutation du résidu cystéine (Schwartz *et al.*, 1997a; Schwartz et Masson, 2000) fournit aussi une bonne indication quant au rôle que joue l'épingle hélicale alpha 4 et 5 dans la formation des pores. Lorsque les mouvements de cette épingle sont empêchés par la création de ponts disulfures avec d'autres hélices du domaine I, aucune formation de pores n'est détectée dans des bicouches lipidiques. La rupture de ces ponts par le β -mercaptoéthanol rétablit l'activité de la toxine. D'autres expériences réalisées avec des peptides synthétiques correspondant aux différentes hélices du domaine I ont démontré que les hélices 4 et 5 s'inséraient dans la membrane, alors que l'hélice 7 se positionnait parallèlement à la surface de la membrane, tel que suggéré par le modèle en parapluie (Gazit et Shai, 1993, 1995; Cumming et Ellar, 1994; Gazit *et al.*, 1994, 1998; Gerber et Shai, 2000). Finalement, de nombreuses analyses de mutations ponctuelles dans les hélices 4 et 5 de la Cry1Aa (Masson *et al.*, 1999; Vachon *et al.*, 2002), de la Cry1Ab (Nuñez-Valdez, 2001), de la Cry1Ac (Wu et Aronson, 1992; Aronson *et al.*, 1999; Kumar et Aronson, 1999) et de la Cry4Ba (Uawithya *et al.*, 1998; Sramala *et al.*, 2000) ont montré une diminution ou une perte complète de toxicité.

Malgré ces données, un nouveau modèle fut récemment proposé par Loseva *et al.* (2001), où le pore serait formé par la moitié du domaine I, le domaine II et la majeure partie du domaine III. Effectivement, des expériences ont montré qu'un fragment protéique de 49 kDa de la Cry3A, comprenant les hélices 4 à 7 du domaine I, le domaine II et le domaine III, à l'exception des cinquante-six derniers acides aminés du côté C-terminal, avait une activité comparable à celle de la Cry3A sur des liposomes. Ainsi, la liaison de la toxine à son récepteur induirait un changement de conformation où les hélices 1 à 3 du domaine I s'écarteraient du reste de la protéine, exposant ainsi les régions hydrophobes des autres hélices. Ces dernières

pourraient alors interagir avec la membrane lipidique et former la surface du pore qui serait exposée à la membrane externe, tandis que les domaines II et III seraient complètement insérés dans la membrane, avec leurs résidus hydrophiles exposés dans la lumière du pore. Il ne s'agit pas d'une idée tout à fait nouvelle puisque Dean *et al.* (1996), sur la base des données physiques et biochimiques disponibles, avaient déjà suggéré qu'en plus du domaine I, le domaine III, particulièrement le brin β 17 et possiblement le domaine II pourraient s'insérer dans la membrane des cellules épithéliales de l'intestin moyen.

3.5. Les origines physiologiques de la résistance

Au niveau moléculaire, les mécanismes possibles d'acquisition de tolérance à une ou plusieurs toxines du bacille de Thuringe sont multiples (Tabashnik, 1994; Ferré *et al.*, 1995; Rajamohan *et al.* 1998; Frutos *et al.*, 1999). Tout d'abord, il pourrait s'agir d'une altération de l'activation des protoxines par les protéases intestinales. Oppert *et al.* (1994, 1997) ont effectivement démontré que la résistance à plusieurs toxines du bacille de Thuringe de deux souches de la teigne du blé résultait de la disparition d'une protéase de type trypsine, indispensable à l'activation de la toxine dans l'intestin des insectes sensibles. De plus, une diminution de l'activité d'une protéase de type chymotrypsine a aussi été observée chez des individus résistants de cette espèce (Oppert *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997). Le second mécanisme de résistance est une réduction de l'affinité des sites de liaison des récepteurs membranaires ou une réduction du nombre de récepteurs de la membrane intestinale (Tabashnik, 1994; Ferré *et al.*, 1995; Darboux *et al.*, 2002). Par exemple, la résistance pour les toxines Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac d'une population de la teigne des crucifères, prélevée dans des champs en Floride, résulte

d'une perte de récepteurs (Escrèche *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1996). Un groupe de chercheurs a aussi montré que, chez la noctuelle du tabac, la résistance à la Cry1Ac, acquise en laboratoire, était associée à une mutation dans le gène codant pour une protéine de type cadhérine (Gahan *et al.*, 2001). Dans certains cas, les insectes peuvent même développer une résistance croisée à l'ensemble des toxines d'une même famille si celles-ci se lient au même récepteur (Ferré *et al.*, 1995). Finalement, quelques cas de résistance à différentes toxines Cry ont été documentés, sans toutefois qu'aucune altération dans leur capacité à lier les récepteurs ou à être activées n'ait pu être démontrée (Gould *et al.*, 1992; Moar *et al.*, 1995; Mohamed *et al.*, 1996). Dans ces situations, le mécanisme de résistance demeure inconnu.

4. DES MUTATIONS DANS LES BOUCLES INTERHÉLICALES DU DOMAINE I MODIFIENT LA VITESSE DE FORMATION DES PORES PAR LA TOXINE INSECTICIDE Cry1Aa DU BACILLE DE THURINGE DANS DES VÉSICULES DE LA MEMBRANE EN BORDURE EN BROSSE DU SPHINX DU TABAC

4.1. Introduction

Bien qu'il soit connu depuis fort longtemps que les toxines insecticides produites par le bacille de Thuringe agissent en perméabilisant la membrane intestinale des insectes sensibles, la description détaillée du mécanisme aboutissant à la formation de pores transmembranaires soulève encore beaucoup de questions. Depuis une dizaine d'années, différents modèles hypothétiques ont été élaborés pour décrire l'architecture finale du pore. De nombreux travaux, dont plusieurs analyses de mutants, ont fourni de précieuses indications quant au rôle des différentes hélices alpha du domaine I dans cette étape cruciale qu'est l'insertion de la toxine dans la membrane. Toutefois, le rôle des boucles interhélicales reliant les hélices alpha du domaine I dans les changements de conformation nécessaires à l'insertion membranaire a été très peu étudié. Cette étude au niveau de la formation des pores constitue donc le but principal des travaux présentés dans ce chapitre. Pour ce faire, des acides aminés situés dans chacune des boucles du domaine de la Cry1Aa activée ont été remplacés par une cystéine par mutagenèse dirigée. Tous les mutants ainsi créés ne comportaient qu'une seule mutation. Leur capacité à perméabiliser des vésicules de la membrane en bordure en brosse fabriquées à partir de l'intestin moyen de larves du sphinx du tabac a d'abord été analysée en détail à l'aide d'une technique de diffusion de la lumière qui mesure le gonflement osmotique des vésicules dû à l'entrée des solutés au travers des pores (Carroll et

Ellar, 1993). La plupart des expériences ont été réalisées à pH 7,5 et pH 10,5. À ce dernier pH, le groupement thiol de la cystéine s'ionise, ce qui permet d'étudier l'effet d'une charge négative sur l'activité des mutants. Les analyses effectuées en dose-réponse et en cinétique ont révélé que la substitution d'un acide aminé par un résidu cystéine avait un impact significatif sur les propriétés de plusieurs mutants, ce qui a permis de conclure que les boucles interhélicales jouent un rôle important dans le processus de formation des pores.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Mutagenèse

Au moins un acide aminé situé à l'intérieur de chacune des boucles interhélicales du domaine I de la Cry1Aa a été remplacé individuellement par un résidu cystéine. Onze différents mutants ont ainsi été produits, chacun comportant une seule mutation dans une des sept boucles interhélicales (Fig. 10, p. 53). Puisque l'hélice 4 semble jouer un rôle crucial dans le mécanisme de formation des pores (Masson *et al.*, 1999; Vachon *et al.*, 2002), trois mutations ont été introduites dans les boucles $\alpha 3\alpha 4$ et $\alpha 4\alpha 5$. Tous les mutants ont été créés par mutagenèse *in vitro* en utilisant la méthode à deux oligonucléotides décrite par Deng et Nickoloff (1992) (Clontech Transformer kit, Clontech Laboratories) et le plasmide d'expression à double brin pMP39 (Masson *et al.*, 1989). Les gènes mutés ont été analysés par séquençage de l'ADN (Sanger *et al.*, 1977) en utilisant un analyseur de séquence nucléotidique Applied Biosystems 370A.

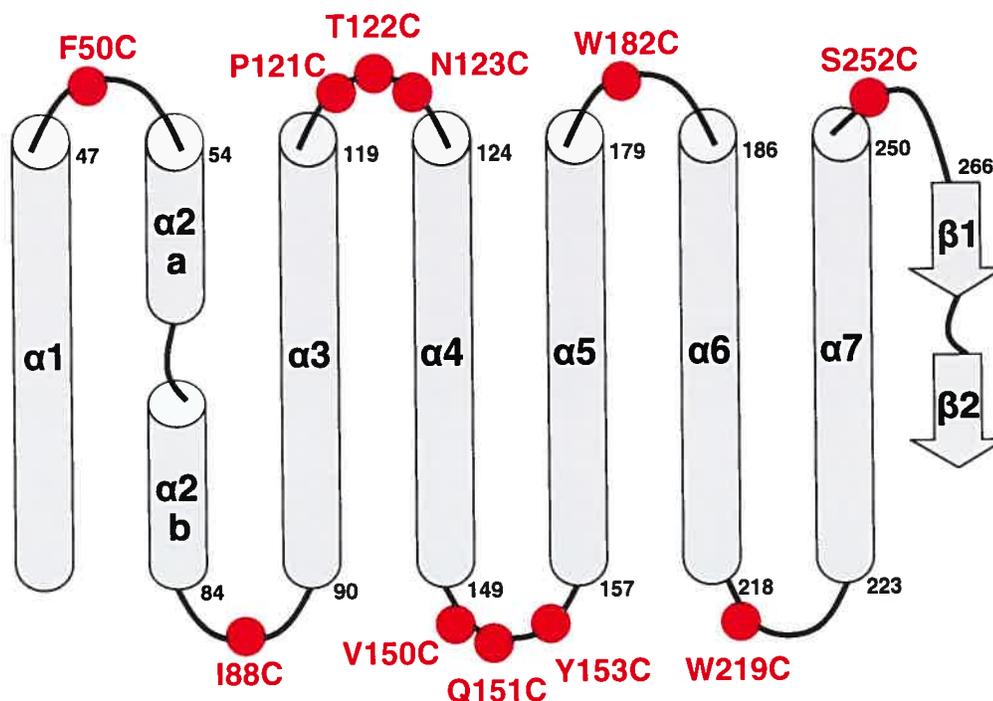


Figure 10 : Représentation schématique du domaine I illustrant la position approximative des résidus mutés dans la toxine insecticide Cry1Aa.

4.2.2. Expression et purification

Toutes les protoxines ont été produites sous forme de corps d'inclusion dans la bactérie *Escherichia coli* et ont été solubilisées et activées avec de la trypsine, tel que décrit par Masson *et al.* (1989). Les toxines activées ont ensuite été purifiées par chromatographie liquide sur une colonne échangeuse d'ions (Mono Q, Pharmacia Biotech) et éluées avec un tampon composé de 40 mM de carbonate, pH 10,5, et un gradient de chlorure de sodium allant de 50 à 500 mM (Masson *et al.*, 1989). Les fractions contenant les toxines éluées ont été dialysées contre de l'eau distillée jusqu'à ce qu'elles précipitent. Les toxines purifiées ont ensuite été

analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de 10% (p/v) de dodécyle sulfate de sodium (Laemmli, 1970), et entreposées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

4.2.3. Préparation des vésicules de la membrane en bordure en brosse

Les intestins moyens de larves de cinquième stade du sphinx du tabac ont été isolés, dégagés de leurs tubules de Malpighi et nettoyés de leur contenu intestinal, puis entreposés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les vésicules de la membrane en bordure en brosse, préparées à partir des intestins moyens décongelés, ont été obtenues par précipitation au Mg^{2+} et une série de centrifugations différentielles (Wolfersberger *et al.*, 1987), tel que décrit par Coux *et al.* (2001), Tran *et al.* (2000) et Vachon *et al.* (2002). Pour les études de gonflement osmotique (section 4.2.4., p. 54), les vésicules ont d'abord été équilibrées une nuit entière dans une solution composée soit de 10 mM d'Hepes pour les expériences réalisées à pH 7,5, soit de 10 mM de Caps pour celles réalisées à pH 10,5.

4.2.4. Gonflement osmotique

La perméabilité des vésicules de la membrane en bordure en brosse a été évaluée à l'aide d'une technique de gonflement osmotique décrite par Carroll et Ellar (1993). L'intensité de la lumière diffusée a été mesurée à 23°C et à une longueur d'onde de 450 nm avec un tube photomultiplicateur positionné à un angle de 90° par rapport au faisceau lumineux incident dans un spectrofluoromètre PTI (Photon Technology International). Les expériences ont été réalisées à pH 7,5 et 10,5, afin d'étudier l'effet d'une charge négative additionnelle, qui s'ajoute au groupement thiol

du résidu cystéine à pH élevé. La capacité des toxines à accroître la perméabilité des vésicules à différents solutés, soit le chlorure de potassium, l'hydrochlorure de *N*-méthyle-D-glucamine (NMDG-Cl), le gluconate de potassium (KGlu), le sucrose et le raffinose, a été évaluée en mesurant le gonflement osmotique des vésicules après les avoir préincubées avec la concentration choisie de toxine pendant 60 minutes, tel que décrit par Coux *et al.* (2001), Tran *et al.* (2000) et Vachon *et al.* (2002). Pour étudier les cinétiques de perméabilisation membranaire, les vésicules ont été directement exposées à la toxine, sans préincubation, tel que décrit par Coux *et al.* (2001), Tran *et al.* (2000) et Vachon *et al.* (2002).

4.2.5. Analyse des données

Le pourcentage de recouvrement de volume a été calculé avec la formule suivante: $100 (1-I_t)$, où I_t correspond à l'intensité relative de la lumière diffusée au temps t . Pour les expériences cinétiques, le pourcentage de recouvrement de volume a été calculé pour chaque point expérimental et les valeurs obtenues pour le témoin, réalisé en absence de toxine, ont été soustraites des valeurs expérimentales mesurées en présence de toxine. La portion ascendante de chacun des tracés ainsi générés a été lissée avec une sigmoïde de Boltzmann en utilisant le logiciel Origin, version 6,1 (OriginLab Corp.). Le temps de latence qui précède le gonflement des vésicules a été estimé en mesurant le temps requis pour qu'elles recouvrent 5% de leur volume. Les vitesses maximales de gonflement osmotique, correspondant à la pente au point d'inflexion des courbes, sont données par la valeur maximale de la dérivée première des courbes de Boltzmann. Les données sont exprimées en moyennes \pm erreurs types (SEM) pour au moins trois expériences, chacune réalisée avec une préparation différente de vésicules. Les analyses statistiques ont été

effectuées avec un test de Student à l'aide du logiciel InStat, version 1,13 (Graphpad Software).

4.3. Résultats

4.3.1. Capacité des mutants cystéine à former des pores

Chaque mutant a d'abord été caractérisé en évaluant sa capacité à perméabiliser des vésicules de la membrane en bordure en brosse au KCl, à l'aide d'une technique de gonflement osmotique (Carroll et Ellar, 1993). Dans cette méthode, les vésicules sont mélangées directement dans une cuvette contenant une solution hypertonique de KCl. Ceci entraîne un rétrécissement rapide des vésicules, comme le montre l'augmentation marquée de l'intensité de la lumière diffusée pendant la première demi-seconde de l'expérience (Fig. 11, p. 57). Les vésicules ont d'abord été préincubées pendant 60 minutes avec le mutant T122C (boucle $\alpha 3\alpha 4$), une toxine dite active puisqu'elle est capable de perméabiliser les vésicules (Fig. 11A, p. 57). La diffusion subséquente du soluté à travers la membrane a permis aux vésicules d'accroître leur volume de façon dose-dépendante, ce qui a donné lieu à une diminution graduelle de l'intensité de la lumière diffusée. Toutefois, en présence du mutant inactif V150C (boucle $\alpha 4\alpha 5$) (Fig. 11B, p. 57), la vitesse de recouvrement de volume des vésicules s'est avérée similaire à celle obtenue en absence de toxine.

À l'exception de V150C et W182C (boucle $\alpha 5\alpha 6$), tous les mutants ont formé des pores perméables au KCl approximativement aussi efficacement que la Cry1Aa à pH 7,5 (Fig. 12, p. 58). Toutefois, l'augmentation du pH à 10,5, une procédure qui

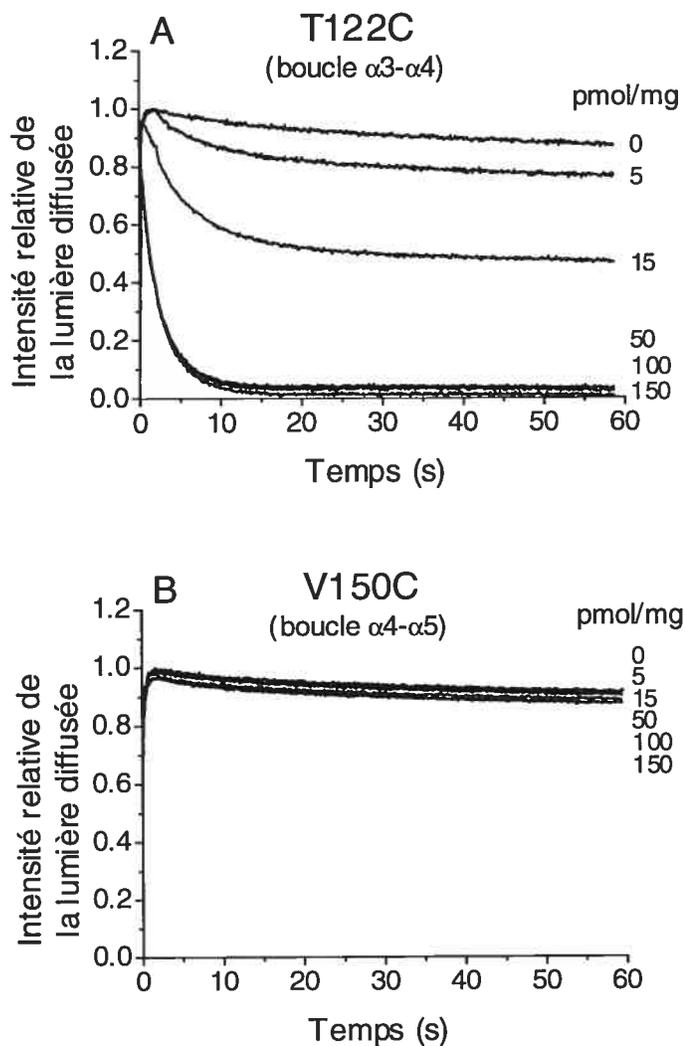


Figure 11 : Effet de l'introduction de résidus cystéine dans les boucles interhélicales de la Cry1Aa sur le gonflement osmotique des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.

Les vésicules, formées à partir de la membrane de l'intestin moyen d'une larve de cinquième stade du sphinx du tabac et équilibrées une nuit entière dans une solution composée de 10 mM d'Hepes, pH 7,5, ont été préincubées 60 minutes avec les concentrations indiquées (en pmol de toxine/mg de protéine membranaire) des mutants T122C (A) et V150C (B). Les vésicules ont rapidement été mélangées avec un volume équivalent d'une solution contenant 150 mM de KCl, 10 mM d'Hepes, pH 7,5, directement dans la cuvette. L'intensité de la lumière diffusée à 90° a été mesurée dans un spectrofluoromètre PTI. Chaque tracé correspond à la moyenne de cinq expériences.

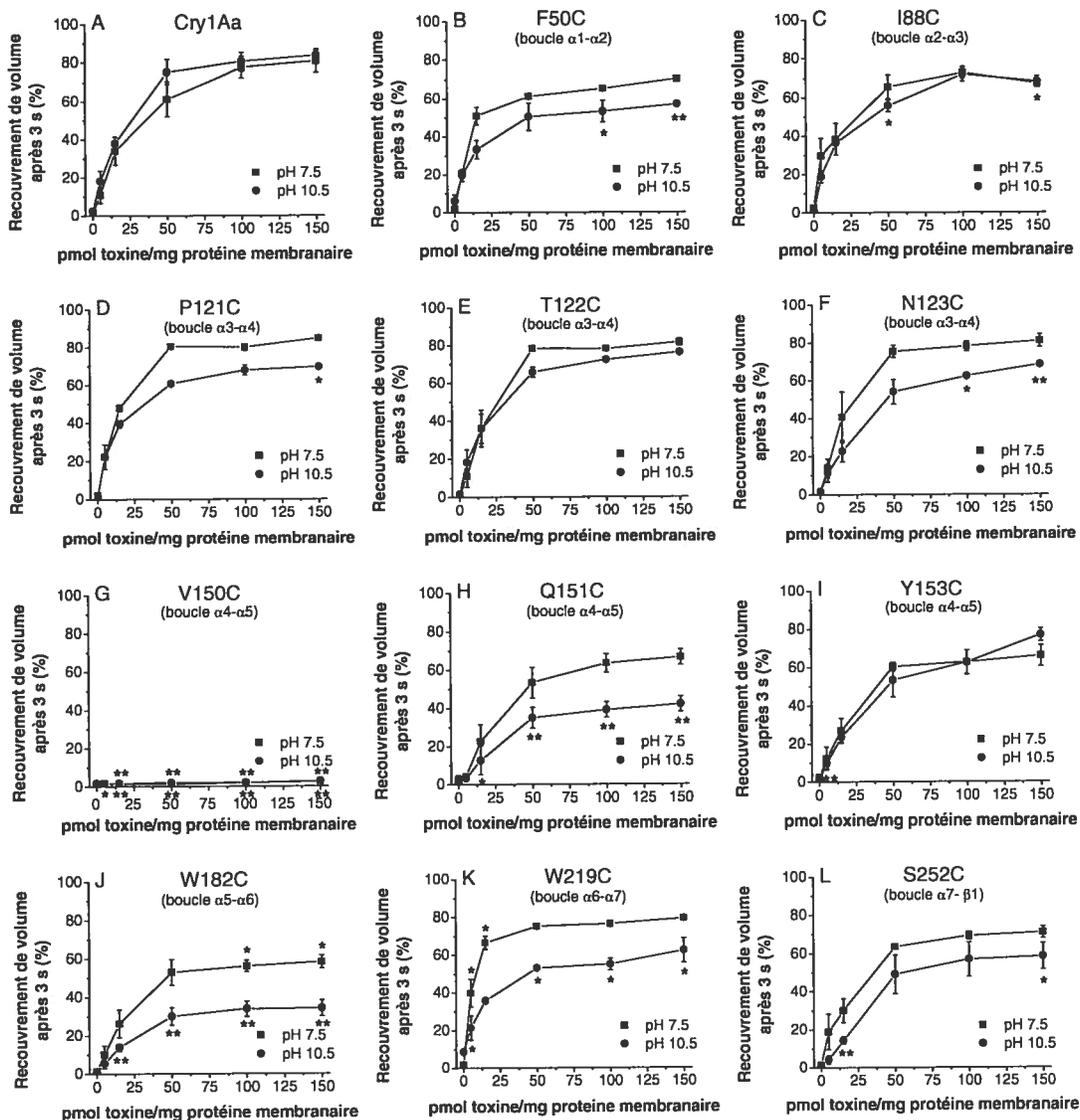


Figure 12 : Capacité des mutants cystéine à former des pores.

Les vésicules ont été préincubées 60 minutes avec les concentrations indiquées des toxines Cry1Aa (A), F50C (B), I88C (C), P121C (D), T122C (E), N123C (F), V150C (G), Q151C (H), Y153C (I), W182C (J), W219C (K) et S252C (L). Leur perméabilité au KCl a été analysée en les mélangeant avec une solution contenant 150 mM de KCl et 10 mM d'Hepes, pH 7,5 (■) ou de Caps, pH 10,5 (●). Le pourcentage de recouvrement de volume après 3 secondes a été calculé à partir de tracés similaires à ceux présentés dans la Fig. 11 (p. 57). Les astérisques indiquent qu'il existe une différence statistiquement significative entre ces valeurs et celles mesurées pour la toxine parentale, Cry1Aa (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

provoque l'ionisation du groupement thiol de la cystéine, a entraîné une réduction significative ($p < 0,05$) de la perméabilité au KCl pour tous les mutants, sauf I88C (boucle $\alpha 2\alpha 3$), V150C, Y153C (boucle $\alpha 4\alpha 5$) et S252C (boucle $\alpha 7\beta 1$). Alors que le pH a eu peu d'effet sur l'activité de la Cry1Aa (Fig. 12A, p. 58), le pourcentage de recouvrement de volume pour tous les mutants, excepté T122C (Fig. 12E, p. 58), s'est montré significativement plus faible que celui de la Cry1Aa à pH 10,5 à au moins une des concentrations de toxine testées (Fig. 12, p. 58).

4.3.2. Propriétés des pores formés par les mutants cystéine

Afin de vérifier si les caractéristiques fonctionnelles des pores avaient été altérées par les mutations, nous avons ensuite examiné la capacité de chaque mutant à perméabiliser la membrane à d'autres solutés. Toutefois, le mutant I88C n'ayant pu être produit en quantité suffisante, n'a pas été inclus dans cette série de tests. Des sels formés d'un large cation (*N*-méthyl-D-glucamine) (NMDG) (Fig. 13A, p. 60) ou d'un anion (gluconate) de taille relativement grande (Fig. 13B, p. 60), ainsi que de grosses molécules neutres, soit un disaccharide (sucrose) (Fig. 13C, p. 60) et un trisaccharide (raffinose) (Fig. 13D, p. 60) ont donc été testés. Puisque le groupement amine du NMDG-Cl n'est pas ionisé à des pH élevés, les expériences réalisées avec ce soluté ont été effectuées uniquement à pH 7,5. Les vitesses de gonflement osmotique mesurées se sont avérées supérieures avec le NMDG-Cl (Fig. 13A, p. 60) qu'avec le KGlu (Fig. 13B, p. 60), ce qui est en accord avec le fait que les toxines du bacille de Thuringe sont généralement sélectives pour les cations (Kirouac *et al.*, 2002; Lorence *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1993, 1997b, c; Slatin *et al.*, 1990). À l'exception de Y153C et W182C, tous les mutants ont perméabilisé la

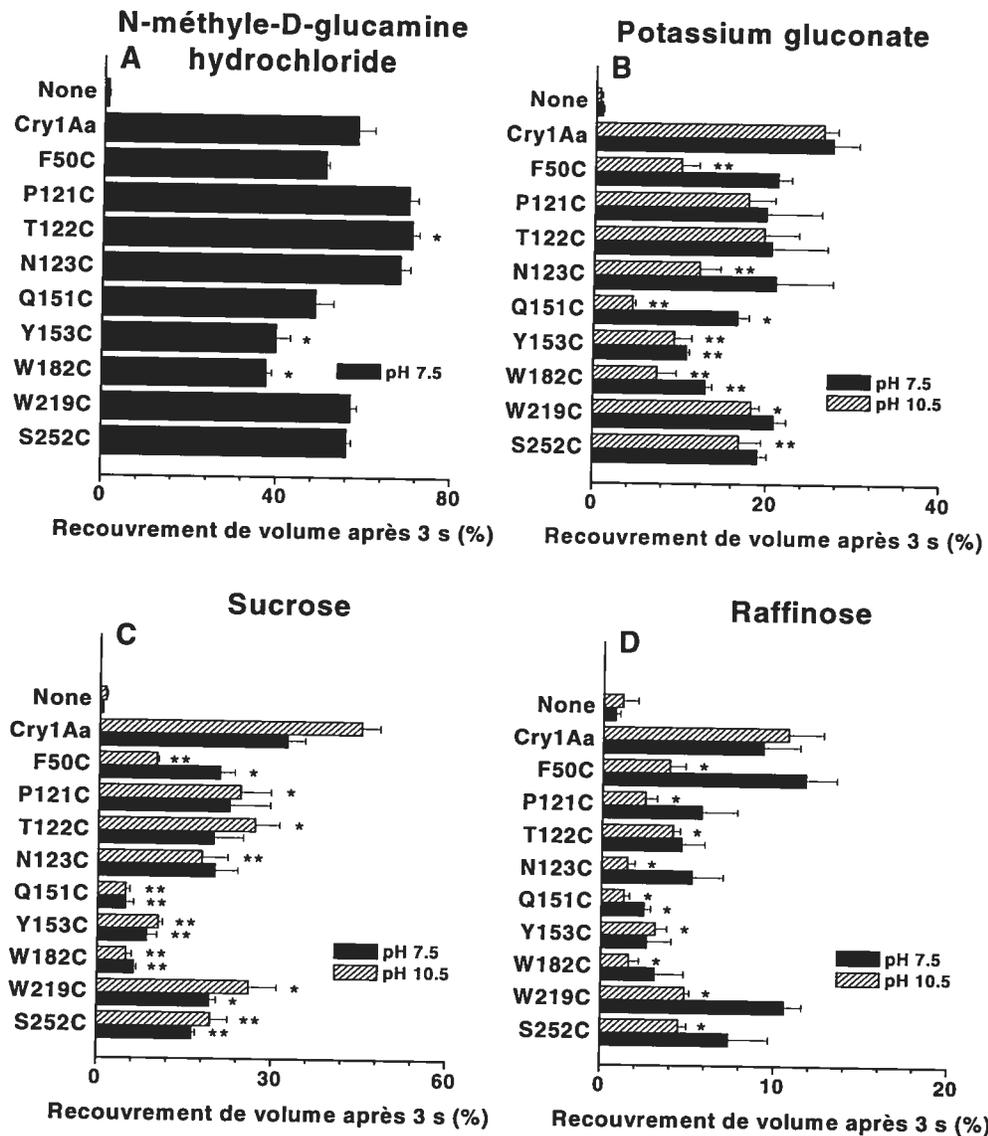


Figure 13 : Effet des mutations sur la perméabilité des vésicules au NMDG-Cl, Kglu, sucrose et raffinose.

Les vésicules ont été préincubées 60 minutes avec 150 pmol de toxine/mg de protéine membranaire. Leur perméabilité a été analysée en les mélangeant rapidement avec l'une ou l'autre des solutions suivantes: 150 mM de NMDG-Cl (A) ou de Kglu (B), 300 mM de sucrose (C) ou de raffinose (D), et 10 mM d'Hepes, pH 7,5 (colonnes noires) ou de Caps, pH 10,5 (colonnes hachurées) tel qu'énoncé dans la légende de la Fig. 11 (p. 57). Les astérisques indiquent qu'il existe une différence statistiquement significative entre ces valeurs et celles mesurées pour la toxine parentale, Cry1Aa (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

membrane au NMDG-Cl approximativement aussi efficacement que la Cry1Aa (Fig. 13A, p. 60). En présence de KGlu, Q151C (boucle $\alpha 4\alpha 5$), Y153C et W182C se sont montrés significativement moins actifs que la Cry1Aa à pH 7,5 (Fig. 13B, p. 60). Toutefois, à pH 10,5, la perméabilité membranaire au KGlu a été significativement plus faible que celle observée pour la Cry1Aa pour tous les mutants, excepté P121C (boucle $\alpha 3\alpha 4$) et T122C (Fig. 13B, p. 60). Tel qu'attendu, le sucrose (Fig. 13C, p. 60), dont le volume hydrodynamique est plus petit, diffuse généralement plus rapidement à l'intérieur des vésicules que le raffinose (Fig. 13D, p. 60). À pH 7,5, seulement trois mutants, P121C, T122C et N123C (boucle $\alpha 3\alpha 4$), ont permis la diffusion du sucrose à une vitesse comparable à celle mesurée en présence de la Cry1Aa (Fig. 13C, p. 60). Par contre, les pores formés par tous les mutants à pH 10,5 ont été significativement moins perméables au sucrose que ceux formés par la Cry1Aa. Cette différence est principalement due au fait que les pores formés par la Cry1Aa sont plus perméables au sucrose à pH 10,5 qu'à pH 7,5, tel que démontré par Coux *et al.* (2001) et Vachon *et al.* (2002). Seuls les pores formés par la Cry1Aa se sont montrés significativement plus perméables au sucrose à pH 10,5 qu'à pH 7,5 (Fig. 13C, p. 60). Tous les mutants, à l'exception de Q151C, ont augmenté la perméabilité membranaire au raffinose presque aussi efficacement que la Cry1Aa à pH 7,5, mais lorsque le pH fut élevé à 10,5, le flux du sucre mesuré en présence de tous les mutants s'est avéré significativement inférieur à celui observé avec la toxine parentale (Fig. 13D, p. 60).

4.3.3. Cinétique de formation des pores par les mutants

La vitesse de formation des pores a été mesurée en mélangeant les vésicules avec 150 pmol de chaque mutant/mg protéine membranaire et 150 mM de

KCl, sans préincubation. Tel qu'illustré par la Fig. 14 (p. 63) pour I88C, un des mutants les plus actifs, le pourcentage de recouvrement de volume a augmenté de manière sigmoïdale, après une période de latence d'environ 20 secondes. Le temps de latence, ainsi que la vitesse de gonflement des vésicules, ont considérablement varié selon la position des mutations et la valeur du pH (Tableau II, p. 64). Les temps de latence et les vitesses de gonflement mesurés à pH 7,5 en présence des mutants I88C, P121C, T122C, N123C et W219C (boucle $\alpha 6\alpha 7$) se sont avérés comparables à ceux observés pour la Cry1Aa, tandis que pour F50C (boucle $\alpha 1\alpha 2$), Q151C, W182C et S252C, l'un ou l'autre de ces deux paramètres a été significativement réduit. À pH 10,5 toutefois, tous les mutants ont montré un temps de latence plus long ou une vitesse de gonflement plus faible que la Cry1Aa, sauf T122C et I88C qui s'est même montré plus actif (Tableau II, p. 64).

4.4. Discussion et conclusion

Les résultats de la présente étude démontrent que les propriétés de la Cry1Aa peuvent être grandement altérées par des mutations ponctuelles portant sur des résidus situés dans la plupart des boucles interhélicales du domaine I. À l'exception de V150C, tous les mutants sont capables de former des pores dans la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac. À pH 7,5, tous les mutants actifs, excepté W182C, perméabilisent la membrane au KCl à peu près aussi bien que le Cry1Aa. Par contre, à pH 10,5, tous sauf T122C sont significativement moins actifs que la toxine parentale. En fait, à pH 10,5, tous les mutants perméabilisent moins bien la membrane que la Cry1Aa à chacun des solutés testés à l'exception de P121C et T122C, pour le KGlu. Ces observations indiquent une réduction généralisée, dépendante du pH, de la capacité des mutants à former des pores.

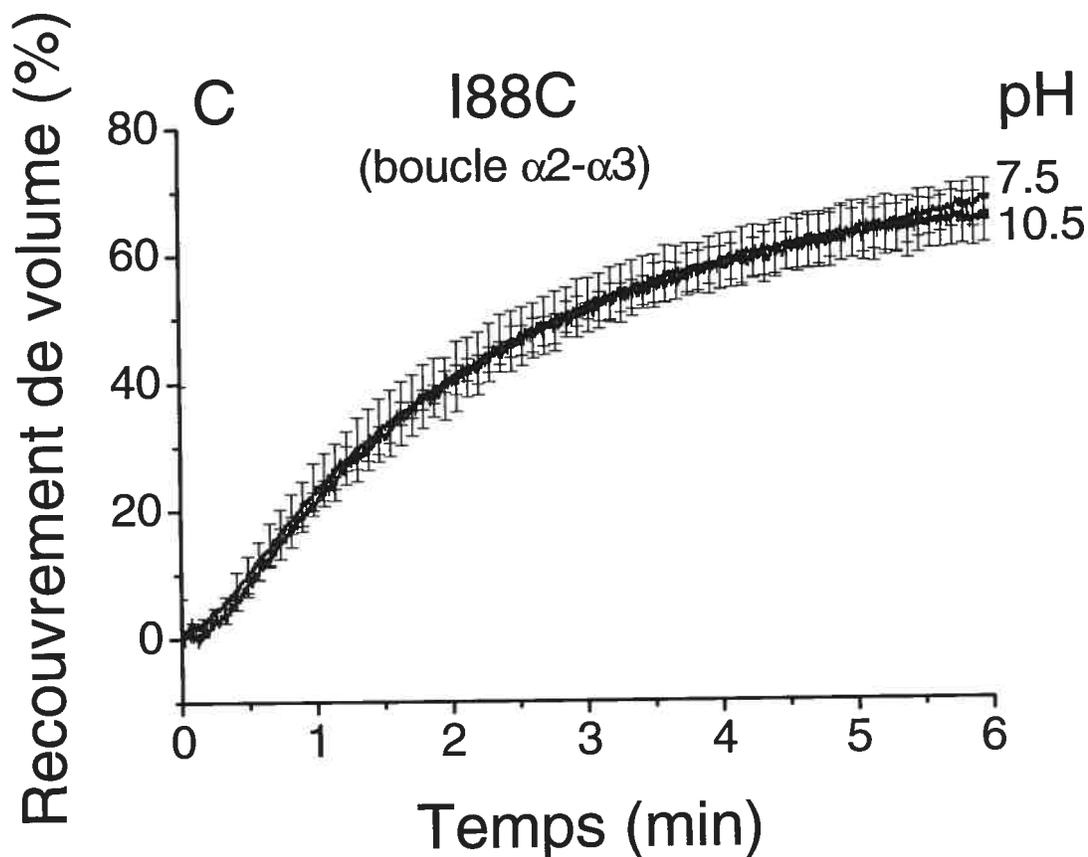


Figure 14 : Cinétique de formation des pores par les mutants cystéine.

Les vésicules ont été mélangées avec un volume équivalent d'une solution contenant 150 mM de KCl, 10 mM d'Hepes, pH 7,5, ou de Caps, pH 10,5, et 150 pmol d'I88C/mg de protéine membranaire. Le pourcentage de recouvrement de volume a été calculé pour chaque point expérimental et les valeurs mesurées pour le témoin ont été soustraites de celles obtenues en présence de toxine. Pour plus de clarté, les barres d'erreur sont représentées seulement à tous les 50 points expérimentaux.

Tableau II : Cinétique de formation des pores par les mutants cystéine dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.

Toxine	Site de Mutation (boucle)	Temps de latence ^a (min)		Vitesse de gonflement ^b (Recouvrement de volume, %/min)	
		pH 7,5	pH 10,5	pH 7,5	pH 10,5
		Cry1Aa	Aucun	0,48 ± 0,06	0,65 ± 0,02
F50C	α1α2	1,03 ± 0,07 ^{**c}	1,3 ± 0,1 ^{**}	8,7 ± 0,8*	6,2 ± 0,3*
I88C	α2α3	0,33 ± 0,02	0,35 ± 0,03 ^{**}	37 ± 2	32 ± 2 ^{**}
P121C	α3α4	0,40 ± 0,04	0,65 ± 0,08	26,4 ± 0,5	17,6 ± 0,5*
T122C	α3α4	0,41 ± 0,02	0,55 ± 0,07	25,2 ± 0,5	20,6 ± 0,6
N123C	α3α4	0,56 ± 0,03	1,3 ± 0,1 ^{**}	19 ± 1	4,8 ± 0,4 ^{**}
Q151C	α4α5	0,9 ± 0,4	3,4 ± 0,4 ^{**}	5,1 ± 0,5*	2,2 ± 0,3 ^{**}
Y153C	α4α5	1,18 ± 0,09 ^{**}	1,8 ± 0,7	6,8 ± 0,5*	5,6 ± 0,2 ^{**}
W182C	α5α6	1,8 ± 0,3*	4 ± 2	5 ± 1*	2,4 ± 0,8 ^{**}
W219C	α6α7	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2 ^{**}	15 ± 3	7 ± 2 ^{**}
S252C	α7β1	1,1 ± 0,2*	2,2 ± 0,5*	8 ± 1*	4,7 ± 0,6 ^{**}

^a Temps requis pour recouvrir 5% du volume vésiculaire.

^b Pente maximale mesurée au point d'inflexion de la sigmoïde de Boltzmann ajustée aux points expérimentaux.

^c Significativement différent des valeurs correspondantes obtenues pour la Cry1Aa parentale (*, p < 0.05; **, p < 0.01).

Dans le cas de W182C, cette diminution est observée aux deux pH étudiés, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative pour le raffinose à pH 7,5. Ces

changements dans l'activité de la toxine s'accompagnent de réductions dans la vitesse de formation des pores pour la plupart des mutants. Même à pH 7,5, F50C, Q151C, Y153C, W182C et S252C agissent significativement plus lentement que Cry1Aa. À pH 10,5, tous les mutants ont une vitesse de formation des pores plus faible que la Cry1Aa, à l'exception de I88C, qui augmente la perméabilité membranaire significativement plus rapidement que la Cry1Aa, et T122C.

Certaines mutations semblent altérer les propriétés des pores que forment les mutants. Par exemple, à pH 7,5, le mutant Y153C perméabilise la membrane significativement moins efficacement que la Cry1Aa pour le NMDG-Cl, le KGlu et le sucrose, et le mutant Q151C est moins efficace que la Cry1Aa pour faciliter la diffusion des deux derniers solutés et du raffinose. Ces résultats suggèrent que les pores formés par ces deux mutants ont un diamètre réduit par rapport à celui des pores formés par la Cry1Aa. De plus, la réduction de la perméabilité membranaire au KGlu et au NMDG-Cl mesurée en présence de ces deux mutants, par rapport aux valeurs obtenues pour la Cry1Aa, est significativement plus marquée pour le premier soluté. Cette différence suggère que les pores formés par ces mutants ont une sélectivité cationique plus grande que ceux formés par la Cry1Aa, résultant d'une plus grande réduction dans leur perméabilité pour les anions que pour les cations.

Les résultats de la présente étude diffèrent de ceux obtenus avec la plupart des mutations portant sur des résidus situés dans les boucles du domaine I et qui ont relativement peu d'effet sur la toxicité. Ces mutations comprennent D120C, D120K et D120Q dans la boucle $\alpha 3\alpha 4$ de la Cry1Aa (Vachon *et al.*, 2002), Y153C dans la boucle $\alpha 4\alpha 5$ ainsi que W182I et G183C dans la boucle $\alpha 5\alpha 6$ de la Cry1Ab (Nuñez-Valdez *et al.*, 2001) et de nombreuses mutations des résidus N85, Q86,

R87, I88 et E89 dans la boucle $\alpha 2\alpha 3$ (Wu et Aronson, 1992), ainsi que V150D dans la boucle $\alpha 4\alpha 5$ (Kumar et Aronson, 1999), de la Cry1Ac. La toxicité n'a pas été modifiée substantiellement non plus par des mutations dans la boucle $\alpha 3\alpha 4$ de la Cry2Aa (Audtho *et al.*, 1999), la Cry4Ba (Krittanaï *et al.*, 2001) et la Cry9Ca (Lambert *et al.*, 1996), trois toxines présentant moins d'homologie avec la Cry1Aa (Crickmore *et al.*, 2003). Les mutants N123Y (boucle $\alpha 3\alpha 4$) et F184I (boucle $\alpha 5\alpha 6$) de la Cry1Ab (Jellis *et al.*, 1989), ainsi que R203A (boucle $\alpha 5\alpha 6$) de la Cry4Ba (Angsuthanasombat *et al.*, 1993) se sont même avérés plus toxiques que leurs toxines parentales respectives. Par contre, D222A (boucle $\alpha 6\alpha 7$) de la Cry1Aa, une mutation qui empêche la formation d'un pont salin interdomaine, est considérablement moins toxique que la toxine parentale, même si sa capacité à former des pores *in vitro* n'est pas altérée de façon significative (Coux *et al.*, 2001). Aussi, la capacité des mutants Y153A, Y153D et Y153R (boucle $\alpha 4\alpha 5$) de la Cry1Ab à inhiber le courant de court-circuit traversant l'épithélium intestinal du sphinx du tabac est réduite à un niveau qui correspond qualitativement à leur réduction de toxicité (Chen *et al.*, 1995).

Les modifications dans l'activité de la toxine décrites dans la présente étude sont particulièrement prononcées à pH 10,5. Même si des conditions aussi fortement alcalines sont caractéristiques de celles qu'on trouve dans la lumière intestinale des larves des lépidoptères lorsque celles-ci s'alimentent activement (Dow, 1984, 1992), le pH élevé introduit une charge négative sur la chaîne latérale des résidus cystéine et tyrosine et réduit la proportion des résidus lysine chargés positivement. La surface de la membrane devient également plus négative à pH élevé. Le degré d'ionisation des résidus tyrosine et lysine ne semble pas avoir d'influence majeure sur l'activité de la toxine puisque les changements de pH n'ont

eu que très peu d'effet sur la capacité de la Cry1Aa à perméabiliser la membrane ou sur les propriétés des pores formés. On pourrait s'attendre, comme cela a été suggéré pour le mutant Y153D de la Cry1Ab (Chen *et al.*, 1995), à ce que l'introduction d'une charge négative dans une boucle interhélicale, bien exposée à la surface de la molécule, nuise à l'interaction initiale de la toxine avec la membrane en raison d'une répulsion électrique. Cette explication ne rend cependant pas compte de la réduction substantielle dans la vitesse de formation des pores observée avec F50C, Q151C, Y153C, W182C et S252C à pH 7,5 puisque, dans ces conditions, seulement environ 13% des résidus cystéine sont chargés selon l'équation de Henderson-Hasselbach (Rawn, 1989). De plus, à pH 10,5, 71% des résidus tyrosine devraient théoriquement être chargés négativement. Il y a donc une plus grande proportion de charges négatives sur le résidu Y153 dans la Cry1Aa non mutée à pH 10,5 que dans le mutant Y153C à pH 7,5. De plus, une telle répulsion électrostatique entre la toxine et la membrane devrait avoir un effet plus prononcé sur la formation des pores lorsque la charge négative est placée du côté de la toxine qui interagit directement avec la membrane lors de l'insertion. Pourtant, des vitesses réduites de formation des pores sont observées pour des mutants dans lesquels la cystéine a été introduite d'un côté ou de l'autre de la molécule et non seulement dans les boucles $\alpha 2\alpha 3$, $\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 6\alpha 7$, situées du même côté de la molécule que la pointe du domaine II, une région bien exposée de la toxine dont le rôle déterminant dans la liaison avec le récepteur membranaire est bien documenté (Schnepf *et al.*, 1998).

Nos résultats ne permettent pas de favoriser l'un ou l'autre des modèles proposés pour décrire le mécanisme de formation des pores (Fig. 9, p. 45). On pourrait s'attendre à ce que l'effet des mutations soit particulièrement prononcé

lorsque celles-ci se situent dans les boucles qui, selon un modèle donné, doivent traverser la membrane lors de l'insertion de la toxine. Des vitesses réduites de formation de pores ont cependant été observées pour la plupart des mutants. De telles réductions ne sont clairement pas limitées aux mutants possédant des altérations dans les boucles $\alpha 4\alpha 5$ ou $\alpha 5\alpha 6$ dont l'insertion constitue respectivement l'étape initiale essentielle dans les modèles en parapluie (Schwartz *et al.*, 1997a; Gazit *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999; Gerber *et al.*, 2000; Aronson et Shai, 2001) (Fig. 9A, p. 45) et en canif (Hodgman et Ellar, 1990; Knowles, 1994) (Fig. 9B, p. 45). Le modèle proposé récemment par Loseva *et al.* (2001), dans lequel toute la toxine, à l'exception des trois premières hélices du domaine I, s'insère dans la membrane, ne permet pas non plus d'expliquer la réduction de la vitesse de formation des pores observée pour les mutants altérés dans les boucles $\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4$, $\alpha 5\alpha 6$ et $\alpha 7\beta 1$.

Par contre, nos résultats corrélerent bien avec ceux d'études antérieures dans lesquelles les hélices du domaine I ont été liées les unes aux autres par des ponts disulfures (Schwartz *et al.*, 1997a; Schwartz et Masson, 2000). Le pontage de $\alpha 3$ avec $\alpha 4$, $\alpha 5$ avec $\alpha 6$, $\alpha 5$ avec $\alpha 7$ ou $\alpha 7$ avec le domaine II empêche la formation de pores dans des membranes artificielles, mais l'activité de la toxine est pleinement restaurée en présence de β -mercaptoéthanol. Par contre, le mutant dans lequel $\alpha 2$ est lié à $\alpha 3$ possède une activité similaire à celle de la Cry1Aa non mutée indépendamment de la présence de l'agent réducteur. Ces résultats indiquent que, à l'exception notable de la paire $\alpha 2\alpha 3$, la plupart des hélices se déplacent l'une par rapport à l'autre pendant la formation des pores. Des altérations de la séquence des acides aminés dans les boucles interhélicales pourraient modifier la vitesse de formation des pores en ralentissant le déplacement des hélices reliées par la boucle mutée. Il est en effet remarquable que des mutations introduites dans chacune des

boucles du domaine I aient entraîné une diminution dans la vitesse de formation des pores, à l'exception de la mutation introduite dans la boucle $\alpha 2\alpha 3$. Le fait que la mutation T122C, tout comme D120C, D120K et D120Q (Vachon *et al.*, 2002), n'ait pas entraîné de réduction significative dans la vitesse de formation des pores suggère cependant que l'activité non altérée du mutant I88C pourrait résulter, de façon tout à fait fortuite, du choix du résidu I88 pour la mutation. Cette possibilité semble néanmoins peu probable puisque, parmi les nombreuses mutations introduites dans la boucle $\alpha 2\alpha 3$ de Cry1Ac, seule I88K a entraîné une diminution de toxicité (Wu et Aronson, 1992). Bien que le mécanisme avec lequel les toxines du bacille de Thuringe s'insèrent dans la membrane et forment des pores demeure incomplètement élucidé, la présente étude souligne le rôle important que jouent les hélices interhélicales du domaine I de la toxine dans le processus de perméabilisation membranaire.

5. MODIFICATIONS CHIMIQUES DES MUTANTS CYSTÉINE

5.1. Introduction

L'étude détaillée des propriétés des mutants de la Cry1Aa, dans lesquels un résidu a été remplacé par une cystéine dans chacune des boucles interhélicales du domaine I, souligne l'importance de ces boucles dans le mécanisme d'action de la toxine (chapitre 4). Le fait qu'aucune cystéine ne soit présente dans la Cry1Aa activée ouvre une voie d'expérimentation encore plus poussée. Effectivement, la cystéine possède un groupement thiol (-SH) polaire et réactif qui peut former des liaisons covalentes telles que des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes faibles avec l'oxygène et l'azote. La création, par mutagenèse dirigée, de mutations dans les boucles interhélicales du domaine I de la Cry1Aa, où un acide aminé a été substitué par un résidu cystéine, devrait permettre d'étudier, d'une part, l'effet de modifications chimiques sur la cinétique d'insertion de la toxine dans la membrane et, d'autre part, l'accessibilité de chacune des boucles du domaine I à la surface externe et interne de la membrane une fois le pore formé. De cette façon, la compréhension des étapes qui mènent à la formation du pore, ainsi que l'identification des hélices alpha qui pénètrent la membrane intestinale pour former le pore pourront être approfondies.

Le présent chapitre expose donc les résultats des expériences qui avaient pour but d'évaluer la réactivité chimique des mutants cystéine décrits dans le chapitre précédent. La première modification chimique effectuée a été l'ajout d'un réactif neutre, le NEM, dans le but de créer un obstacle à la pénétration de la boucle mutée dans la membrane. Les mesures de la vitesse de formation des pores ont été

effectuées par la technique de gonflement osmotique, mais aucun effet ne fut détecté. D'autres modifications chimiques avec des molécules de plus grandes tailles, ainsi que des analyses de type *western*, ont révélé que la réactivité des résidus mutés était très faible et que cette situation résultait d'une oxydation du groupement thiol en oxyacides organosulfurés, tels que l'acide sulfénique et ses dérivés. Cette modification chimique s'avère difficilement réversible, mais peut être évitée par ajout d'un chélateur d'ions métalliques et d'un agent réducteur au cours de la purification des toxines.

5.2. Matériel et méthodes

5.2.1. Préparation des toxines et gonflement osmotique

Les mutants, ainsi que les techniques utilisées pour leur préparation et l'analyse de leurs propriétés, par mesures de diffusion de la lumière, sont présentées dans la section intitulée "Matériel et méthodes" du chapitre 4. Toutefois, pour les expériences illustrées dans la Fig. 23 (p. 89), 2 mM d'EDTA ont été ajoutés à la préparation au moment de l'activation, suivi de 5 mM de DTT immédiatement après la digestion, de manière à prévenir l'oxydation du groupement thiol des résidus cystéine en oxyacides organosulfurés. Le DTT a été retiré du mélange par chromatographie par filtration sur gel avec une colonne de Sephadex (Column PD-10, Amersham Biosciences).

5.2.2. Modifications chimiques

5.2.2.1. NEM

Les toxines (2,0 µg/µl), dans un volume de 5,9 µl, ont été incubées 15 minutes dans 1,0 ml d'une solution contenant 10 mM d'Hepes, pH 7,5, et 2 nmol de NEM (Sigma-Aldrich) ou 0,21% (v/v) de DMSO. Le mélange réactionnel a ensuite été dilué par ajout de 2,0 ml d'une solution composée de 225 mM de KCl, 1,5 mg/ml d'albumine sérique bovine et 10 mM d'Hepes, pH 7,5. Les vésicules ont été incubées dans cette solution au début des expériences de gonflement osmotique.

5.2.2.2. MTSEA-biotine

Les toxines (2,0 µg/µl), dans un volume de 5,9 µl, ont été incubées pendant 15 minutes dans 7,0 µl d'une solution contenant 10 mM d'Hepes, pH 7,5, et 1,8 nmol de MTSEA-biotine (Toronto Research Chemicals). Le mélange a ensuite été dilué par ajout de 3,0 ml d'une solution composée de 150 mM de KCl, 1,0 mg/ml d'albumine sérique bovine et 10 mM d'Hepes, pH 7,5 et contenant ou non 1,8 nmol de streptavidine (ImmunoPure Streptavidin, Pierce). Après une période d'incubation additionnelle d'une heure, les vésicules ont été finalement introduites dans cette solution pour les mesures de gonflement osmotique.

5.2.3. Analyses de type *western*

Les mutants (2 µg/µl) ont été préincubés pendant 15 minutes avec le maléimide de biotine (Molecular Probes) dans un rapport molaire de 1:10 et ce,

avant ou après avoir été dénaturés à 96°C pendant 5 minutes. Les protéines ont d'abord été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de 10% (p/v) de dodécyle sulfate de sodium. Le transfert des toxines, d'une durée de 2 heures, s'est effectué sur une membrane de fluorure de polyvinylidène avec des pores d'un diamètre de 0,45 µm (Immobilon-P, Millipore) dans un tampon composé de 25 mM Tris, 192 mM glycine et 10% méthanol, pH 8,3. Le blocage des sites non-spécifiques s'est déroulé une nuit entière à 4°C dans une solution de 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 2,5% (p/v) d'albumine sérique bovine et 0,1% (p/v) de Tween 20, pH 8,0. Les membranes ont été incubées 1 heure avec de la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (Sigma-Aldrich) diluée à 1:400 dans la solution de blocage, à température de la pièce et sous une agitation constante. Les membranes ont été lavées à plusieurs reprises entre 5 et 15 minutes avec une solution composée de 20 mM Tris, 137 mM NaCl et 0,1% (p/v) de Tween 20, pH 7,6. Les complexes ont été révélés à l'aide de la trousse de coloration AEC chromogène (Sigma-Aldrich). Pour les résultats présentés dans la Fig. 22 (p. 87), le protocole d'analyse de type *western* s'est déroulé en présence d'1 mM de DTT mélangé aux préparations de toxines (colonne 3). Pour le résultat de la colonne 2,5 mM de DTT ont d'abord été ajoutés aux préparations de toxines solubilisées pendant 1 heure, puis retirés des solutions par une dialyse de 24 heures.

5.2.4. Purification sur une colonne d'avidine

Nous avons sélectionné un mutant qui présentait un haut taux de biotinylation, tel que montré par les résultats d'analyses de type *western*. Ainsi, le mutant P121C (2 µg/µl) a été préincubé *in vitro* pendant 1 heure sous agitation constante dans du tampon PBS, composé de 100 mM de phosphate de sodium et

150 mM de chlorure de sodium, pH 7,2, et avec le réactif MTSEA-biotine dans un rapport molaire de 1:10. Le mutant biotinylé a ensuite été purifié par chromatographie par filtration sur gel, avec une matrice de Superose 12 (Sigma-Aldrich). Les fractions contenant la toxine ont été dosées et concentrées par centrifugation à 5500 *rpm* dans des tubes Centricon Plus-20 (Millipore) pendant 1 heure pour obtenir un volume final de 1 ml. Le mélange concentré a été dosé, puis purifié sur une colonne d'avidine (ImmunoPure Immobilized Monomeric Avidin, Pierce) d'un volume de 1,27 cm³. Dans le but de bloquer les sites de liaison irréversible, la colonne a été lavée à trois reprises avec une solution de blocage et d'élution composée de tampon PBS et de 2 mM de D-biotine. La biotine liée de façon réversible a été éliminée de la colonne par l'ajout, à trois reprises, de tampon de régénération, constitué de 100 mM de glycine, pH 2,8. La toxine biotinylée a été chargée sur la colonne et incubée pendant 1 heure. La protéine non-liée a été retirée de la colonne à l'aide de tampon PBS et ensuite, la protéine liée à la colonne a été éluée avec le tampon de blocage et d'élution mentionné plus haut. Un échantillon a été prélevé à chacune des étapes, afin d'effectuer un dosage. Ces échantillons ont ensuite été testés par analyse de type *western*.

5.3. Résultats et discussion

5.3.1. Analyse des effets des modifications chimiques sur la vitesse de formation des pores par les mutants cystéine

Les mutants ont d'abord été préincubés avec différents réactifs spécifiques au groupement thiol et ont ensuite été mélangés avec les vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac et un volume égal d'une solution de 150

mM de KCl. Au moment du mélange, il se produit un choc hypertonique, faisant diminuer rapidement le volume des vésicules. À l'aide d'une technique de diffusion de la lumière qui mesure le gonflement osmotique des vésicules dû à l'entrée du soluté (KCl) au travers des pores, l'activité des mutants est évaluée par la vitesse avec laquelle les vésicules recouvrent une fraction de leur volume initial.

Le NEM étant solubilisé dans le DMSO, les enregistrements des vitesses de formation de pores pour les mutants testés en absence du réactif ont été effectués avec 0,07% (v/v) de ce solvant, une quantité équivalente à celle présente lors des expériences réalisées en présence du réactif. La concentration de DMSO utilisée n'a toutefois exercé aucun effet perméabilisant sur les vésicules membranaires (résultats non présentés). La vitesse de formation de pores des mutants modifiés chimiquement avec le NEM, laquelle s'exprime en recouvrement de volume en fonction du temps, s'est avérée la même en présence et en absence de réactif (Fig. 15, p. 76). Ces résultats suggèrent d'une part que la taille du NEM n'était peut-être pas suffisamment importante pour nuire à l'insertion membranaire. Effectivement, le poids moléculaire du NEM est de 125,1 et il est probable que sa présence dans chacune des boucles interhélicales ne constitue pas un obstacle assez volumineux pour ralentir la pénétration d'une ou plusieurs de ces boucles. D'autre part, il est aussi possible que le groupement thiol de chacun des résidus cystéine ne soit pas accessible et ne puisse donc pas réagir avec le NEM. Bien que la structure de la Cry1Aa en solution puisse différer légèrement de sa structure cristalline (Grochulski *et al.*, 1995), cette hypothèse serait plutôt surprenante étant donné l'emplacement des sites de mutations. Les boucles interhélicales sont très bien exposées au milieu environnant (Fig. 7, p. 31).

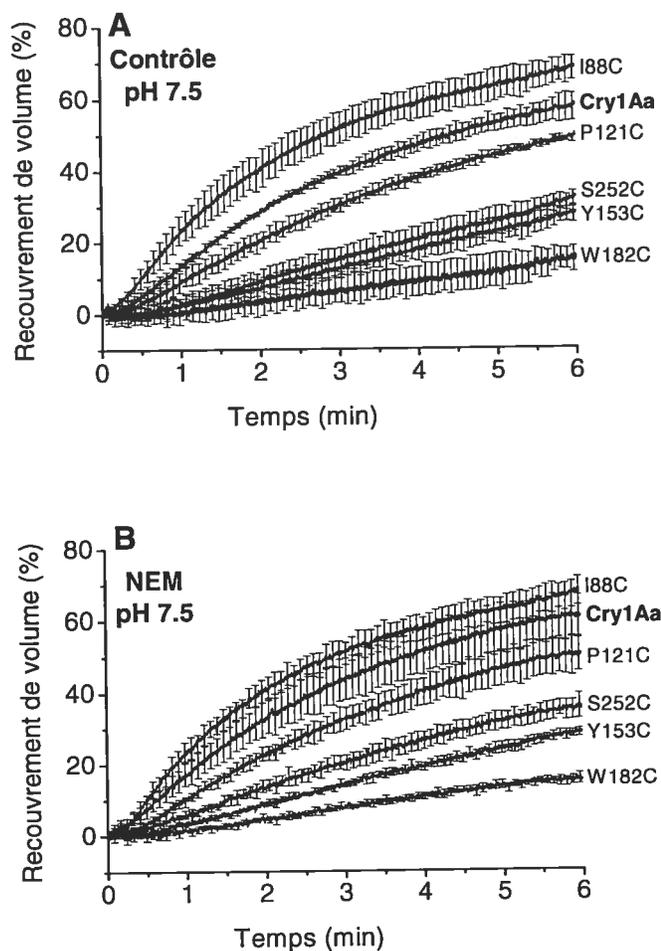


Figure 15 : Effet du NEM sur la vitesse de formation des pores par différents mutants de la Cry1Aa dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.

Pour les expériences réalisées en absence de réactif (A), les vésicules sont directement mélangées avec 150 pmol/mg de protéine membranaire de chacun des mutants, 0,07% de DMSO, 150 mM de KCl, 1 mg/ml d'albumine sérique bovine et 10 mM d'Hepes. La modification chimique (B), a été effectuée en préincubant les mutants 15 minutes avec 1 mM de NEM et 10 mM d'Hepes dans un volume de 1 ml. 2 ml d'une solution de 225 mM de KCl, 1,5 mg/ml d'albumine sérique bovine et 10 mM d'Hepes, pH 7,5 ont ensuite été ajoutés au mélange. Celui-ci a finalement été mis en contact avec les vésicules. Le recouvrement de volume a été calculé pour chaque point expérimental et les valeurs obtenues pour le témoin en absence de toxine, ont été soustraites de celles obtenues en présence de toxine. Des barres d'erreur sont représentées tous les 50 points expérimentaux.

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons effectué une modification chimique beaucoup plus appréciable. Pour ce faire, les mesures de perméabilisation des vésicules ont été réalisées en présence de biotine et de streptavidine. Cette dernière molécule se lie spécifiquement à la biotine avec une grande affinité et est de dimension nettement supérieure à celle du NEM, avec un poids moléculaire d'environ 60 000, soit pratiquement la taille de la toxine. Nous avons réalisé cette modification chimique sur trois toxines. Nous avons sélectionné le plus actif des mutants, I88C, et les mutants Y153C et W182C, situés respectivement dans les boucles $\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 6$, hypothétiquement impliquées dans la formation du pores. Effectivement, dans le modèle en parapluie (Gazit *et al.*, 1998; Uawithya *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999; Gerber et Shai, 2000; Aronson et Shai, 2001; Li *et al.*, 2001) (Fig. 9A, p. 45), c'est l'épingle hélicale alpha 4 et 5 qui s'insérerait dans la membrane, tandis que dans le modèle en canif (Hodgman et Ellar, 1990; Knowles, 1994) (Fig. 9B, p. 45), c'est plutôt l'épingle hélicale alpha 5 et 6 qui pénétrerait la membrane. L'ajout de la streptavidine n'a pas modifié la vitesse de formation de pores pour les mutants I88C et W182C (Fig. 16A et C, p. 78). Dans ce cas, il est impossible d'admettre que la taille du modificateur chimique n'était pas assez importante pour affecter l'insertion membranaire. Au contraire, la liaison de la streptavidine aux deux mutants aurait dû modifier la cinétique de formation de pores en perturbant le réarrangement des différentes hélices alpha du domaine I, ainsi que des domaines II et III de la protéine après sa liaison au récepteur membranaire. Ces résultats suggèrent que l'absence d'effet des modifications chimiques pourrait plutôt résulter d'une inaccessibilité des résidus mutés dans la forme soluble de la toxine. Pour le mutant Y153C, la présence de la streptavidine a provoqué une légère diminution du taux de formation des pores (Fig. 16B, p. 78). Dans ce cas, il est

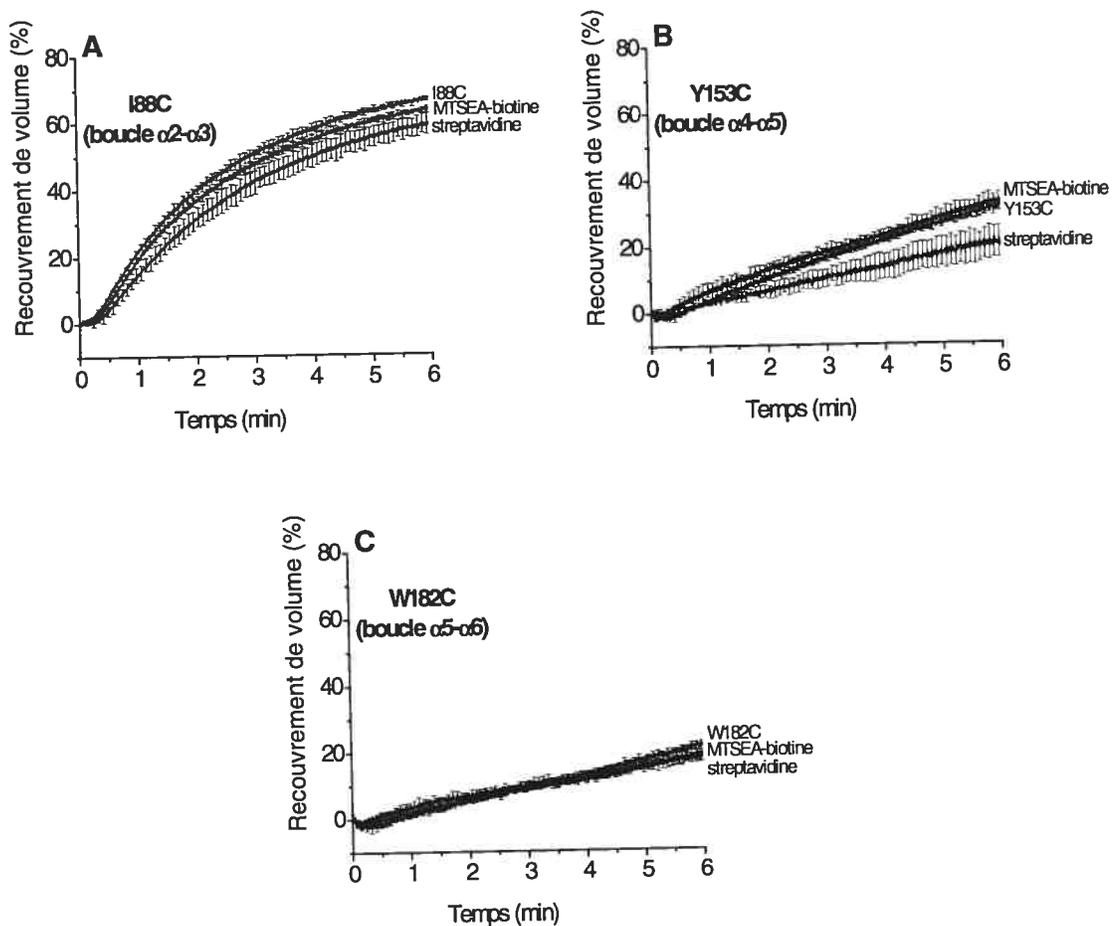


Figure 16 : Effets de la biotine et de la streptavidine sur la vitesse de formation des pores par différents mutants de la Cry1Aa dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.

À une concentration de 150 pmol/protéine membranaire, les mutants I88C (A), Y153C (B) et W182C (C), ont été analysés sous trois conditions expérimentales différentes. Dans un premier temps, chacun des mutants a été mélangé à 150 mM de KCl, 1 mg/ml d'albumine sérique bovine et 10 mM d'Hepes, pH 7,5, puis directement mélangé avec les vésicules, sans préincubation. Dans une deuxième temps, chacun des mutants a d'abord été préincubé 15 minutes avec 1,8 nmol de MTSEA-biotine avant d'être mélangé à la solution énoncée plus haut. Dans un dernier temps, une incubation d'une heure avec 1,8 nmol de streptavidine a suivi l'étape de biotinylation. Chaque courbe correspond à la moyenne des données obtenues avec trois préparations de vésicules différentes. Pour chaque préparation, les expériences ont été réalisées en quintuplicata.

possible qu'un faible pourcentage de sites ait pu être accessible ou sensible à la modification chimique, ce qui se traduit par une faible diminution dans la vitesse de formation de pores.

Ce résultat pourrait s'expliquer de deux façons. Tout d'abord, il pourrait être dû à une inaccessibilité spatiale des groupements thiol. Les résidus mutés pourraient ne pas être en contact avec le milieu aqueux dans lequel baigne la protéine, mais plutôt cachés à l'intérieur de la structure de la protéine. Il est également probable que, bien qu'il soit exposé au milieu aqueux et donc physiquement accessible, le groupement thiol des cystéine ne soit plus réactif. Le groupement thiol peut effectivement subir un premier niveau d'oxydation de telle sorte qu'il forme des ponts disulfures. La réaction est complètement réversible suite à l'ajout d'un agent réducteur. Il arrive toutefois qu'en présence d'oxygène, de métaux divalents et d'un pH élevé, le groupement thiol soit oxydé à un plus haut niveau pour former de l'acide sulfénique (-SOH) ou ses dérivés, l'acide sulfinique (-SO₂H) et l'acide sulfonique (-SO₃H) (Capozzi et Modena, 1974). Sous l'une ou l'autre de ces formes, particulièrement les deux dernières, le groupement thiol n'est plus sensible aux agents chimiques. Des analyses plus poussées ont donc été effectuées, afin d'étudier en détail l'accessibilité et la réactivité des résidus mutés de la Cry1Aa.

5.3.2. Détermination de la réactivité des résidus cystéine dans chacune des boucles interhélicales

Des analyses sur gels d'électrophorèse ont été effectuées, afin de vérifier d'une part la pureté et l'intégrité de chacun des mutants suivant l'activation par la

trypsine. D'autre part, ces gels visaient à examiner si les mutants avaient subi une oxydation de nature à former des ponts disulfures. L'absence de bandes d'un poids moléculaire de près de 120-130 kDa pour tous les mutants a confirmé qu'ils ne formaient pas de dimères et que les faibles taux de formation de pores obtenus en gonflement osmotique ne pouvaient résulter de ce type d'oxydation (Fig. 17, p. 81).

Dans un deuxième temps, la réactivité du groupement thiol de tous les mutants de chaque boucle interhélicale a été vérifiée. Pour ce faire, les mutants ont été marqués avec du maléimide de biotine, puis soumis à une analyse de type *western* de manière à évaluer qualitativement le taux de biotinylation de chacun (Fig. 18, p. 81). La streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort a été employée pour révéler les bandes. Nous avons obtenu des bandes d'intensité variable qui reflètent le niveau de réactivité de chacun des résidus mutés. Les mutants F50C et I88C semblent moins réactifs que les autres mutants. L'absence de bande pour la Cry1Aa confirme l'absence de liaison non-spécifique, puisque la Cry1Aa activée ne possède aucun résidu cystéine.

Les résultats obtenus à l'aide de la technique de diffusion de la lumière et présentés dans la section précédente suggèrent toutefois que le groupement thiol des mutants réagit très peu avec les modificateurs chimiques. Afin de déterminer précisément l'origine de cette insensibilité, une analyse de type *western* a été réalisée avec des mutants préalablement dénaturés (Fig. 19, p. 82). En exposant ainsi tous les sites qui ne seraient pas accessibles normalement au maléimide de biotine, cette expérience avait pour but de déterminer s'il s'agissait d'une inaccessibilité spatiale du groupement thiol ou d'une perte de réactivité de ce dernier occasionnée par une oxydation en oxyacides organosulfurés. La coloration

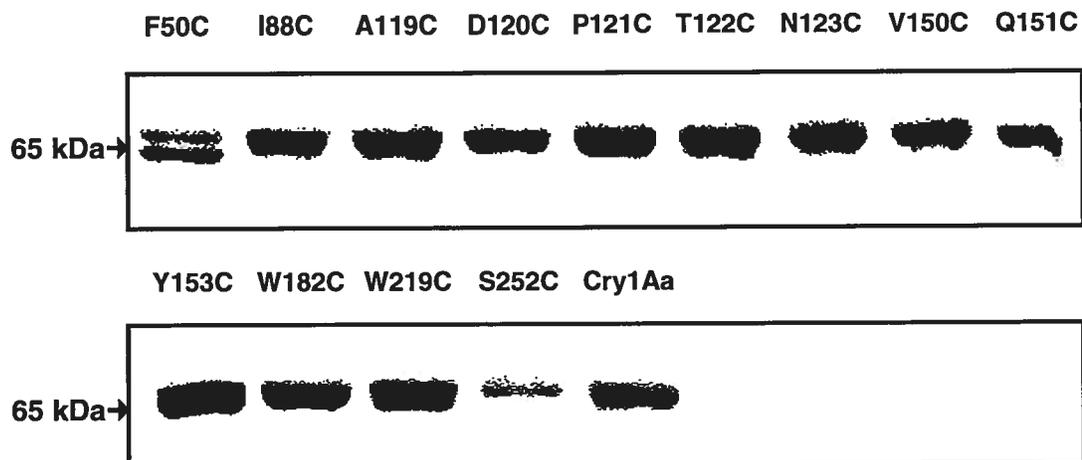


Figure 17 : Électrophorèse de la Cry1Aa et des mutants activés sur un gel de polyacrylamide en présence de 10% (p/v) de dodécyle sulfate de sodium coloré au bleu de Coomassie.

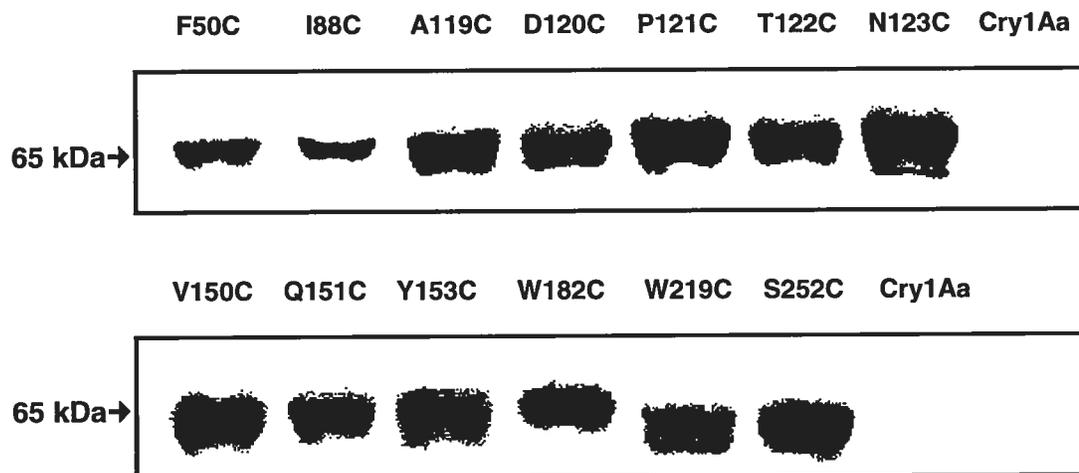


Figure 18 : Accessibilité des résidus mutés de la Cry1Aa par analyse de type *western*. La Cry1Aa et chacun des mutants (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ont été préalablement incubés avec du maléimide de biotine dans un rapport molaire de 1:10. Les protéines ont été dénaturées, fractionnées sur un gel de polyacrylamide en présence de 10% (p/v) de dodécyle sulfate de sodium, puis transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène. Les toxines biotinylées ont été révélées avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort et la trousse de coloration AEC.

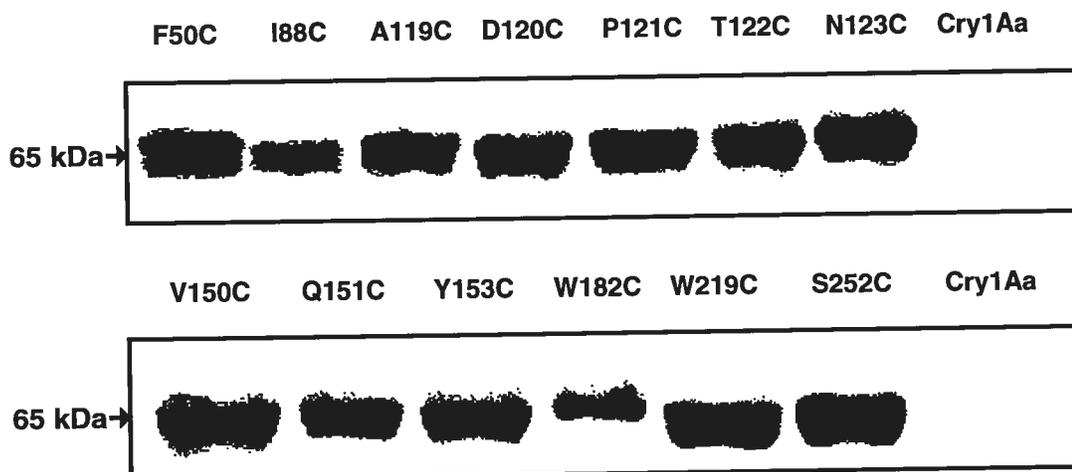


Figure 19 : Accessibilité des résidus mutés de la Cry1Aa après dénaturation par analyse de type *western*. La procédure est la même que celle décrite dans la section "Matériel et méthodes" et dans la légende de la figure 18 (p. 81), à l'exception que les mutants ont d'abord été dénaturés, puis biotinylés.

des bandes a révélé une représentation très similaire à celle obtenue lorsque la biotinylation des mutants avait précédé leur dénaturation, ce qui confirme que le groupement thiol de chacun des mutants n'est pas réactif et qu'il est oxydé de manière à former des oxyacides organosulfurés.

Dans le but de quantifier plus précisément le taux de biotinylation des mutants, le mutant P121C a été sélectionné pour effectuer une purification par chromatographie d'affinité sur une colonne d'avidine. Un dosage des protéines ainsi qu'une analyse de type *western* ont été effectués à chacune des étapes du protocole de purification. Seule une fraction très faible (1-2%) de la toxine est retenue par la colonne. De plus, aucune toxine biotinylée dans la fraction déplacée par la biotine libre n'a pu être détectée après un transfert sur une membrane de fluorure de

polyvinylidène et un traitement avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort. Ce résultat indique que cette toxine, malgré l'intensité de la bande obtenue en analyse de type *western*, est très faiblement biotinylée. Les résultats obtenus en analyse de type *western* doivent donc être interprétés prudemment. En fait, le système de détection permet de comparer les mutants entre eux, mais ne permet pas de déterminer quantitativement le taux de biotinylation de chacun. De plus, la sensibilité du système est telle que les mutants, même faiblement biotinylés, présentent des bandes d'une intensité élevée.

5.3.3. Effet de l'oxydation du groupement thiol sur la réactivité des mutants cystéine

L'oxydation du groupement thiol en oxyacides organosulfurés est favorisée par un pH élevé, l'oxygène moléculaire, les ions métalliques, la présence de groupements thiol isolés et la lumière ultraviolette. Il n'est donc pas rare de rencontrer des groupements thiol sous forme d'une variété d'oxy-dérivés, tels que l'acide sulfénique et ses dérivés, l'acide sulfinique et l'acide sulfonique (Fluharty, 1974; Capozzi et Modena, 1974; Allison, 1976; Kice, 1980) (Fig. 20, p. 84). Comme les protoxines du bacille de Thuringe sont insolubles à pH neutre, leur solubilisation s'effectue à un pH de 10,5. L'exposition à l'air ambiant est aussi omniprésente, non seulement pendant la préparation des toxines, mais aussi durant leur utilisation expérimentale. En ce qui concerne les ions métalliques, bien qu'aucune de nos solutions n'en contiennent, en principe, il n'est pas exclu qu'il puisse y en avoir des traces provenant des produits chimiques utilisés ou des cellules de *Escherichia coli* dans lesquelles les toxines sont produites. De plus, comme la Cry1Aa activée ne possède aucun résidu cystéine, chacun des mutants n'a qu'un seul groupement

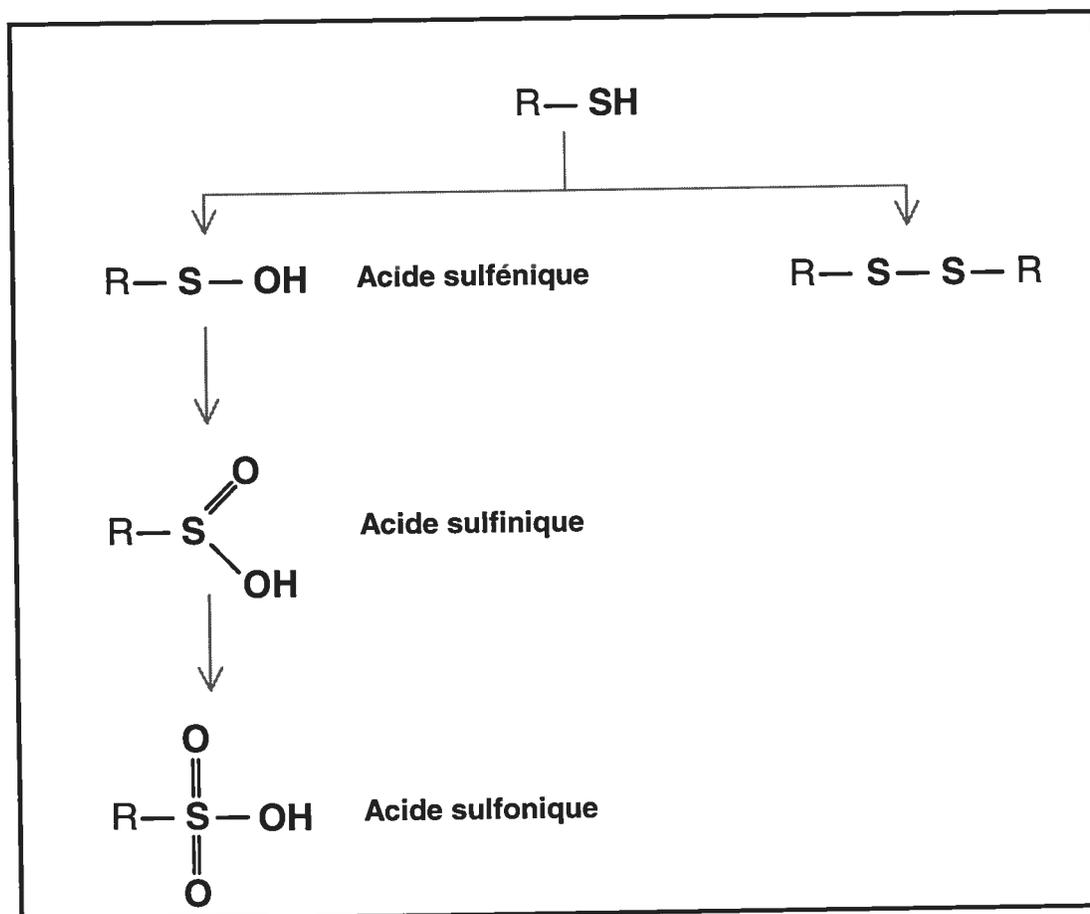


Figure 20 : Voies d'oxydation du groupement thiol de la cystéine. Il s'agit d'un schéma simplifié où sont représentés seulement les produits d'oxydation discutés dans cette section. Adapté de Capozzi et Modena (1974).

thiol, et l'absence de ponts disulfures, vérifiée par électrophorèse sur gel, permet alors de conclure que le groupement thiol est isolé dans la structure de la toxine. De plus, la position des résidus mutés dans la toxine est telle que le groupement thiol est probablement bien exposé à la surface de la molécule. Toutes les conditions favorisant la formation d'acides sulfénique, sulfinique et sulfonique sont donc remplies lors de la purification des toxines et des expériences effectuées.

Finalement, ce type d'oxydation est fonction du temps puisqu'il a été mentionné que des temps de réaction prolongés causent une oxydation au-delà de la formation de ponts disulfures dans des solutions aqueuses (Capozzi et Modena, 1974). Un effet du temps sur la réactivité de deux des trois mutants testés en gonflement osmotique après traitement avec le MTSEA-biotine et la streptavidine avait d'ailleurs été constaté. Par exemple, l'effet de la streptavidine sur le recouvrement de volume des vésicules traitées avec le mutant Y153C fut beaucoup plus important pendant l'expérience #1 qu'à l'expérience #3 (Fig. 21, p. 86). Un écart de 21 jours séparait les deux expériences. Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec le mutant I88C (résultats non présentés). L'incubation de plus d'une heure des mutants avec les différents réactifs à l'air ambiant, l'agitation fréquente des mélanges au vortex, ainsi que la conservation des mutants durant plusieurs jours ont sûrement contribué à cette réaction d'oxydation.

En raison du caractère fortement nucléophile de l'atome de soufre, l'acide sulfénique est généralement instable et constitue plutôt un état intermédiaire. Toutefois, quelques études ont mis en évidence la participation d'acides sulféniques stables à l'intérieur de protéines jouant un rôle dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Claiborne *et al.*, 1999). Par contre, l'oxydation du groupement thiol en acide sulfinique et en acide sulfonique est considérée comme une réaction irréversible (Kice, 1980). Il n'existe aucun moyen simple de déterminer la proportion de groupement thiol oxydé en chacune de ces formes. Une expérience visant à réduire les groupements oxydés en leur forme réactive a donc été tentée, tel que proposé par Benson *et al.* (1998). Pour ce faire, une analyse de type *western* du mutant T122C a été effectuée soit en présence d'1 mM de DTT (colonne 3) (Fig. 22, p. 87), soit avec le mutant préalablement incubé pendant 1 heure avec 5 mM de

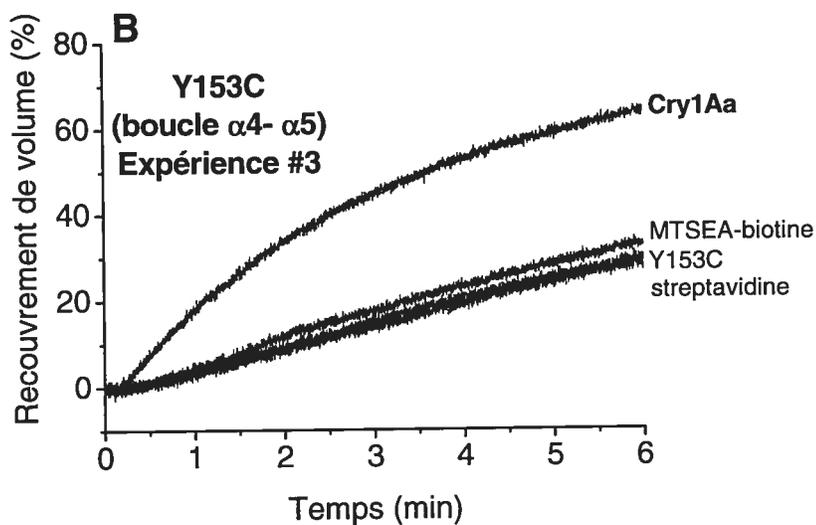
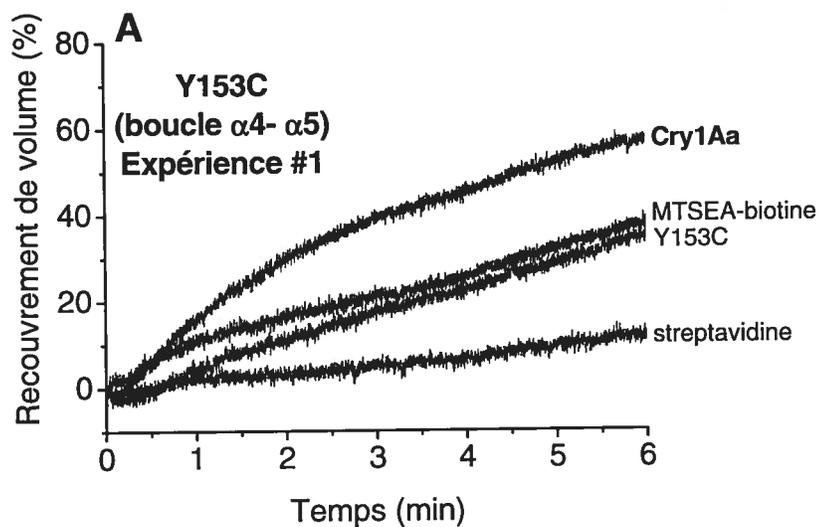


Figure 21 : Effet de l'oxydation du groupement thiol de la cystéine du mutant Y153C sur la vitesse de formation des pores dans des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac.

La vitesse de formation des pores a été mesurée telle que décrit dans la légende de la Fig. 15 (p. 76). Il s'était écoulé 21 jours entre la première et la troisième expérience.

DTT, puis dialysé 24 heures (colonne 2) (Fig. 22, p. 87). L'intensité de la bande du mutant préalablement incubé avec le DTT, puis dialysé (colonne 2), suggère que la présence de DTT a permis de réduire une certaine fraction des mutants oxydés, probablement ceux qui se trouvaient sous forme d'acide sulfénique. Toutefois, cette modification chimique ne semble pas suffisante pour restituer un nombre assez élevé de groupements thiol sous une forme réactive. De plus, il semble que la biotinylation du mutant en présence de DTT (colonne 3) ne permette pas d'accroître le taux de réactivité du mutant.

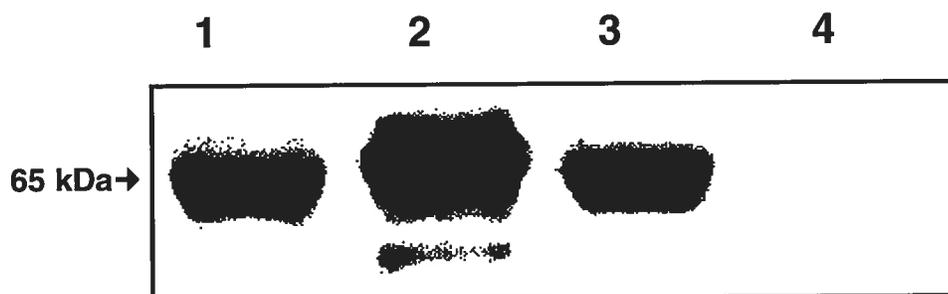


Figure 22 : Effet du DTT sur l'oxydation du groupement thiol de la cystéine du mutant T122C.

La procédure pour le mutant T122C (1, 2, 3) et la Cry1Aa (4) est la même que celle décrite dans la légende de la Fig. 18 (p. 81). En 2, le mutant T122C avait d'abord été préincubé 1 heure avec 5 mM de DTT, puis mis à dialyser pendant 24 heures. En 3, le protocole s'est effectué en présence d'1 mM de DTT.

Il devient alors évident que la solution à ce problème n'est pas de rétablir le groupement sous une forme réactive, mais d'empêcher qu'il ne s'oxyde. Pour ce faire, il serait souhaitable de supprimer tous les facteurs responsables de ce type d'oxydation lors de la purification des mutants. Bien qu'un pH élevé favorise l'oxydation des groupements thiol des résidus cystéine, il s'avère difficile de produire des mutants de la Cry1Aa à des valeurs inférieures de pH puisque la solubilisation des cristaux en protoxines n'est possible qu'à des pH alcalins. Dans leurs travaux sur la dihydrofolate réductase de *Escherichia coli*, Villafranca *et al.* (1987) ont réussi à obtenir des mutants cystéine réactifs en réduisant l'exposition à l'air ambiant et en ajoutant un agent chélateur, l'EDTA, à leurs tampons de purification. La présence de DTT pendant l'activation des toxines inhibe l'activité de la trypsine. Nous avons donc ajouté 2 mM d'EDTA au moment de l'activation et 5 mM de DTT immédiatement après la digestion enzymatique. Le DTT n'est enlevé qu'au moment de l'utilisation du mutant pour les expériences. Pour ce faire, le mélange contenant la toxine solubilisée et le DTT est soumis à une chromatographie par filtration sur gel. Les résultats obtenus montrent très clairement l'efficacité de l'EDTA et du DTT pour maintenir la réactivité du groupement thiol des mutants (colonne 2) (Fig. 23, p. 89). Ceci suggère d'une part qu'il doit y avoir des métaux divalents présents dans les préparations de toxines. D'autre part, l'ajout d'EDTA et de DTT réduit considérablement l'oxydation des groupements thiol en acides sulfinique et sulfonique puisque le niveau de biotinylation des mutants est nettement supérieur lorsque ces derniers ont été préparés en leur présence (colonne 2).

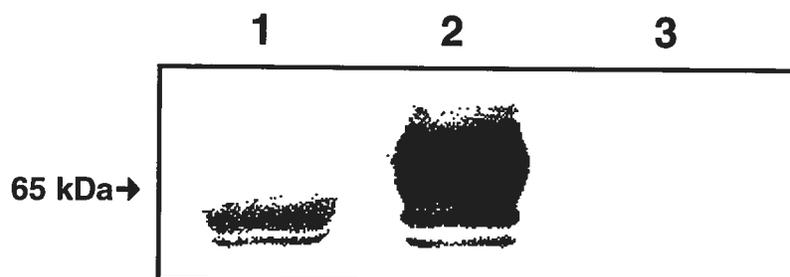


Figure 23 : Effet de l'EDTA et du DTT sur l'oxydation du groupement thiol de la cystéine du mutant T122C. La procédure pour le mutant T122C (1,2) et la Cry1Aa (3) est la même que celle décrite dans la légende de la Fig. 18 (p. 81). En 2, le mutant T122C a été activé en présence d'EDTA, puis purifié en présence de DTT.

5.4. Conclusion

En résumé, tous les agents chimiques thiol-spécifiques utilisés pour modifier les mutants de la Cry1Aa ont eu très peu d'effet sur le recouvrement de volume des vésicules. Ceci est causé par une oxydation du groupement thiol en acide sulfénique et ses dérivés, l'acide sulfinique et l'acide sulfonique. La première forme étant très instable, c'est sûrement sous les deux autres formes que se trouve le groupement thiol de chacun des mutants testés. Bien que l'ajout de DTT contribue à réduire le groupement sous une forme réactive, son oxydation en acides sulfinique et sulfonique est considérée comme une réaction irréversible. Toutefois, il a été possible d'augmenter considérablement le taux de réactivité des groupements thiol en préparant les mutants en présence d'EDTA et de DTT. Ainsi, plutôt que de tenter de restituer le groupement thiol sous sa forme réduite, il est clairement plus

avantageux de prévenir l'oxydation en réduisant, dans la mesure du possible, les facteurs favorisant la création d'oxyacides organosulfurés au cours des étapes de production des mutants. Ainsi, les tampons utilisés lors de la purification des mutants cystéine devraient obligatoirement contenir des substances chélatrices et réductrices. De cette façon, il sera possible d'employer des mutants ainsi que des agents modificateurs spécifiques aux cystéines pour approfondir encore davantage nos connaissances du mécanisme d'action des toxines et de la topologie des pores qu'elles forment.

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La substitution d'acides aminés par des résidus cystéine à l'intérieur de chacune des boucles interhélicales du domaine I de la toxine insecticide Cry1Aa du bacille de Thuringe avait pour principal objectif l'étude de la topologie des pores. En effet, l'introduction dans la toxine de résidus cystéine capables de réagir avec une variété de réactifs se liant spécifiquement au groupement thiol de la cystéine est un outil puissant pour identifier les régions qui s'insèrent lors de la perméabilisation de la membrane intestinale des insectes cibles.

Avant d'amorcer une telle analyse topologique, il était indispensable d'évaluer l'effet des mutations dans les boucles interhélicales du domaine I sur les propriétés de perméabilité de la Cry1Aa. À la lumière des résultats présentés dans le chapitre 4, l'ajout d'un résidu cystéine à presque tous les endroits mutés modifie le fonctionnement normal de la toxine. Tous les mutants ont été capables d'induire une perméabilité au KCl comparable à celle de la Cry1Aa à pH 7,5, à l'exception des mutants V150C, qui s'est avéré inactif, et W182C. Toutefois, des différences appréciables ont été mises en évidence dans la vitesse à laquelle les mutants forment des pores, ainsi que dans leur capacité à perméabiliser la membrane aux autres solutés testés. Ces résultats soulignent l'importance de ces zones de flexibilité dans le mécanisme d'action de la Cry1Aa, particulièrement pendant le réarrangement spatial de la toxine précédant son insertion. Les résultats ne permettent toutefois pas de déterminer précisément l'identité des hélices du domaine I qui traversent la membrane des vésicules et par conséquent, de favoriser un modèle d'insertion plutôt qu'un autre. De plus, des études de toxicité *in vivo* sur des insectes tel que le sphinx du tabac s'avèrent indispensables pour mieux corrélérer

les observations effectuées en gonflement osmotique et pour compléter la caractérisation des mutants.

L'acide aminé en position 150 semble jouer un rôle important dans le mécanisme de formation des pores, particulièrement pour la Cry1Aa, puisqu'une mutation du même acide aminé dans la Cry1Ac, V150D, s'est révélé parfaitement toxique pour le sphinx du tabac (Kumar et Aronson, 1999). D'autre part, le résidu cystéine introduit en position 150 a complètement aboli l'activité de la Cry1Aa. Il faudrait approfondir davantage cette question afin de déterminer quelle étape du mécanisme d'action de la toxine est touchée par cette mutation. Bien que la spécificité soit plutôt assurée par les domaines II et III, il n'est pas impossible que cette mutation nuise à la liaison de la toxine au récepteur, puisqu'il a déjà été démontré que le domaine I pouvait être impliqué dans ce processus de liaison réversible (Flores *et al.*, 1997; Rang *et al.*, 1999) (section 3.2.2., p. 33). Des expériences de gonflement osmotique avec des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac et dans lesquelles la Cry1Aa est mise en compétition avec une concentration dix fois plus élevée du mutant V150C sont présentement en cours dans le but de répondre, en partie, à cette question. Les résultats préliminaires de cette étude montrent toutefois qu'il y a un effet inhibiteur sur la capacité de la Cry1Aa à perméabiliser les vésicules en présence du mutant V150C, ce qui indique que la substitution de la valine en position 150 par un résidu cystéine n'empêche pas la liaison du mutant au récepteur membranaire.

Une fois les mutants caractérisés, nous avons procédé à la deuxième étape du projet, soit de vérifier l'accessibilité de tous les résidus mutés aux agents modificateurs spécifiques aux cystéines dans la forme soluble de la toxine. Les

résultats obtenus en gonflement osmotique ainsi qu'en analyse de type *western*, nous ont permis de conclure que les résidus mutés étaient très faiblement réactifs. Cette situation semble être provoquée par une oxydation du groupement thiol de la cystéine en acide sulfénique ou ses dérivés, l'acide sulfinique et l'acide sulfonique (Capozzi et Modena, 1974; Kice, 1980). L'acide sulfénique joue d'ailleurs un rôle dans le site actif de certaines enzymes participant à divers processus cellulaires tels que le métabolisme de l'oxygène, la transduction de signaux, la réponse au stress oxydatif et la régulation de la transcription (Claiborne *et al.*, 1999).

La faible réactivité du résidu cystéine nous a conduit à une interprétation différente des résultats obtenus en gonflement osmotique à pH 7,5 et 10,5. En plus des modifications des propriétés des pores enregistrés pour plusieurs mutants à pH 7,5, ces effets dépendent du pH, puisque la plupart des mutants ont vu leur capacité de perméabilisation altérée par l'augmentation du pH de 7,5 à 10,5. Toutefois, étant donné que le groupement thiol est oxydé en différentes formes d'acides cystéiques, lesquelles possèdent un pKa se situant entre 2,0 et 3,0 (Kice, 1980), le résidu cystéine est toujours chargé négativement, y compris à pH 7,5. Cela permet de conclure d'une part que les résultats obtenus à pH 7,5, tels que le ralentissement des cinétiques d'insertion membranaire, pourraient être dûs non seulement à l'ajout d'une cystéine, mais plus précisément à la présence d'un oxyacide organosulfuré. D'autre part, l'augmentation du pH de la solution tampon où baignent les vésicules augmente la proportion des charges négatives sur les molécules à la surface de la membrane, incluant possiblement les récepteurs membranaires, ce qui pourrait provoquer de la répulsion électrostatique avec les mutants chargés négativement et expliquer les effets plus marqués obtenus à pH 10,5.

Lorsque l'on désire exploiter la réactivité du groupement thiol de la cystéine à des fins d'études structuro-fonctionnelles, il s'avère indispensable de limiter, dans la mesure du possible, les facteurs qui favorisent ces réactions d'oxydation. Par exemple, l'alcalinité des solutions, la présence d'ions métalliques et d'oxygène moléculaire doivent être rigoureusement contrôlées, afin que le groupement thiol de la cystéine demeure réactif. Dans notre cas, la difficulté est exacerbée du fait que la Cry1Aa et les mutants doivent être purifiés dans un milieu alcalin. En effet, la valeur élevée du pH intestinal des insectes cibles est nécessaire à la solubilisation des protoxines du cristal par rupture des ponts disulfures qui maintiennent la protéine sous sa forme cristalline (Jaquet *et al.*, 1987; Bietlot *et al.*, 1990). Heureusement, nous avons réussi à contourner ces difficultés grâce à l'utilisation d'un chélateur d'ions métalliques (EDTA) et d'un agent réducteur (DTT). En effet, en ajoutant de l'EDTA et du DTT lors du protocole d'activation et de purification des toxines, nous avons constaté que les mutants réagissaient beaucoup mieux avec le maléimide de biotine qu'auparavant. Cette constatation va nous permettre de reprendre les expériences de cinétique de formation des pores, comme celles qui sont décrites dans le chapitre 5, mais en utilisant des mutants dont la modification chimique aura été correctement réalisée et vérifiée. Dans ce but, les mutants biotinylés seront purifiés par chromatographie sur colonne d'avidine avant d'être utilisés dans les expériences de gonflement osmotique. Il existe aussi un moyen efficace et rapide pour vérifier la réactivité du groupement thiol des résidus cystéine. Il s'agit d'utiliser un fluorophore dont l'émission de fluorescence augmente considérablement lorsqu'il réagit avec un groupement thiol. Par exemple, le MIANS et le N-(1-pyrène)maléimide ont été employés avec succès pour la caractérisation du site de liaison et de la structure tertiaire de la lactose perméase d'*Escherichia coli* (Jung *et al.*, 1993; Venkatesan et Kaback, 1998). Ainsi, par des mesures de

spectrofluorométrie, nous pourrions rapidement évaluer le niveau de réactivité des mutants avant d'amorcer les expériences de gonflement osmotique et de modifications chimiques.

Parmi les difficultés majeures rencontrées dans cette étude, il y a aussi le fait que le mutant I88C n'a pas pu être produit en quantités suffisantes pour la réalisation de toutes les expériences effectuées avec les autres mutants. La cause de ce problème est encore mal comprise, mais sa résolution permettrait de rendre le présent travail plus complet. Il serait même envisageable de contourner ce problème, si cela s'avérait nécessaire, en remplaçant I88C par un autre mutant dans lequel un autre résidu de la boucle $\alpha_2\alpha_3$ aura été remplacé par une cystéine.

Maintenant que la réactivité des mutants à des molécules spécifiques à la cystéine peut être exploitée, il serait intéressant de revenir à l'objectif premier qui était l'étude de la topologie des pores formés. Une stratégie très intéressante pour étudier la topologie du pore serait d'utiliser des agents modificateurs spécifiques aux résidus cystéine, perméants ou non-perméants (Fig. 24, p. 96). Par exemple, les mutants pourront être incubés avec des vésicules de la membrane en bordure en brosse du sphinx du tabac suffisamment longtemps pour qu'ils forment des pores. Le premier réactif thiol-spécifique, l'AMSD sera d'abord ajouté au mélange. Ce dernier devrait traverser difficilement la membrane des vésicules, ce qui implique qu'il se liera beaucoup plus efficacement aux cystéines situées du côté extravésiculaire de la membrane. On ajoutera ensuite le deuxième réactif spécifique aux cystéines, le maléimide de biotine, lequel traverse aisément la membrane des vésicules et pourra donc aussi bien lier les cystéines du côté extracellulaire que celles situées du côté intracellulaire. Les vésicules seront ensuite solubilisées avec

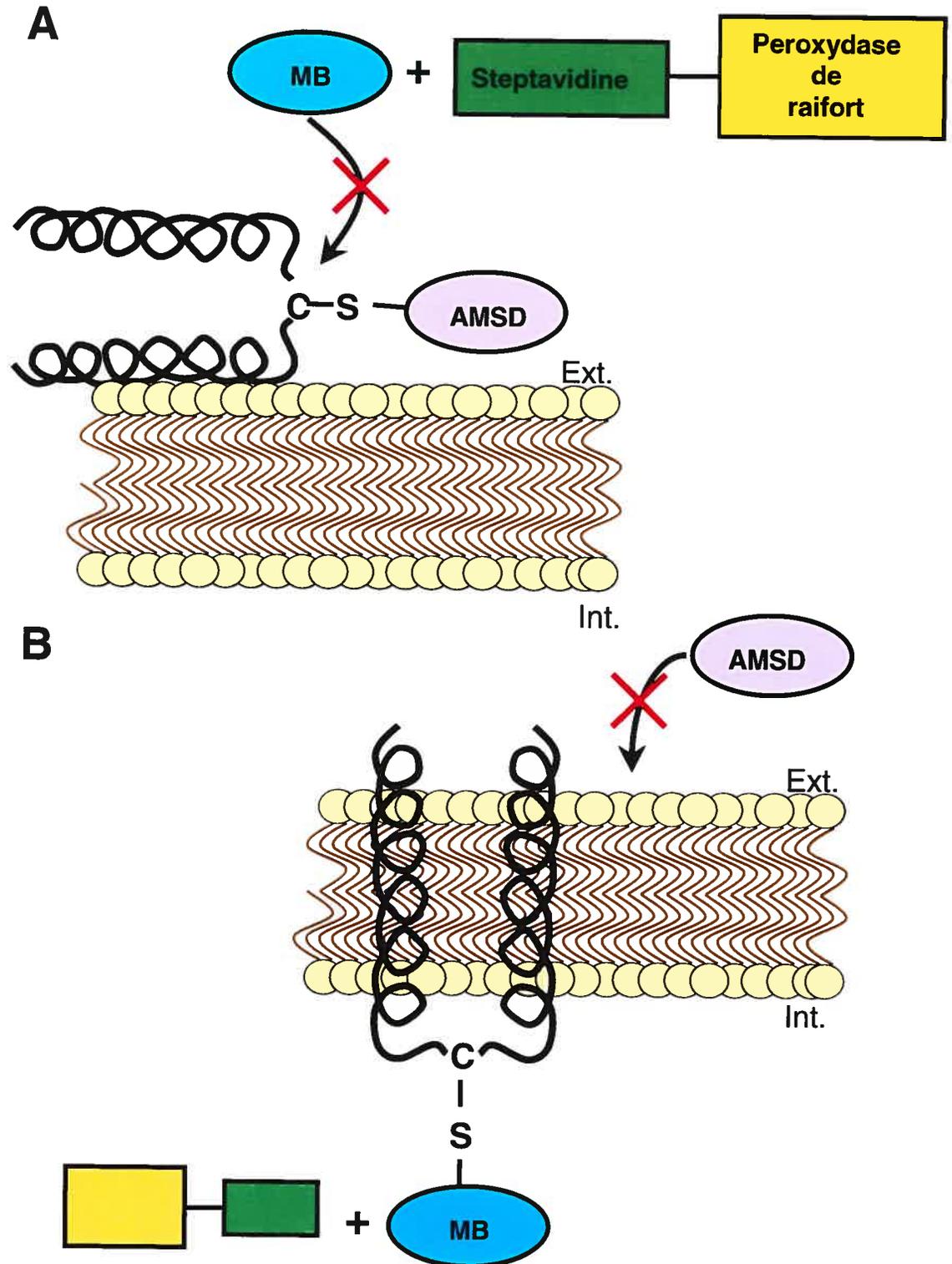


Figure 24 : Étude topologique des pores formés par la Cry1Aa par l'utilisation d'agents modificateurs spécifiques à la cystéine.

un détergent et l'ajout d'anticorps polyclonaux dirigés contre la Cry1Aa permettra de concentrer la toxine par immunoprécipitation de façon à éliminer les autres protéines de la membrane qui auraient pu être biotinyllées. Une analyse de type *western*, telle qu'effectuée dans les expériences décrites dans le chapitre 5, avec de la streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort, permettra de déterminer la position de chacune des boucles interhélicales une fois le pore formé. Effectivement, l'absence de bandes indiquera que les résidus sont situés du côté extravésiculaire de la membrane (Fig. 24A, p. 96), alors que la présence de bandes suggèrera que les résidus se trouvent plutôt du côté interne de la membrane (Fig. 24B, p. 96). Ainsi, l'emplacement des boucles, et par conséquent des hélices du domaine I, pourra être déterminé de façon précise. Ce type d'expériences permettrait sans contredit de faire la lumière sur la structure des pores, laquelle demeure toujours inconnue. Une expérience similaire s'est d'ailleurs avérée extrêmement révélatrice lors de l'étude de la topologie de la P-glycoprotéine humaine, puisqu'elle a permis de confirmer la présence de douze segments transmembranaires (Loo et Clarke, 1995).

Une autre technique expérimentale fort prometteuse pour étudier la topologie des pores serait l'immunocytochimie. En 1992, Bravo *et al.* avaient utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre quatre toxines insecticides, la Cry1Ab, la Cry1Ac, la Cry1B et la Cry3A, dans le but de visualiser les sites de liaison dans différentes régions de la membrane intestinale du sphinx du tabac, de la teigne des crucifères et du doryphore de la pomme de terre. Nous pourrions aller plus loin en fabriquant des anticorps dirigés contre la séquence peptidique de chacune des boucles interhélicales du domaine I de la Cry1Aa et les ajouter à une préparation de vésicules ou de tissu intestinal préalablement traitées avec la toxine. Ainsi, la taille

et la nature hautement hydrophile des anticorps empêcheraient leur passage vers l'intérieur des vésicules ou des cellules et par conséquent, la détection d'un signal par microscopie à fluorescence suggèrera que la boucle se trouve à la surface externe des vésicules, alors qu'une absence de signal laissera plutôt supposer un emplacement intracellulaire.

Il est clair qu'une telle démarche fournirait de précieuses données quant à l'architecture finale des pores formés par la toxine insecticide Cry1Aa du bacille de Thuringe. Bien que plusieurs modèles aient été proposés jusqu'à ce jour, aucun n'a encore fait l'unanimité et c'est pourquoi il s'avère capital de poursuivre l'investigation de manière à détailler finement le mécanisme de formation des pores, particulièrement en ce qui a trait à l'étape d'insertion membranaire.

7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Rauf, M. et D. J. Ellar.** 1999. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Curr. Microbiol.* **39**:94-98.
- Ahmad, W. et D. J. Ellar.** 1990. Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:97-104.
- Akai, H.** 1969. Ultrastructural localization of phosphatases in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **15**:1623-1628.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson.** 1995. Adhérence intercellulaire. *Biologie moléculaire de la cellule*, pp. 963-970, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris.
- Allison, W. S.** 1976. Formation and reactions of sulfenic acids in proteins. *Acc. Chem. Res.* **9**:293-299.
- Anderson, E. et W. R. Harvey.** 1966. Active transport by the *Cecropia* midgut. II. Fine structure of the midgut epithelium. *J. Cell Biol.* **31**:107-134.
- Angsuthanasombat, C., N. Crickmore et D. J. Ellar.** 1993. Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB δ -endotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**:255-262.
- Aronson, A.** 2002. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:417-425.
- Aronson, A. I., C. Geng et L. Wu.** 1999. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2503-2507.
- Aronson, A. I. et Y. Shai.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:1-8.
- Audtho, M., A. P. Valaitis, O. Alzate et D. H. Dean.** 1999. Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -endotoxin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4601-4605.
- Azuma, M., W. R. Harvey et H. Wieczorek.** 1995. Stoichiometry of K^+/H^+ antiport helps to explain extracellular pH 11 in a model epithelium. *FEBS Lett.* **361**:153-156.

- Ballester, V., F. Granero, R. A. de Maagd, D. Bosch, J. L. Ménsua et J. Ferré.** 1999. Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the Diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1900-1903.
- Barror, D. J. et R. E. White.** 1999. *Les insectes de l'Amérique du Nord (au nord du Mexique)*. Les guides Peterson, Éditions Broquet, Boucherville, Québec, 408 pages.
- Barton, K. A., H. R. Whiteley et N.-S. Yang.** 1987. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.* **85**:1103-1109.
- Beegle, C. C. et T. Yamamoto.** 1992. History of *Bacillus thuringiensis* berliner research and development. *Can. Ent.* **124**:587-616.
- Benson, E. L., P. D. Huynh, A. Finkelstein et R. J. Collier.** 1998. Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. *Biochemistry* **37**:3941-3948.
- Berliner, E.** 1911. Über die schlaffsucht der mehlmotenraupe. *Z. Gesante Getreidewesen.* **3**:63-70.
- Bernstein, I. L., J. A. Bernstein, M. Miller, S. Tierzieva, D. I. Bernstein, Z. Lummus, M. K. Selgrade, D. L. Doerfler et V. L. Seligy.** 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**:575-582.
- Betz, F. S., B. G. Hammond et R. L. Fuchs.** 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **32**:156-173.
- Bietlot, H. P. L., I. Vishnubhatla, P. R. Carey, M. Pozsgay et H. Kaplan.** 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**:309-315.
- Blankemeyer, J. T. et W. R. Harvey.** 1978. Identification of transporting cell in potassium transporting epithelium. *J. Exp. Biol.* **77**:1-13.
- Bone, L. W., K. P. Bottjer et S. S. Gill.** 1988. Factors affecting the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *J. Invertebr. Pathol.* **52**:102-107.

- Borror, D. J., C. A. Triplehorn et N. F. Johnson.** 1992. *An Introduction to the Study of Insects*, Saunders College Publishing, Fort Worth, 875 pages.
- Bosch, D., B. Schipper, H. van der Kleij, R. A. de Maagd et W. J. Stiekema.** 1994. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology* **12**:915-918.
- Bravo, A., S. Jansens et M. Peferoen.** 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:237-246.
- Bucchini, L. et L. R. Goldman.** 2002. Starlink corn: a risk analysis. *Environ. Health Perspect.* **110**:5-13.
- Bulla, L. A. Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson et P. C. Fitz-James.** 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **8**:147-204.
- Burton, S. L., D. J. Ellar, J. Li et D. J. Derbyshire.** 1999. *N*-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* **287**:1011-1022.
- Cabiaux, V., C. Wolff et J.-M. Ruyschaert.** 1997. Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence. *Int. J. Biol. Macromol.* **21**:285-298.
- Capozzi, G. et G. Modena.** 1974. Oxidation of thiols. *The Chemistry of the Thiol Group, Part 2* (S. Patai, ed), pp. 785-841, John Wiley & Sons, London.
- Carlson, C. R., D. A. Caugant et A.-B. Kolstø.** 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1719-1725.
- Carroll, J. et D. J. Ellar.** 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action in insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771-778.
- Carroll, J. et D. J. Ellar.** 1997. Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **245**:797-804.
- Charles, J.-F. et C. Nielsen-LeRoux.** 1996. Les bactéries entomopathogènes: mode d'action sur les larves de moustiques et phénomène de résistance. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités* **7**:233-246.

- Chaufaux, J., M. Marchal, N. Gilois, I. Jehanno et C. Buisson.** 1997. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. *Can. J. Microbiol.* **43**:337-343.
- Chen, X. J., A. Curtiss, E. Alcantara et D. H. Dean.** 1995. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**:6412-6419.
- Chen, X. J., M. K. Lee et D. H. Dean.** 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9041-9045.
- Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor et H. Kaplan.** 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**:523-527.
- Choma, C. T., W. K. Surewicz et H. Kaplan.** 1991. The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**:933-938.
- 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.
- Cioffi, M.** 1984. Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. *Am. Zool.* **24**:139-156.
- Claiborne, A., J. I. Yeh, T. C. Mallett, J. Luba, E. J. Crane III, V. Charrier et D. Parsonage.** 1999. Protein-sulfenic acids: Diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* **38**:15407-15416.
- Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade et R. Frutos.** 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**:35546-35551.
- Crawford, D. N. et W. R. Harvey.** 1988. Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **137**:277-286.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum et D. H. Dean.** 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:807-813.

- Crickmore, N., D. R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo et D. H. Dean.** 2003. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
- Cummings, C. E., G. Armstrong, T. C. Hodgman et D. J. Ellar.** 1994. Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* **11**:87-92.
- Damgaard, P. H., P. E. Granum, J. Bresciani, M. V. Torregrossa, J. Eilenberg et L. Valentino.** 1997. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**:47-53.
- Daniel, A., D. H. Dean et M. J. Adang.** 2001. Analyses of the pore forming ability of *Bacillus thuringiensis* Cry1A mutant toxins using a light-scattering technique. *Pestic. Biochem. Physiol.* **70**:7-18.
- Darboux, I., Y. Pauchet, C. Castella, M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, J.-F. Charles et D. Pauron.** 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5830-5835.
- Darriet, F.** 1998. *La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies*. Éditions Karthala-Orstom, Paris, 114 pages.
- Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S.-J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara et S. R. Hussain.** 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – a minireview. *Gene* **179**:111-117.
- de Barjac, H., M. Sebald, J.-F. Charles, W. H. Cheong et L. H. Lee.** 1990. *Clostridium bifermentans* sérovar *malaysia*, une nouvelle bactérie anaérobie pathogène des larves de moustiques et de simules. *C. R. Acad. Sci. III* **310**:383-387.
- Delannay, X., B. J. Lavallée, R. K. Proksch, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, P. M. Marrone, R. B. Dobson, J. J. Augustine, J. G. Layton et D. A. Fischhoff.** 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology* **7**:1265-1269.
- de Maagd, R. A., P. L. Bakker, L. Masson, M. J. Adang, S. Sangadala, W. Stiekema et D. Bosch.** 1999a. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-

- endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **31**:463-471.
- de Maagd, R. A., P. Bakker, N. Staykov, S. Dukiandjiev, W. Stiekema et D. Bosch.** 1999b. Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4369-4374.
- de Maagd, R. A., D. Bosch et W. Stiekema.** 1999c. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **4**:9-13.
- de Maagd, R. A., M. S. G. Kwa, H. van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema et D. Bosch.** 1996a. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1537-1543.
- de Maagd, R. A., H. van der Klei, P. L. Bakker, W. J. Stiekema et D. Bosch.** 1996b. Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane protein in ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2753-2757.
- de Maagd, R. A., M. Weemen-Hendriks, W. Stiekema et D. Bosch.** 2000. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1559-1563.
- Deng, W. P. et J. A. Nickoloff.** 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**:81-88.
- Denolf, P., K. Hendrickx, J. Van Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele et J. Van Rie.** 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **248**:748-761.
- 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.** 1992. pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**:355-375.
- Dow, J. A. T., B. L. Gupta, T. A. Hall et W. R. Harvey.** 1984. X-ray microanalysis of elements in frozen-hydrated sections of an electrogenic K⁺ transport system: the

- posterior midgut of tobacco hornworm (*Manduca sexta*) *in vivo* and *in vitro*. *J. Membr. Biol.* **77**:223-241.
- Dow, J. A. T. et W. R. Harvey.** 1988. Role of midgut electrogenic K⁺ pump potential difference in regulating lumen K⁺ and pH in larval lepidoptera. *J. Exp. Biol.* **140**:455-463.
- Dow, J. A. T. et J. M. Peacock.** 1989. Microelectrode evidence for the electrical isolation of goblet cell cavities in *Manduca sexta* middle midgut. *J. Exp. Biol.* **143**:101-114.
- Drobniewski, F. A.** 1994. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:101-109.
- Dulmage, H. T.** 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate from *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**:232-239.
- Endo, Y. et J. Nishiitsutsuji-Uwo.** 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. *J. Invertebr. Pathol.* **36**:90-103.
- Engelman, D. M. et T. A. Steitz.** 1981. The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell* **23**:411-422.
- English, L., et S. L. Slatin.** 1992. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**:1-7.
- Escrache, B., B. Tabashnik, N. Finson et J. Ferre.** 1995. Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**:388-395.
- Federici, B. A.** 1995. The future of microbial insecticides as vector control agents. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **11**:260-268.
- Feitelson, J. S., J. Payne et L. Kim.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**:271-275.
- Feng, Q. et W. J. Becktel.** 1994. pH-induced conformational transitions of CryIA(a), CryIA(c), and CryIIIA δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry* **33**:8521-8526.
- Ferré, J., B. Escrache, Y. Bel et J. Van Rie.** 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:1-7.

- Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers et R. T. Fraley.** 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* **5**:807-813.
- Fiuza, L.-M., C. Nielsen-Leroux, E. Gozé, R. Frutos et J.-F. Charles.** 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1544-1549.
- Flores, H., X. Soberón, J. Sánchez et A. Bravo.** 1997. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* **414**:313-318.
- Flower, N. E. et B. K. Filshie.** 1976. Goblet cell membrane differentiations in the midgut of a lepidopteran larva. *J. Cell Sci.* **20**:357-375.
- Fluharty, A. L.** 1974. Biochemistry of the thiol group. *The Chemistry of the Thiol Group, Part 2* (S. Patai, ed), pp. 589-668, John Wiley & Sons, London.
- Franken, E., L. Potvin, J.-L. Schwartz et W. Schnetter.** 1996. Activation of the CryIIIa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*: a comparative analysis. *20th Int. Congr. Entomol.*, Firenze, Italie, p. 163.
- Frutos, R., C. Rang et M. Royer.** 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**:227-276.
- Fujimoto, H., K. Itoh, M. Yamamoto, J. Kyojuka et K. Shimamoto.** 1993. Insect-resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* **11**:1151-1155.
- Gahan, L. J., F. Gould et D. G. Heckel.** 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* **293**:857-860.
- Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn et L. English.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst.* **57D**:1101-1109.
- García-Robles, I., J. Sánchez, A. Gruppe, A. C. Martínez-Ramírez, C. Rausell, M. D. Real et A. Bravo.** 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:849-856.
- Garczynski, S. F. et M. J. Adang.** 2000. Investigation of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin receptor structure and function. *Entomopathogenic Bacteria: From*

- Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-Leroux, eds), pp. 181-197, Kluwer Associate Publishing, Norwell, MA.
- Garner, K. J., S. Hiremath, K. Lehtoma et A. P. Valaitis.** 1999. Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**:527-535.
- Gazit, E., D. Bach, I. D. Kerr, M. S. P. Sansom, N. Chejanovsky et Y. Shai.** 1994. The α -5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* **304**:895-902.
- Gazit, E., P. La Rocca, M. S. P. Sansom et Y. Shai.** 1998. The structure and organization within the membrane of helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12289-12294.
- Gazit, E. et Y. Shai.** 1993. Structural and functional characterization of the α 5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry* **32**:3429-3436.
- Gazit, E. et Y. Shai.** 1995. The assembly and organization of the α 5 and α 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Relevance to a functional model. *J. Biol. Chem.* **270**:2571-2578.
- Ge, A. Z., D. Rivers, R. Milne et D. H. Dean.** 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* **266**:17954-17958.
- Ge, A. Z., N. I. Shivarova et D. H. Dean.** 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4037-4041.
- Georghiou, G. P.** 1988. Implications of potential resistance to biopesticides. *Biotechnology, Biological Pesticides and Novel Plant-pest Resistance for Insect Pest Management* (D. W. Roberts et R. R. Granados, eds), pp. 137-145, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, NY.
- Georghiou, G. P.** 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* **75**:51-59.
- Georghiou, G. P. et M. C. Wirth.** 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of

- resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1095-1101.
- Gerber, D. et Y. Shai.** 2000. Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**:23602-23607.
- Gill, S. S., E. A. Cowles et V. Francis.** 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **270**:27277-27282.
- Gill, S. S., E. A. Cowles et P. V. Pietrantonio.** 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* **37**:615-636.
- Giordana, B., V. F. Sacchi, P. Parenti et G. M. Hanozet.** 1989. Amino acid transport systems in intestinal brush-border membranes from lepidopteran larvae. *Am. J. Physiol.* **257**:R494-R500.
- Goldberg, L. J. et J. Margalit.** 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.
- González, J. M. Jr., B. J. Brown et B. C. Carlton.** 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:6951-6955.
- Gould, F., A. Martinez-Ramirez, A. Anderson, J. Ferré, F. J. Silva et W. J. Moar.** 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:7986-7990.
- Green, M., M. Heumann, R. Sokolow, L. R. Foster, R. Bryant et M. Skeels.** 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-1986. *Am. J. Public Health* **80**:848-852.
- Gringorten, J. L.** 2001. Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical sites of insecticide action and resistance* (Isaac Ishaaya, ed), pp.167-207, Springer Verlag, Berlin.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau et M. Cygler.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447-464.
- Güereca, L. et A. Bravo.** 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**:342-350.

- Guillet, P., D. C. Kurtak, B. Philippon et R. Meyer.** 1990. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for onchocerciasis control in West Africa. *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies* (H. de Barjac et D. Sutherland, eds), pp. 187-201, Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.
- Gupta, B. L., J. A. T. Dow, T. A. Hall et W. R. Harvey.** 1985. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. *J. Cell Sci.* **74**:137-152.
- Hanney, C. L.** 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature* **172**:1004.
- Harvey, W. R., M. Cioffi et M. G. Wolfersberger.** 1983. Chemiosmotic potassium ion pump of insect epithelia. *Am. J. Physiol.* **244**:R163-R175.
- Harvey, W. R. et S. Nedergaard.** 1964. Sodium-independent active transport of potassium in the isolated midgut of the cecropia silkworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**:757-765.
- Helgason, E., O. A. Økstad, D. A. Caugant, H. A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna et A.-B. Kolstø.** 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2627-2630.
- Hendrickx, K., A. De Loof et H. Van Mellaert.** 1990. Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**:241-245.
- Hernandez, E., F. Ramisse, J.-P. Ducoureau, T. Cruel et J.-D. Cavallo.** 1998. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2138-2139.
- Hodgman, T. C. et D. J. Ellar.** 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Sequence* **1**:97-106.
- Hofmann, C. et P. Lüthy.** 1986. Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin to invertebrate cells. *Arch. Microbiol.* **146**:7-11.

- Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hütter et V. Pliska.** 1988a. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**:85-91.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens et H. Van Mellaert.** 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -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. et H. R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242-255.
- Honée, G., D. Convents, J. Van Rie, S. Jansens, M. Peferoen et B. Visser.** 1991. The C-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. *Mol. Microbiol.* **5**:2799-2806.
- Hougard, J.-M. et C. Back.** 1992. Perspectives on the bacterial control of vectors in the tropics. *Parasitol. Today* **8**:364-366.
- Hua, G., K. Tsukamoto, M.-L. Rasilo et H. Ikezawa.** 1998. Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. *Gene* **214**:177-185.
- Ihara, H., E. Kuroda, A. Wadano et M. Himeno.** 1993. Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**:200-204.
- Ishiwata, S.** 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kailho* **9**:1-5.
- Jaquet, F., R. Hütter et P. Lüthy.** 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:500-504.
- Jellis, C., D. Bassand, N. Beerman, C. Dennis, K. Farrell, J.C. Piot, J. Rusche, H. Carson et D. Witt.** 1989. Molecular biology of *Bacillus thuringiensis* and potential benefits to agriculture. *Israel J. Entomol.* **23**:189-199.
- Jenkins, J. L., M. K. Lee, S. Sangadala, M. J. Adang et D. H. Dean.** 1999. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. *FEBS Lett.* **462**:373-376.
- Jenkins, J. L., M. K. Lee, A. P. Valaitis, A. Curtiss et D. H. Dean.** 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* **275**:14423-14431.

- Jensen, G. B., P. Larsen, B. L. Jacobsen, B. Madsen, A. Wilcks, L. Smidt et L. Andrup.** 2002. Isolation and characterization of *Bacillus cereus*-like bacteria from faecal samples from greenhouse workers who are using *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **75**:191-196.
- Juárez-Pérez, V. et A. Delécluse.** 2001. The Cry toxins and the putative hemolysins of *Clostridium bifermentans* ser. *malaysia* are not involved in mosquitocidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* **78**:57-58.
- Jung, K., H. Jung, J. Wu, G. G. Privé et H. R. Kaback.** 1993. Use of site-directed fluorescence labeling to study proximity relationships in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**:12273-12278.
- Kaelin, P., P. Morel et F. Gadani.** 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:19-25.
- Kellen, W. R. et C. M. Meyers.** 1964. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Proc. Calif. Mosq. Control Assoc.* 32-37.
- Kice, J. L.** 1980. Mechanisms and reactivity in reactions of organic oxyacids of sulfur and their anhydrides. *Adv. Phys. Org. Chem.* **17**:65-181.
- Kim, H.-S., S. Yamashita, T. Akao, H. Saitoh, K. Higuchi, Y. S. Park, E. Mizuki et M. Ohba.** 2000. *In vitro* cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **89**:16-23.
- Kinsinger, R. A. et W. H. McGaughey.** 1979. Susceptibility of populations of indianmeal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **72**:346-349.
- Kirouac, M., V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz et R. Laprade.** 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171-179.
- Knight, P. J. K., N. Crickmore et D. J. Ellar.** 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.
- Knight, P. J. K., B. H. Knowles et D. J. Ellar.** 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. Biol. Chem.* **270**:17765-17770.

- Knowles, B. H.** 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275-308.
- Knowles, B. H. et J. A. T. Dow.** 1993. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* **15**:469-476.
- Knowles, B. H. et D. J. Ellar.** 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**:509-518.
- Krieg, A., A. M. Huger, G. A. Langenbruch et W. Schnetter.** 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber Larven von coleopteran wirksamer Pathotyp. *Z. Angew. Entomol.* **96**:500-508.
- Krittanai, C., P. Lungchukiet, S. Ruangweidee, T. Tuntitippawan, S. Panyim, G. Katzenmeier et C. Angsuthanasombat.** 2001. Redesign of an interhelical loop of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B delta-endotoxin for proteolytic cleavage. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**:150-155.
- Kumar, A. S. M. et A. I. Aronson.** 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181**:6103-6107.
- Kurtak, D., C. Back, A. Chalifour, J. Doannio, J. Dossou-Yovo, J. Duval, P. Guillet, R. Meyer, M. Ocran et B. Wahle.** 1989. Impact of *Bti* in black-fly control in the onchocerciasis control programme in West Africa. *Israel J. Entomol.* **23**:21-38.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lakey, J. H., D. Baty et F. Pattus.** 1991. Fluorescence energy transfer distance measurements using site-directed single cysteine mutants. The membrane insertion of colicin A. *J. Mol. Biol.* **218**:639-653.
- Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet et M. Peferoen.** 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:80-86.
- Lane, N. J., J. B. Harrison et W. M. Lee.** 1989. Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial δ -endotoxin. *J. Cell Sci.* **93**:337-347.

- Lane, N. J. et H. L. Skaer. 1980. Intercellular junctions in insect tissues. *Adv. Insect Physiol.* **15**:35-213.
- Lecadet, M.-M. 1996. La lutte bactériologique contre les insectes : une vieille histoire, très actuelle. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités* **7**:207-216.
- Lecadet, M.-M. et D. Martouret. 1965. The enzymatic hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Berliner crystals and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the chyle of *Pieris brassicae* (Linnaeus). *J. Invertebr. Pathol.* **7**:105-108.
- Lee, H. L. et P. Seleena. 1990. Isolation and evaluation of larvicidal *Clostridium bifermentans* against mosquitoes of public health importance. *Trop. Biomed.* **7**:103-106.
- Lee, M. K., A. Curtiss, E. Alcantara et D. H. Dean. 1996a. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:583-586.
- Lee, M. K. et D. H. Dean. 1996. Inconsistencies in determining *Bacillus thuringiensis* toxin binding sites relationship by comparing competition assays with ligand blotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**:575-580.
- Lee, M. K., J. L. Jenkins, T. H. You, A. Curtiss, J. J. Son, M. J. Adang et D. H. Dean. 2001. Mutations at the arginine residues in $\alpha 8$ loop of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Lett.* **497**:108-112.
- Lee, M. K., F. Rajamohan, J. L. Jenkins, A. S. Curtiss et D. H. Dean. 2000. Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **38**:289-298.
- Lee, M. K., T. H. You, A. Curtiss et D. H. Dean. 1996b. Involvement of two amino acid residues in the loop region of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in toxicity and binding to *Lymantria dispar*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**:139-146.
- Lee, M. K., B. A. Young et D. H. Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**:306-312.
- Lesieur, C., B. Vécsey-Semjén, L. Abrami, M. Fivaz et F. G. van der Goot. 1997. Membrane insertion: the strategies of toxins. *Mol. Membr. Biol.* **14**:45-64.

- Li, J.** 1996. Insecticidal δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Protein Toxin Structure* (M. W. Parker, ed.), pp. 49-77, R. G. Landes, Georgetown, TX.
- Li, J., J. Carroll et D. J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815-821.
- Li, J., D. J. Derbyshire, B. Promdonkoy et D. J. Ellar.** 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571-577.
- Li, J., P. A. Koni et D. J. Ellar.** 1996. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* **257**:129-152.
- Liang, Y., S. S. Patel et D. H. Dean.** 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**:24719-24724.
- Loewenstein, W. R.** 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* **61**:829-913.
- Loo, T. W. et D. M. Clarke.** 1995. Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**:843-848.
- Lorence, A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero et A. Bravo.** 1995. δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**:217-222.
- Loseva, O. I., E. I. Tiktopulo, V. D. Vasiliev, A. D. Nikulin, A. P. Dobritsa et S. A. Potekhin.** 2001. Structure of Cry3A δ -endotoxin within phospholipid membranes. *Biochemistry* **40**:14143-14151.
- Lu, H., F. Rajamohan et D. H. Dean.** 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* **176**:5554-5559.
- Luo, K., Y.-J. Lu et M. J. Adang.** 1996. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:783-791.
- Luo, K., J. R. McLachlin, M. R. Brown et M. J. Adang.** 1999. Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. *Protein Exp. Purif.* **17**:113-122.
- Luo, K., S. Sangadala, L. Masson, A. Mazza, R. Brousseau et M. J. Adang.** 1997a. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor

- A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**:735-743.
- Luo, K., B. E. Tabashnik et M. J. Adang.** 1997b. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1024-1027.
- Martin, F. G. et M. G. Wolfersberger.** 1995. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *J. Exp. Biol.* **198**:91-96.
- Martin, P. A. W. et R. S. Travers.** 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2437-2442.
- Masson, L., Y.-J. Lu, A. Mazza, R. Brousseau et M. J. Adang.** 1995a. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* **270**:20309-20315.
- Masson, L., A. Mazza, R. Brousseau et B. Tabashnik.** 1995b. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush-border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Biol. Chem.* **270**:11887-11896.
- Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas et R. Brousseau.** 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851-860.
- Masson, L., A. Mazza, S. Sangadala, M. J. Adang et R. Brousseau.** 2002a. Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**:266-275.
- Masson, L., G. Préfontaine, G. Péloquin, P. C. K. Lau et R. Brousseau.** 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* **269**:507-512.
- Masson, L., B. E. Tabashnik, Y.-B. Liu, R. Brousseau et J.-L. Schwartz.** 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996-32000.
- Masson, L., B. E. Tabashnik, A. Mazza, G. Préfontaine, L. Potvin, R. Brousseau et J.-L. Schwartz.** 2002b. Mutagenic analysis of a conserved region of domain

- III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:194-200.
- McClintock, J. T., C. R. Schaffer et R. D. Sjoblad.** 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* **45**:95-105.
- McGaughey, W. H.** 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**:193-195.
- Meher, S. M., S. L. Bodhankar, Arunkumar, J. N. Dhuley et D. J. Khodape.** 2002. Toxicity studies of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae* in rats, rabbits, and fish. *Int. J. Toxicol.* **21**:99-105.
- Mizuki, E., M. Ohba, T. Akao, S. Yamashita, H. Saitoh et Y. S. Park.** 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **86**:477-486.
- Moar, W. J., M. Pusztai-Carey, H. Van Faassen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo et M. J. Adang.** 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2086-2092.
- Moffett, D. F., R. L. Hudson, S. B. Moffett et R. L. Ridgway.** 1982. Intracellular K⁺ activities and cell membrane potentials in a K⁺-transporting epithelium, the midgut of tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *J. Membr. Biol.* **70**:59-68.
- Moffett, D. F. et A. R. Koch.** 1985. Barium modifies the concentration dependence of active potassium transport by insect midgut. *J. Membr. Biol.* **86**:89-97.
- Moffett, D. F. et A. R. Koch.** 1988. Electrophysiology of K⁺ transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae. II. The transapical electrochemical gradients. *J. Exp. Biol.* **135**:39-49.
- Moffett, D. F. et A. Koch.** 1992. The insect goblet cell: a problem in functional architecture. *News Physiol. Sci.* **7**:19-23.
- Mohammed, S. I., D. E. Johnson et A. I. Aronson.** 1996. Altered binding of the Cry1Ac toxin to larval membranes but not to the toxin-binding protein in *Plodia interpunctella* selected for resistance to different *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4168-4173.
- Morse, R. J., T. Yamamoto et R. M. Stroud.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409-417.

- Myers, J. H., A. Savoie et E. van Randen.** 1998. Eradication and pest management. *Annu. Rev. Entomol.* **43**:471-491.
- Nagamatsu, Y., T. Koike, K. Sasaki, A. Yoshimoto et Y. Furukawa.** 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* **460**:385-390.
- Nishimoto, T., H. Yoshisue, K. Ihara, H. Sakai et T. Komano.** 1994. Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEBS Lett.* **348**:249-254.
- Noble, M. A., P. D. Riben et G. J. Cook.** 1992. Microbiological and epidemiological surveillance programme to monitor the health effects of Foray 48B BTK spray. Departments of Pathology and Health Care and Epidemiology. University of British Columbia and University Hospital, Vancouver, Canada.
- Nuñez-Valdez, M.-E., J. Sánchez, L. Lina, L. Güereca et A. Bravo.** 2001. Structural and functional studies of α -helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**:122-131.
- Obukowicz, M. G., F. J. Perlak, K. Kuzano-Kretzmer, E. J. Mayer et L. S. Watrud.** 1986. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing strains of pseudomonads using Tn5. *Gene* **45**:327-331.
- Oddou, P., H. Hartmann, F. Radecke et M. Geiser.** 1993. Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) δ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.* **212**:145-150.
- Oppert, B., K. J. Kramer, R. W. Beeman, D. Johnson et W. H. McGaughey.** 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* **272**:23473-23476.
- Oppert, B., K. J. Kramer, D. E. Johnson, S. C. MacIntosh et W. H. McGaughey.** 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**:940-947.
- Oppert, B., K. J. Kramer, D. Johnson, S. J. Upton et W. H. McGaughey.** 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**:571-583.

- Organisation mondiale de la santé.** 1999. Environmental health criteria 217 – *Bacillus thuringiensis*. Programme des Nations Unis pour l'environnement. 80 pages.
- Parenti, P., M. Villa, M. Tasca, P. Belgiojoso, G. M. Hanozet et B. Giordana.** 1993. A rapid and sensitive *in vitro* assay for the activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Comp. Biochem. Physiol.* **104B**:375-379.
- Parker, M. W. et F. Pattus.** 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* **18**:391-395.
- Parker, M. W., F. Pattus, A. D. Tucker et D. Tsernoglou.** 1989. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* **337**:93-96.
- Pearce, M., B. Habbick, J. Williams, M. Eastman et M. Newman.** 2002. The effects of aerial spraying with *Bacillus thuringiensis kurstaki* on children with asthma. *Can. J. Public Health* **93**:21-25.
- Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Simson, J. T. Greenplate et D. A. Fischhoff.** 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* **8**:939-943.
- Petras, S. F. et L. E. Casida, Jr.** 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1496-1501.
- Peyronnet, O., B. Nieman, F. Génèreux, V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz.** 2002. Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**:113-122.
- Peyronnet, O., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade.** 2001. Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* **184**:45-54.
- Pietrantonio, P. V. et S. S. Gill.** 1996. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. *Biology of the Insect Midgut* (M. J. Lehane et P. F. Billingsley, eds.), pp. 345-372, Chapman & Hall, London.
- Potvin, L., R. Laprade et J.-L. Schwartz.** 1998. Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores of Cf1 cells (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera). *J. Exp. Biol.* **201**:1851-1858.

- Pozsgay, M., P. Fast, H. Kaplan et P. R. Carey.** 1987. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: a Raman spectroscopic study. *J. Invertebr. Pathol.* **50**:246-253.
- Prasad, S.S.S.V. et Y. I. Shethna.** 1976. Antitumor immunity against Yoshida ascites sarcoma after treatment with the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Indian J. Exp. Biol.* **14**:285-290.
- Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard et P. R. Carey.** 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* **273**:43-47.
- Racapé, J., D. Granger, J.-F. Noulin, V. Vachon, C. Rang, R. Frutos, J.-L. Schwartz et R. Laprade.** 1997. Properties of the pores formed by parental and chimeric *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in planar lipid bilayer membranes. *Biophys. J.* **72**:A82.
- Rajamohan, F., E. Alcantara, M. K. Lee, X. J. Chen, A. Curtiss et D. H. Dean.** 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177**:2276-2282.
- Rajamohan, F., O. Alzate, J. A. Cotrill, A. Curtiss et D. H. Dean.** 1996a. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -entotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14338-14343.
- Rajamohan, F., J. A. Cotrill, F. Gould et D. H. Dean.** 1996b. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **271**:2390-2396.
- Rajamohan, F., S.-R. A. Hussain, J. A. Cotrill, F. Gould et D. H. Dean.** 1996c. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb δ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* **271**:25220-25226.
- Rajamohan, F., M. K. Lee et D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **60**:1-27.
- Rang, C., V. Vachon, F. Coux, C. Carret, W. J. Moar, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos.** 2001. Exchange of domain I from *Bacillus*

- thuringiensis* Cry1 toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Curr. Microbiol.* **43**:1-6.
- Rang, C., V. Vachon, R. A. de Maagd, M. Villalon, J.-L. Schwartz, D. Bosch, R. Frutos et R. Laprade.** 1999. Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2918-2925.
- Rawn, J. D.** 1989. *Biochemistry*, pp. 58-59. Neil Patterson Publishers, Burlington, NC.
- Rodrigues, I. B., W. P. Tadei et J. M. C. S. Dias.** 1998. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**:441-444.
- Rukmini, V., C. Y. Reddy et G. Venkateswerlu.** 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**:109-116.
- Sacchi, V. F., P. Parenti, G. M. Hanozet, B. Giordana, P. Lüthy et M. G. Wolfersberger.** 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.* **204**:213-218.
- Salamitou, S., M. Marchal et D. Lereclus.** 1996. *Bacillus thuringiensis* : un pathogène facultatif. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités* **7**:285-296.
- Sanchis, V., J. Chaufaux et D. Lereclus.** 1996. Amélioration biotechnologique de *Bacillus thuringiensis* : les enjeux et les risques. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités* **7**:271-284.
- Sanchis, V., M. Gohar, J. Chaufaux, O. Arantes, A. Meier, H. Agaisse, J. Cayley et D. Lereclus.** 1999. Development and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater potency and UV resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4032-4039.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English et M. J. Adang.** 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**:10088-10092.
- Sanger, F., S. Nicklen et A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.

- Saxena, D., E. Ben-Dov, R. Manasherob, Z. Barak, S. Boussiba et A. Zaritsky.** 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. *Curr. Microbiol.* **44**:25-30.
- Schirmanns, K. et W. Zeiske.** 1994. K⁺ channel permeation and block in the midgut epithelium of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **197**:179-200.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler et D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Schnepf, H. E., K. Tomczak, J. P. Ortega et H. R. Whiteley.** 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**:20923-20930.
- Schnepf, H. E. et H. R. Whiteley.** 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2893-2897.
- Schnepf, H. E. et H. R. Whiteley.** 1985. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **260**:6273-6280.
- Schwartz, J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau et E. Rousseau.** 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**:53-62.
- Schwartz, J.-L., M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Préfontaine, R. Brousseau et L. Masson.** 1997a. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**:397-402.
- Schwartz, J.-L. et R. Laprade.** 2000. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application* (J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-Leroux, eds), pp. 199-217, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schwartz, J.-L., Y.-J. Lu, P. Söhnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson et M. J. Adang.** 1997b. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**:270-276.
- Schwartz, J.-L. et L. Masson.** 2000. Structure-function analysis of cysteine-engineered entomopathogenic toxins. *Methods Mol. Biol.* **145**:101-113.

- Schwartz, J.-L., L. Potvin, X. J. Chen, R. Brousseau, R. Laprade et D. H. Dean.** 1997c. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by Cry1Aa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3978-3984.
- Siegel, J. P.** 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**:13-21.
- Silvy, C. et G. Riba.** 1999. Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaises herbes. *La lutte biologique (II). Dossiers de l'environnement de l'INRA n° 19*, pp. 157-200, INRA Editions, Paris.
- Singer, S.** 1973. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. *Nature* **244**:110-111.
- Skot, L., S. P. Harrison, A. Nath, L. R. Mytton et B. C. Clifford.** 1990. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the δ -endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*. *Plant Soil* **217**:285-295.
- Slatin, S. L., C. K. Abrams et L. English.** 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765-772.
- Smedley, D. P. et D. J. Ellar.** 1996. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* **142**:1617-1624.
- Smith, D. S., K. Compher, M. Janners, C. Lipton et L. W. Wittle.** 1969. Cellular organisation and ferritin uptake in the midgut epithelium of a moth, *Ephestia kühniella*. *J. Morphol.* **127**:41-72.
- Smith, G. P. et D. J. Ellar.** 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* **302**:611-616.
- Smith, R. A. et G. A. Couche.** 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:311-315.
- Spies, A. G. et K. D. Spence.** 1985. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. *Tissue Cell* **17**:379-394.
- Sramala, I., S. Leetacheewa, C. Krittanai, G. Katzenmeier, S. Panyim et C. Angsuthanasombat.** 2001. Charged residue screening in helix 4 of the *Bacillus*

- thuringiensis* Cry4B toxin reveals one critical residue for larvicidal activity. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **5**:219-225.
- Stock, C. A., T. J. McLoughlin, J. A. Klein et M. J. Adang.** 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepecia* 526. *Can. J. Microbiol.* **36**:879-884.
- Tabashnik, B. E.** 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **39**:47-79.
- Tabashnik, B. E., F. R. Groeters, N. Finson et N. W. Johnson.** 1994. Instability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Biocontr. Sci. Technol.* **4**:419-426.
- Tang, J. D., A. M. Shelton, J. van Rie, S. de Roeck, W. J. Moar, R. T. Roush, M. Peferoen.** 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:564-569.
- Tayabali, A. F. et V. L. Seligy.** 2000. Human cell exposure assays of *Bacillus thuringiensis* commercial insecticides: production of *Bacillus cereus*-like cytolytic effects from outgrowth of spores. *Environ. Health Perspect.* **108**:919-930.
- Thiéry, I., C. Back, P. Barbazan et G. Sinègre.** 1996. Applications de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la démoustification et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités* **7**:247-260.
- Tigue, N. J., J. Jacoby et D. J. Ellar.** 2001. The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5715-5720.
- Tran, L. B., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade.** 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488-4494.
- Turbeck B. O.** 1974. A study of the concentrically-laminated concretions, "spherites", in the regenerative cells of the midgut of lepidopterous larvae. *Tissue Cell* **6**:627-640.
- Uawithya, P., T. Tuntitippawan, G. Katzenmeier, S. Panyim et C. Angsuthanasombat.** 1998. Effects on larvicidal activity of single proline substitutions in $\alpha 3$ or $\alpha 4$ of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**:825-832.

- Udayasuriyan, V., A. Nakamura, H. Masaki et T. Uozumi.** 1995. Transfer of an insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* into plant-colonizing *Azospirillum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:163-167.
- Vachon, V., M.-J. Paradis, M. Marsolais, J.-L. Schwartz et R. Laprade.** 1995. Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **148**:57-63.
- Vachon, V., G. Préfontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade et L. Masson.** 2002. Analysis of pore formation by α -Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. En préparation.
- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji et L. A. Bulla, Jr.** 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**:12334-12340.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji et L. A. Bulla, Jr.** 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**:5490-5494.
- Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu et J. Leemans.** 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* **328**:33-37.
- Valaitis, A. P., M. K. Lee, F. Rajamohan et D. H. Dean.** 1995. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**:1143-1151.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele et H. Van Mellaert.** 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**:239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele et H. Van Mellaert.** 1990a. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378-1385.
- Van Rie, J., W. H. McGaughey, D. E. Johnson, B. D. Barnett et H. Van Mellaert.** 1990b. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **247**:72-74.

- Vázquez-Padrón, R. I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G. A. de la Riva et R. López-Revilla.** 1999. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci.* **64**:1897-1912.
- Venkatesan, P. et H. R. Kaback.** 1998. The substrate-binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9802-9807.
- Vié, V., N. Van Mau, P. Pomarède, C. Dance, J.-L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz et C. Le Grimellec.** 2001. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* **180**:195-203.
- Villafranca, J. E., E. E. Howell, S. J. Oatley, N.-H. Xuong et J. Kraut.** 1987. An engineered disulfide bond in dihydrofolate reductase. *Biochemistry* **26**:2182-2189.
- Villalon, M., V. Vachon, R. Brousseau, J.-L. Schwartz et R. Laprade.** 1998. Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**:27-34.
- Von Tersch, M. A., S. L. Slatin, C. A. Kulesza et L. H. English.** 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIb2 and CryIIIb2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3711-3717.
- Waku, Y. et K.-I. Sumimoto.** 1971. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm I. Light microscopy. *Tissue Cell* **3**:127-136.
- Walters, F. S., C. A. Kulesza, A. T. Phillips et L. H. English.** 1994. A stable oligomer of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, CryIIIa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**:963-968.
- Walters, F. S., S. L. Slatin, C. A. Kulesza et L. H. English.** 1993. Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**:921-926.
- Weiser, J.** 1984. A mosquito virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. *Zbl. Mikrobiol.* **139**:57-60.
- West, A. W., H. D. Burges, T. J. Dixon et C. H. Wyborn.** 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **17**:657-665.

- West, A. W., H. D. Burges et C. H. Wyborn.** 1984. Effect of incubation in natural and autoclaved soil upon potency and viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **44**:121-127.
- Wickremesinghe, R. S. B. et C. L. Mendis.** 1980. *Bacillus sphaericus* spores from Sri-Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. *Mosq. News* **40**:387-389.
- Widner, W. R. et H. R. Whiteley.** 1990. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **172**:2826-2832.
- Wieczorek, H.** 1992. The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J. Exp. Biol.* **172**:335-343.
- Wieczorek, H., G. Grüber, W. R. Harvey, M. Huss et H. Merzendorfer.** 1999. The plasma membrane H⁺-V-ATPase from tobacco hornworm midgut. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**:67-74
- Wieczorek, H., M. Putzenlechner, W. Zeiske et U. Klein.** 1991. A vacuolar-type proton pump energizes K⁺/H⁺ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **266**:15340-15347.
- Wieczorek, H., S. Weerth, M. Schindlbeck et U. Klein.** 1989. A vacuolar-type proton pump in a vesicle fraction enriched with potassium transporting plasma membranes from tobacco hornworm midgut. *J. Biol. Chem.* **264**:11143-11148.
- Wirth, M. C., A. Delécluse et W. E. Walton.** 2001. Lack of cross-resistance to Cry19A from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1956:1958.
- Wolfersberger, M. G.** 1989. Neither barium nor calcium prevents the inhibition by *Bacillus thuringiensis* of sodium- or potassium-gradient dependent amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane vesicles. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **12**:267-277.
- Wolfersberger, M. G.** 1990. Specificity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to lepidopteran larvae: recent insights from studies utilizing midgut brush border membrane vesicles. *Proc. 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, Adelaide, Australie, pp. 278-282.

- Wolfersberger, M. G., X. J. Chen et D. H. Dean.** 1996. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:279-282.
- Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana et G. M. Hanozet.** 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.
- Wu, D. et A. I. Aronson.** 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:2311-2317.
- Wu, S.-J. et D. H. Dean.** 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255**:628-640.
- Yamashita, S., T. Akao, E. Mizuki, H. Saitoh, K. Higuchi, Y. S. Park, H.-S. Kim et M. Ohba.** 2000. Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Can. J. Microbiol.* **46**:913-919.
- Yaoi, K., T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shinkawa, T. Takahashi, H. Iwahana et R. Sato.** 1997. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* **246**:652-657.
- Yaoi, K., K. Nakanishi, T. Kadotani, M. Imamura, N. Koizumi, H. Iwahana et R. Sato.** 1999. cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**:131-137.
- Ziniu, Y. et Y. Longsheng.** 1990. Large-scale field evaluation of larvicidal preparations of *Bacillus thuringiensis* H14 for mosquito control in town and rural environment in China. *Bull. Soc. Vector Ecol.* **15**:189-195.
- Zhong, C., D. J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin et E. R. Hart.** 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* **76**:131-139.
- Zhu, Y. C., B. Oppert, K. J. Kramer, W. H. McGaughey et A. K. Dowdy.** 1997. cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains of *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**:1027-1037.

Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gómez, A. K. Pullikuth, M. Soberón, A. Bravo et S. S. Gill. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* **277**:13863-13872.

