

Université de Montréal

**Rôle des facteurs physico-chimiques du micro-
environnement intestinal et des boucles inter-hélicales du
Domaine I dans l'activité de la toxine insecticide Cry9Ca
du bacille de Thuringe**

par

Jean-Frédéric Brunet

Département de physique

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Physique

option Biophysique et Physiologie moléculaire

Novembre, 2009

© Jean-Frédéric Brunet, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle des facteurs physico-chimiques du micro-environnement intestinal et des boucles
inter-hélicales du Domaine I dans l'activité de la toxine insecticide Cry9Ca du bacille de
Thuringe

présentée par :

Jean-Frédéric Brunet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent, Ph.D., président-rapporteur

Raynald Laprade, Ph.D., directeur de recherche

Rickard Blunck, Ph.D., membre du jury

Dominique Michaud, Ph.D., examinateur externe

Marc Amyot, Ph.D., représentant du doyen de la FES

Résumé

Une fois ingérées par un insecte sensible, les toxines insecticides du bacille de Thuringe doivent être activées par les protéases intestinales de cet insecte. Leur premier domaine, un ensemble de sept hélices- α amphipathiques, est responsable de leur insertion dans la membrane luminale de certaines cellules de l'intestin médian, ce qui crée des pores peu sélectifs. La toxicité et la capacité à former des pores d'une telle toxine, la Cry9Ca, de ses mutants simples R164A et R164K et d'un fragment de 55 kDa résultant d'un clivage protéolytique au niveau de son résidu 164 ont été étudiées à l'aide d'une combinaison de modélisation par homologie, de bioessais, d'expériences de gonflement osmotique avec des vésicules de membrane en bordure en brosse de larves de sphinx du tabac et de mesures électrophysiologiques sur des intestins isolés. Ni les mutations simples ni le clivage protéolytique n'ont altéré la toxicité de la Cry9Ca. Dans une solution à faible force ionique, toutefois, la formation des pores dépend fortement du pH : une augmentation de celui-ci de 6,5 à 10,5 a entraîné une baisse irrégulière et par étapes successives de la perméabilité membranaire. Les quatre préparations de toxine ont néanmoins dépolarisé la membrane apicale d'intestins médians fraîchement isolés baignant dans une solution contenant 122 mM de KCl à pH 10,5. L'activité de la Cry9Ca, et des mutants R164A et R164K, a été grandement stimulée lorsque les expériences ont été effectuées en présence de suc intestinal, de lipides extraits d'un volume équivalent de suc intestinal ou d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases solubles dans l'eau. De plus, le rôle des boucles inter-hélicales du Domaine I lors de l'insertion dans la membrane a été étudié avec des mutants doubles de la Cry9Ca dont les mutations introduisaient, neutralisaient ou renversaient une charge électrique. À l'exception de trois d'entre eux, tous ces mutants ont conservé une toxicité et une capacité à former des pores comparables à celles de la toxine parentale. L'ensemble de ces résultats suggère que le micro-environnement de l'intestin médian contribue à minimiser l'influence des charges de surface portées par les résidus des boucles inter-hélicales du Domaine I sur la capacité des toxines du bacille de Thuringe à former des pores. Il indique aussi que, d'une part, selon le site de clivage et les conditions expérimentales utilisées, des protéolyses supplémentaires de la toxine Cry9Ca activée peuvent soit stimuler, soit nuire à son activité et que, d'autre part, le suc intestinal du

sphinx du tabac contient probablement un inhibiteur de protéases qui pourrait jouer un rôle important dans l'activité des toxines du bacille de Thuringe.

Mots-clés : Toxines insecticides; Formation de pores; Micro-environnement; Protéolyse; Interactions électrostatiques; Gonflement osmotique; Électrophysiologie; Modélisation par homologie; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Abstract

Once ingested by susceptible insects, *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins must be activated by the insect's intestinal proteases. Their first domain, a bundle of seven amphipathic α -helices, is responsible for their insertion into the luminal membrane of midgut cells, thereby creating poorly selective pores. The toxicity and pore-forming ability of one such toxin, Cry9Ca, its single-site mutants, R164A and R164K, and of the 55-kDa fragment resulting from its proteolytic cleavage at residue 164 were investigated using a combination of homology modeling, bioassays, osmotic swelling experiments with *Manduca sexta* larval midgut brush border membrane vesicles and electrophysiological measurements on isolated midguts. Neither the single mutations nor the proteolytic cleavage altered Cry9Ca toxicity. In low ionic strength solutions however, pore formation was highly dependent on pH: increasing pH from 6.5 to 10.5 resulted in an irregular step-wise decrease in membrane permeabilization. All four toxin preparations nevertheless depolarized the apical membrane of freshly isolated midguts bathing in a solution containing 122 mM KCl at pH 10.5. The activity of Cry9Ca, R164A and R164K was greatly enhanced when the experiments were conducted in the presence of midgut juice, the lipids extracted from an equivalent volume of midgut juice or a cocktail of water-soluble protease inhibitors. Additionally, the role of the interhelical loops of Domain I in membrane insertion was investigated with Cry9Ca double mutants with mutations that either introduced, neutralized or reversed an electrical charge. All but three mutants retained a toxicity and a pore-forming ability that were comparable to those of their parental toxin. Overall, the results suggest that the midgut microenvironment contributes to minimizing the influence of surface charges carried by Domain I interhelical loop residues on *B. thuringiensis* toxins pore-forming ability. They also indicate that, depending on the cleavage site and on the experimental conditions used, further proteolysis of the activated Cry9Ca toxin can either stimulate or be detrimental to its activity and that *M. sexta* midgut juice probably contains protease inhibitors that could play a major role in the activity of *B. thuringiensis* toxins in the insect midgut.

Keywords : Insecticidal toxins; Pore formation; Microenvironment; Proteolysis; Electrostatic interactions; Osmotic swelling assay; Electrophysiological assay; Homology modelling; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Listes des sigles et abréviations	xiv
Remerciements	xvi
 Chapitre I : Introduction	 1
I.1 Les Toxines du bacille de Thuringe	1
I.1.1 Principe du mode d'action des toxines du bacille de Thuringe	2
I.1.2 Nomenclature des toxines Cry	3
I.1.3 Structure moléculaire des toxines Cry à trois domaines	5
I.1.4 La Cry9Ca	8
I.2 L'Intestin médian des larves de lépidoptères	10
I.2.1 Description morphologique de l'intestin médian	10
I.2.2 La « Pompe à potassium » de l'intestin des lépidoptères : une H ⁺ -ATPase	13
I.3 Mode d'action des toxines Cry à trois domaines du bacille de Thuringe dans l'intestin des larves de lépidoptères	 16
I.3.1 Protéolyse des toxines Cry	16
I.3.2 Fixation de la toxine à son récepteur et modèles proposés pour le mode d'action	 21
I.3.3 « Pompe à potassium » et intoxication par les toxines Cry	24
I.3.4 Formation des pores	27
 Chapitre II : Présentation de la recherche	 30
II.1 Mise en contexte	30
II.2 Présentation des travaux	31
II.2.1 Structure tridimensionnelle de la Cry9Ca	31

II.2.2	Étude de l'influence du micro-environnement sur le mode d'action de la Cry9Ca à l'aide d'une technique de gonflement osmotique	32
II.2.3	Étude de l'influence du micro-environnement sur le mode d'action de la Cry9Ca à l'aide d'une technique électrophysiologique	32
II.2.4	Étude du rôle de résidus des boucles du Domaine I de la Cry9Ca	33
II.2.5	Contribution des coauteurs	33
Chapitre III : Matériel et Méthodes		35
III.1	Production de la toxine Cry9Ca du bacille de Thuringe	35
III.1.1	Modélisation par homologie	35
III.1.2	Production, Activation et Purification de la toxine	35
III.2	Manipulation des insectes	36
III.2.1	Bioessais	36
III.2.2	Isolement de l'intestin médian de <i>M. sexta</i>	37
III.2.3	Production des vésicules de membrane en bordure en brosse	37
III.2.4	Isolement et Traitement du suc intestinal de <i>M. sexta</i>	38
III.3	Techniques biophysiques	39
III.3.1	Mesure du gonflement osmotique par diffusion lumineuse	39
III.3.2	Mesure électrophysiologique du potentiel membranaire	41
Chapitre IV : Modèle structural de la Cry9Ca		43
IV.1	Description du modèle	43
IV.1.1	Domaine I	44
IV.1.2	Domaine II	44
IV.1.3	Domaine III	51
IV.2	Emplacement des résidus mutés	52
IV.2.1	Résidu 164	52
IV.2.2	Boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$	52
IV.2.3	Boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$	53
IV.2.4	Boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$	53

IV.2.5 Boucle $\alpha 6-\alpha 7$	55
IV.2.6 Boucle $\alpha 7-\beta 1$	55
Chapitre V : Pore-forming properties of the <i>Bacillus thuringiensis</i> toxin Cry9Ca in <i>Manduca sexta</i> brush border membrane vesicles	56
Résumé	57
Abstract	57
Introduction	59
Materials and methods	60
Results	62
Discussion	66
Acknowledgments	69
References	70
Figure legends	77
Chapitre VI : Midgut Juice Components Affect Pore Formation by the <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> Insecticidal Toxin Cry9Ca	84
Résumé	85
Abstract	86
Introduction	87
Materials and Methods	88
Results	90
Discussion	92
Acknowledgments	95
References	96
Figure legend	101
Chapitre VII : Effects of Mutations within Surface-exposed Loops in the Pore-Forming Domain of the Cry9Ca Insecticidal Toxin of <i>Bacillus thuringiensis</i>	103
Résumé	104
Abstract	105

Introduction	106
Materials and Methods	107
Results	109
Discussion	112
Acknowledgments	115
References	116
Figure legend	124
Chapitre VIII : Discussion générale	131
Chapitre IX : Perspectives	137
Bibliographie	142

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.I : Espèces contre lesquelles la Cry9Ca est toxique	9
---	---

Chapitre V

Tableau V.I : Toxicity of Cry9Ca and its two single-site mutants toward <i>M. sexta</i> neonate larvae	76
--	----

Chapitre VII

Tableau VII.I : Toxicity of Cry9Ca mutants to <i>M. sexta</i> neonate larvae	122
--	-----

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1 : Structure tridimensionnelle de la Cry1Aa	6
Figure I.2 : Structure tridimensionnelle de trois protéines cristallines du bacille de Thuringe.....	7
Figure I.3 : Représentation schématisée des différences de structure entre les trois segments du mésentéron de <i>M. sexta</i>	12
Figure I.4 : Modélisation du mésentéron médian de l'intestin d'une larve de lépidoptère ..	15
Figure I.5 : Localisation de sites de protéolyse identifiés au sein des toxines Cry à trois domaines.	18

Chapitre IV

Figure IV.1 : Modèle structural de la Cry9Ca et structures de référence	45
Figure IV.2 : Domaine I de la Cry9Ca, tel que proposé par le modèle	47
Figure IV.3 : Domaine II de la Cry9Ca, tel que proposé par le modèle	49
Figure IV.4 : Domaine III de la Cry9Ca, tel que proposé par le modèle	51
Figure IV.5 : Gros plans sur les boucles du Domaine I	54

Chapitre V

Figure V.1 : Osmotic swelling of fifth instar <i>M. sexta</i> larvae midgut brush border membrane vesicles induced by Cry9Ca	79
Figure V.2 : Effect of pH on the KCl permeability of the pores formed by Cry9Ca, its 55-kDa fragment and single-site mutants R164A and R164K in fifth instar <i>M. sexta</i> midgut brush border membrane vesicles	80
Figure V.3 : Effect of thiocyanate and valinomycin on the Cry9Ca-induced permeability of <i>M. sexta</i> brush border membrane vesicles	81
Figure V.4 : Permeability of <i>M. sexta</i> brush border membrane vesicles to various solutes induced by Cry9Ca, its 55-kDa fragment, its single-site mutants, R164A and R164K, or Cry1Ac	82
Figure V.5 : Kinetics of pore formation of Cry1Ac, Cry9Ca, its 55-kDa fragment, and its	

single-site mutants in <i>M. sexta</i> brush border membrane vesicles at pH 7.5	83
---	----

Chapitre VI

Figure VI.1 : Effect of Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its single-site mutants R164A and R164K on the apical membrane potential of midgut epithelial cells from <i>M. sexta</i>	102
--	-----

Chapitre VII

Figure VII.1 : Homology model of Cry9Ca	126
Figure VII.2 : Main features of the Cry9Ca model	127
Figure VII.3 : Effect of Domain I interhelical loop mutants on the membrane potential of midgut epithelial cells from <i>M. sexta</i> in the presence of midgut juice	128
Figure VII.4 : Effect of Domain I interhelical loop mutants on the membrane potential of midgut epithelial cells from <i>M. sexta</i> in the presence of protease inhibitors	129
Figure VII.5 : Possible salt bridge within Domain I of the L186D mutant	130

Liste des sigles et abréviations

- 122K : Solution saline (Section III.3.2)
- ACFAS : Association francophone pour le savoir
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AEBSF : 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonylfluoride-HCl
- AMP : Adénosine monophosphate
- ARN : Acide ribonucléique
- ATP : Adénosine triphosphate
- CAPS : acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique
- CHES : acide 2-[N-cyclohexylamino]éthanesulfonique
- E-64 : *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane
- EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
- EGTA : acide éthylène-glycol-*bis*[β -aminoéthyl éther]-N,N,N',N'-tétraacétique
- g : accélération gravitationnelle
- HEPES : acide 4-[2-hydroxyéthyl]-1-pipérazineéthanesulfonique
- I_t : Intensité de la lumière diffusée mesurée au temps t
- LC₅₀ : Concentration létale pour 50% des individus testés (valeur statistique)
- LC₉₀ : Concentration létale pour 90% des individus testés (valeur statistique)
- MES : acide morpholineéthanesulfonique
- NMDG⁺ : Ion N-méthyl-D-glucamine
- PDB : *Protein data base*
- pK_{MZ} : valeur négative du logarithme (base 10) de la constante d'équilibre (K_{MZ}) de la réaction de formation d'un complexe chélate.
- Tris : 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
- V : Potentiel transmembranaire
- V₀ : Potentiel transmembranaire précédant l'activité de la toxine
- Vip : *Vegetative insecticidal proteins*

À Diane, Luc, Christiane, et Geneviève

Remerciements

Mener une thèse de doctorat à bien est un travail de longue haleine qui ne saurait être fait sans un support extraordinaire et constant de son entourage. C'est donc humblement que je remercie ici tous ceux qui, de près ou de loin, du début à la fin ou même juste pour une courte période, se sont tenus à mes côtés et m'ont offert, chacun à leur façon, leur patience apparemment illimitée devant ce projet qui n'en finissait plus de finir, leurs innombrables encouragements, leurs précieux conseils, leur indispensable aide, leur confiance inébranlable ou leur amour inconditionnel. En tête de liste vient d'abord celui qui, il y a déjà plus de dix ans m'accueillait à bras ouverts dans son laboratoire, moi qui n'était encore qu'étudiant en deuxième année de baccalauréat et ne savait de la biophysique que le nom. Professeur Raynald Laprade, merci de cet accueil et de ce support sans faille qui ont marqué toutes ces années d'apprentissage. Merci pour les discussions enlevantes, tant au laboratoire qu'à l'extérieur, parfois à quelques pas de l'université, et d'autres fois lors d'un de ces voyages qui m'ont fait découvrir notre continent en plus de notre discipline. Merci pour le soutien financier qui a comblé mes besoins pendant plusieurs années. Merci enfin pour tous les conseils et les encouragements et pour les petits « coups de pieds dans le cul » sans lesquels cette thèse n'aurait jamais atteint son point final. Bref, merci d'avoir été ce roc auquel j'ai toujours pu me raccrocher tant dans les moments les plus joyeux que les plus difficiles.

Cette thèse n'aurait non plus pu voir le jour sans l'aide immense et précieuse, que dire, pharaonique!, du Docteur Vincent Vachon. Merci Vincent de ta présence constante, toujours agréable. Tout au long de cette thèse, tu as su me garder sur le droit chemin grâce à ton sens critique aiguisé, à tes connaissances nombreuses et diversifiées, à tes suggestions toujours pertinentes. Grâce à toi, mes écrits, toujours bruts, un peu trop pédagogiques et souvent trop familiers ont pu être patiemment rabotés et équarris, peu à peu transformés en de petits joyaux de discours scientifiques. Merci pour les journées entières passées à m'apprendre une nouvelle technique, à discuter des dernières découvertes dans le domaine ou encore à réviser mes textes; merci pour les soirées à travailler sur des affiches ou des présentations orales, merci aussi pour les moments plus ludiques où nous pouvions discuter

et refaire le monde autour d'une bouteille de vin ou d'un pichet de bière, notamment de micro-brasseries. Bref, merci d'avoir été ce phare qui a illuminé mon parcours du début à la fin, par beau temps comme par temps orageux.

Merci au Professeur Jean-Louis Schwartz qui m'a lui aussi ouvert les portes de ses laboratoires, d'abord celui de l'institut de recherche en biotechnologies puis celui de l'université, afin que je puisse mener à bien la production du matériel biologique essentiel à mes recherches. Merci aussi pour ta bonne humeur et tes encouragements. De même, merci au Docteur Jeroen Van Rie pour nous avoir offert la possibilité de travailler sur la toxine Cry9Ca et à Madame Greta Arnaut, pour la création des doubles mutants de cette toxine. Merci au Docteur Charles Vincent pour l'aide précieuse ayant permis de faire les bioessais.

Un merci tout spécial aux techniciens des différents laboratoires avec lesquels j'ai pu collaborer toutes ces années : Mireille Marsolais, Marc Juteau, Lucie Marceau, Michel Brunette et Geneviève Larouche. Sans votre aide précieuse, vos conseils judicieux et votre bonne humeur, je n'aurais pu devenir d'abord à l'aise puis éventuellement autonome avec les différentes techniques de laboratoire que j'ai apprises, en bonne partie grâce à vous. La perspective de passer une journée à vos côtés était en elle-même une motivation pour entreprendre la journée. Tout aussi motivante était la perspective de côtoyer aussi mes collègues étudiants et stagiaires post-doctoraux. Ainsi, au fil des années, j'ai ainsi eu le grand plaisir de travailler et d'étudier aux côtés de Le Binh Tran, Geneviève Lebel, Dominic Granger, Jean-François Noulin, Olivier Peyronnet, Manuel Simoes, Marilyne Gagnon, Dominique Gagnon, Éric Laflamme, Martin Kirouac, Mélanie Fortier, et Frédéric Girard. Du début à la fin de mes études, vous avez été une constante source de support et de dépassement. Merci pour les cours passés ensemble, l'entraide, les discussions, de tout acabit, que nous avons eus, bref pour tous ces moments que nous avons partagés au cours des dix dernières années et qui ont contribué à mon épanouissement.

Merci aussi à tous mes autres professeurs de biophysique et physiologie moléculaire, Alfred Berteloot, Josette Noël, Lucie Parent, Rémy Sauvé et Jean-Yves Lapointe. Grâce à vous, de même qu'à Raynald, Jean-Louis et Vincent, cette discipline

passionnante est constamment devenue un peu plus intéressante, un peu plus concrète. Vous m'avez tous poussé à chercher toujours un peu plus loin, à comprendre toujours un peu mieux. Bref, à m'affirmer comme chercheur et à acquérir une compétence essentielle dans notre domaine.

Il me faut aussi étendre ces remerciements à tous ceux qui, parmi les professeurs, étudiants et employés du groupe d'étude des protéines membranaires et des départements de physique et de physiologie ont contribué à faire de l'université un milieu que j'ai pu qualifier de seconde maison. Merci à tous.

Tout ceux qui me connaissent bien savent que je nourris aussi une seconde passion, celle de l'histoire de l'Égypte ancienne. Une telle passion m'a souvent servi pour me changer les idées, me conservant par le fait même un esprit plus sain qui n'a pu qu'être bénéfique à mes travaux. Merci aux membres de la Société pour l'étude de l'Égypte ancienne pour m'avoir permis de nourrir cette passion tout en endurant mes propos étonnants sur des sphinx à six pattes.

Merci à mes parents, Luc et Diane. Vous m'avez façonné depuis ma tendre enfance. Toujours, vous m'avez encouragé à me dépasser et à viser toujours plus haut. Merci donc pour votre patience, vous qui, même aux moments les plus difficiles, avez su trouver les mots pour me convaincre de ne pas laisser tombé, et de continuer à aller de l'avant. Cette thèse est donc constituée d'une bonne part de vous. Merci à ma petite sœur Marie-Hélène, pour ton écoute et ta présence quand j'en ai eu besoin. De même, merci à mon parrain Serges et à ma grand-mère Rita, sur qui j'ai toujours pu compter.

Je ne pourrais terminer cette joyeuse liste sans mentionner celle qui est apparue au cours de ces études pour devenir la complice de mes jours et de mes nuits, mon épouse Geneviève Hamelin. Geneviève, ma puce, merci de ta présence rassurante à mes côtés, de tes mots et de tes gestes qui me guident sur le chemin de la vie, de ta patience sans fin, bref de ton amour dont je mesure un peu plus l'étendue chaque jour. Dans la sphère privée, tu es à la fois un roc sur lequel je peux m'appuyer sans crainte et un phare dont la lumière illumine tous les aspects de mon existence et leur donne un sens. En toi j'ai trouvé l'âme sœur, et l'achèvement de cette thèse t'est infiniment redevable. Finalement, merci de tout

mon cœur à notre fils, Félix-Olivier, pour ses sourires invitants et sa joie de vivre contagieuse. Merci mon gars d'avoir transformé notre vie à jamais.

Entre le premier dépôt et le dépôt final de cette thèse, un bien heureux événement s'est produit : la naissance de mon second fils, Sébastien. Merci petit bonhomme de m'avoir gardé éveillé les quelques nuits blanches sans lesquelles les corrections nécessaires n'auraient pu être apportées.

Chapitre I

Introduction

I.1 — Les Toxines du bacille de Thuringe

Depuis leur première mise en marché dans les années 1930, les toxines insecticides produites par le bacille de Thuringe (de Maagd *et al.*, 2003a) sont demeurées les biopesticides les plus utilisés dans le monde. En agriculture et en foresterie, appliquées comme insecticides ou directement intégrées au sein de plantes modifiées génétiquement, elles contrôlent la prolifération souvent dramatique de plusieurs lépidoptères et coléoptères nuisibles. En santé publique, leur application a permis de réduire radicalement certaines populations de diptères porteurs de maladies transmissibles à l'être humain (Federici, 2005; Roh *et al.*, 2007). Mais afin que de telles utilisations puissent se poursuivre et se diversifier, il faut aussi continuer de développer une compréhension toujours plus fine de leur mode d'action.

Le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*) est une bactérie aérobie à Gram positif formant des spores et peuplant les sols et les plantes. De nombreuses variétés existent et se trouvent partout dans le monde (Martin et Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997; Chaufaux *et al.*, 1997). La première souche insecticide de la bactérie fut découverte au Japon en 1901, puis une autre fut isolée dans la région de Thuringe en Allemagne en 1915 (Beegle et Yamamoto, 1992; Federici, 2005). Depuis, de nouvelles souches de la bactérie sont régulièrement découvertes. En plus des souches insecticides, on compte aujourd'hui des souches toxiques contre certains acariens, nématodes, vers plats et protozoaires (Feitelson *et al.*, 1992; Griffiths et Aroian, 2005).

Le bacille de Thuringe synthétise des protéines, nommées δ -endotoxines, qui forment des cristaux parasporaux libérés lors de la sporulation. Ces cristaux, variant en forme et en composition d'une souche à l'autre, peuvent contenir une ou plusieurs δ -endotoxines. Plus de cent cinquante sous-groupes sont aujourd'hui connus, classés en «Cry» ou en «Cyt». Les protéines Cyt, particulièrement efficaces contre les diptères, sont hémolytiques alors que les Cry ne le sont pas (Crickmore *et al.*, 1998). Chaque

δ -endotoxine possède un spectre de toxicité qui lui est propre, mais qui reste relativement restreint (van Frankenhuyzen, 2009; van Frankenhuyzen et Nystrom, 2009) et qui n'inclut jamais les mammifères et autres animaux vertébrés sains (Spiegel, 2001; Shelton *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2007). Elles présentent donc un grand intérêt pour le contrôle des espèces nuisibles en agriculture et en santé publique. Un sous-groupe de toxines Cry, dites parasporines, agit de façon préférentielle sur des cellules cancéreuses (Ohba *et al.*, 2009a, b), ce qui pourrait mener à des applications en santé humaine. Récemment, un nouveau type de protéines insecticides de *B. thuringiensis*, nommées Vip, a été identifié. Contrairement aux δ -endotoxines, celles-ci sont sécrétées lors de la phase végétative du développement de la bactérie, d'où leur nom, une abréviation de l'anglais « *vegetative insecticidal proteins* ». Deux groupes principaux ont déjà été identifiés : d'une part, les Vip1 et Vip2 qui fonctionnent en tandem et sont actives contre certains coléoptères et, d'autre part, les Vip3 qui sont efficaces contre certains lépidoptères (Lee *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2007).

I.1.1 – Principe du mode d'action des toxines du bacille de Thuringe

Aujourd'hui, la très grande majorité des chercheurs s'entendent pour affirmer que les toxines Cry agissent par la formation de pores suite à une liaison avec un récepteur spécifique (Bravo *et al.*, 2007). Une fois ingérés par l'insecte, les cristaux parasporaux du bacille de Thuringe contenant des protéines Cry sont d'abord solubilisés. Les protéines ainsi relâchées dans le milieu intestinal ne sont encore que des protoxines qui doivent ensuite être activées par protéolyse afin de devenir, à proprement parler, des toxines. Chez de nombreux insectes, dont les lépidoptères, un environnement alcalin, comme celui de l'intestin médian (Section I.2), est essentiel à la solubilisation de nombreuses δ -endotoxines et optimal pour l'activité des protéases responsables de leur activation. Selon plusieurs, le pH élevé est aussi un facteur qui maximise l'action cytolytique des toxines (Gringorten *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998). En d'autres termes, chez les lépidoptères, les protéines du bacille de Thuringe utilisent une propriété fondamentale de l'intestin de l'insecte afin d'amorcer leur action. Le fait que l'intestin constitue le site d'action de ces toxines a pu être démontré grâce à une série d'expériences incluant des mesures du pH de l'hémolymphe, des ligatures de segments intestinaux, des études par rayons X et des observations histopathologiques (Heimpel et

Angus, 1959; Hoopingarner et Materu, 1964; Sutter et Raun, 1967; Ebersold *et al.*, 1977; Griego *et al.*, 1980). Une fois intoxiqué, un insecte sensible voit son tube digestif rapidement paralysé et cesse de se nourrir. Cet effet pourrait résulter directement de la formation de pores dans la membrane apicale des cellules en colonne situées tout au long de son intestin médian (Endo et Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Percy and Fast, 1983; Lane *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1992a, b). Chez certaines espèces, comme le ver à soie, une paralysie générale, consécutive à une augmentation du pH de l'hémolymphe, s'ensuit. En général, les insectes ne meurent pas directement des suites des dommages infligés à leur intestin, mais plutôt à cause du jeûne ou, encore plus fréquemment, de la septicémie que ces lésions leur imposent (Heimpel et Angus, 1959; Broderick *et al.*, 2006).

I.1.2 – Nomenclature des toxines Cry

Une première classification systématique des toxines Cry (Höfte et Whiteley, 1989) introduisit l'usage d'une notation de la forme « CryIA(a) » où le nom générique, Cry, commun à toutes les protéines de cette superfamille, était suivi de trois niveaux hiérarchiques. Le premier niveau de cette nomenclature originale, exprimé en chiffres romains, était basé sur l'activité insecticide. Les toxines actives seulement contre les lépidoptères, par exemple, furent classées sous la bannière des CryI. Quant aux deuxième et troisième rangs, notés respectivement par une lettre majuscule et une lettre minuscule mise entre parenthèses, ils permettaient de différencier les protéines Cry selon leur degré d'homologie. Ainsi, la CryIA(b) est plus semblable à la CryIA(a) qu'à la CryIB. Quelques incohérences au sein de la classification originale et l'absence d'un organisme de standardisation pour les noms à accorder aux nouvelles toxines (deux groupes bien différents de toxines Cry ayant reçu indépendamment la désignation de CryV !) ont toutefois rapidement mené à une révision de cette nomenclature.

Un comité dirigé par Crickmore s'est chargé, dès 1993, de mettre à jour la nomenclature (Crickmore *et al.*, 1998, 2009). Contrairement à la précédente classification, on assigne maintenant un nom à chaque membre de la superfamille des toxines Cry en ne se basant que sur le degré d'identité de la séquence de leurs acides aminés. De plus, le comité ne s'est pas dissout et continue de nommer chaque nouvelle toxine, préférablement avant la publication de sa description.

Les noms préconisés par la nomenclature du comité de Crickmore sont de la forme « Cry1Aa1 », avec quatre niveaux permettant d'identifier chaque toxine. Le premier niveau, maintenant désigné à l'aide d'un chiffre arabe, distingue des familles de toxines ayant moins de 45% d'identité entre leurs structures primaires. Pour les deuxième et troisième rangs, cette limite d'identité est de 78 et 95%, respectivement. Si une lettre minuscule désigne toujours le troisième niveau, celle-ci ne se met plus entre parenthèses. Le quatrième niveau, qui permet de distinguer des toxines semblables à plus de 95%, est souvent omis. En fait, comme un nouveau nom de toxine est attribué à chaque fois qu'une toxine Cry est découverte de façon indépendante, il arrive même que des toxines dont le nom ne diffère que par leur rang quaternaire soient, en fait, identiques. La similarité entre les structures des noms de chaque nomenclature a permis de conserver quasi intact le nom des toxines les plus connues au milieu des années 1990 (Crickmore *et al.*, 1998). Pour être incluse dans la nomenclature des toxines Cry telle que maintenue par le comité, une nouvelle toxine doit présenter l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes (Crickmore *et al.*, 2009) : d'une part, être une protéine issue d'un cristal parasporal du bacille de Thuringe et présenter une activité insecticide, ou un effet toxique quelconque, vérifiable expérimentalement contre au moins un organisme vivant, ou, d'autre part, et sans nécessairement provenir de *B. thuringiensis* ou même avoir une toxicité connue, présenter une homologie de séquence significative avec une protéine déjà incluse dans la nomenclature. Une exception à ces règles concerne une série de toxines binaires, découvertes plus récemment. Ces toxines peuvent maintenant être incluses individuellement dans la nomenclature si elles ont un effet toxique significatif lorsque combinées entre elles, et ce même si elles sont inactives seules. D'un point de vue moléculaire, cette superfamille comprend donc une panoplie de protéines ayant souvent peu en commun. Pour la vaste majorité d'entre elles, toutefois, on prédit pour leur portion active, sur la base de l'alignement de leurs séquences, une structure similaire à trois domaines fonctionnels bien distincts (Section I.1.3). C'est le cas des familles Cry1 à 5, 7 à 14, 16 à 21, 24 à 32, 39 à 44, 47, 48, 50, 52 à 55, et 57 à 59 (Crickmore *et al.*, 2009).

I.1.3 – Structure moléculaire des toxines Cry à trois domaines

La description topologique des trois domaines de la majorité des toxines Cry peut maintenant être donnée grâce à la résolution des structures cristallines de huit toxines différentes, soit Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001), Cry1Ac (Li *et al.*, 2001), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006) et Cry8Ea (Guo *et al.*, 2009). Ces huit structures, dont l'une est représentée dans la figure I.1, montrent d'abord à quel point la structure tridimensionnelle de ces toxines est remarquablement conservée malgré la faible homologie entre leur structure primaire respective. Le premier domaine est un ensemble de 7 hélices- α anti-parallèles dans lequel la cinquième, dite α_5 , est entourée par les six autres. Le Domaine II est formé de trois feuillets- β anti-parallèles reprenant chacun la topologie dite de la clé grecque et assemblés pour former un prisme- β . Le Domaine III, quant à lui, se présente sous la forme de deux feuillets- β anti-parallèles légèrement repliés et superposés l'un à l'autre (sandwich- β).

Une structure tridimensionnelle conservée entre un si grand nombre de toxines dont l'identité de la structure primaire est relativement faible s'explique en bonne partie par le fait que cette identité n'est pas uniformément répartie. Une comparaison entre toutes les structures connues montre que la majorité des grandes variations structurelles s'observe dans le Domaine II. Pour les autres parties de la protéine, toutefois, il existe cinq blocs d'acides aminés (Figure I.1) plutôt bien conservés dans la plupart des familles de toxines Cry (Höfte et Whiteley, 1989; Crickmore *et al.*, 1998, 2009). Le premier de ces blocs forme l'hélice α_5 du Domaine I, alors que le second forme la principale zone de contact entre les trois domaines puisqu'il recouvre l'hélice α_7 du Domaine I, le brin β_1 situé du côté N-terminal du Domaine II et une partie du Domaine III qui se trouve entre les Domaines I et II. Ce deuxième bloc comprend notamment les résidus nécessaires à la formation de quelques ponts salins reliant les Domaines I et II. Le troisième bloc, quant à lui, comprend le dernier brin- β du Domaine II et le début du Domaine III, une structure qui contribue aussi à l'interaction entre les trois domaines. Les blocs 4 et 5, quant à eux, contiennent des brins- β situés au cœur du sandwich- β qui forme le Domaine III.

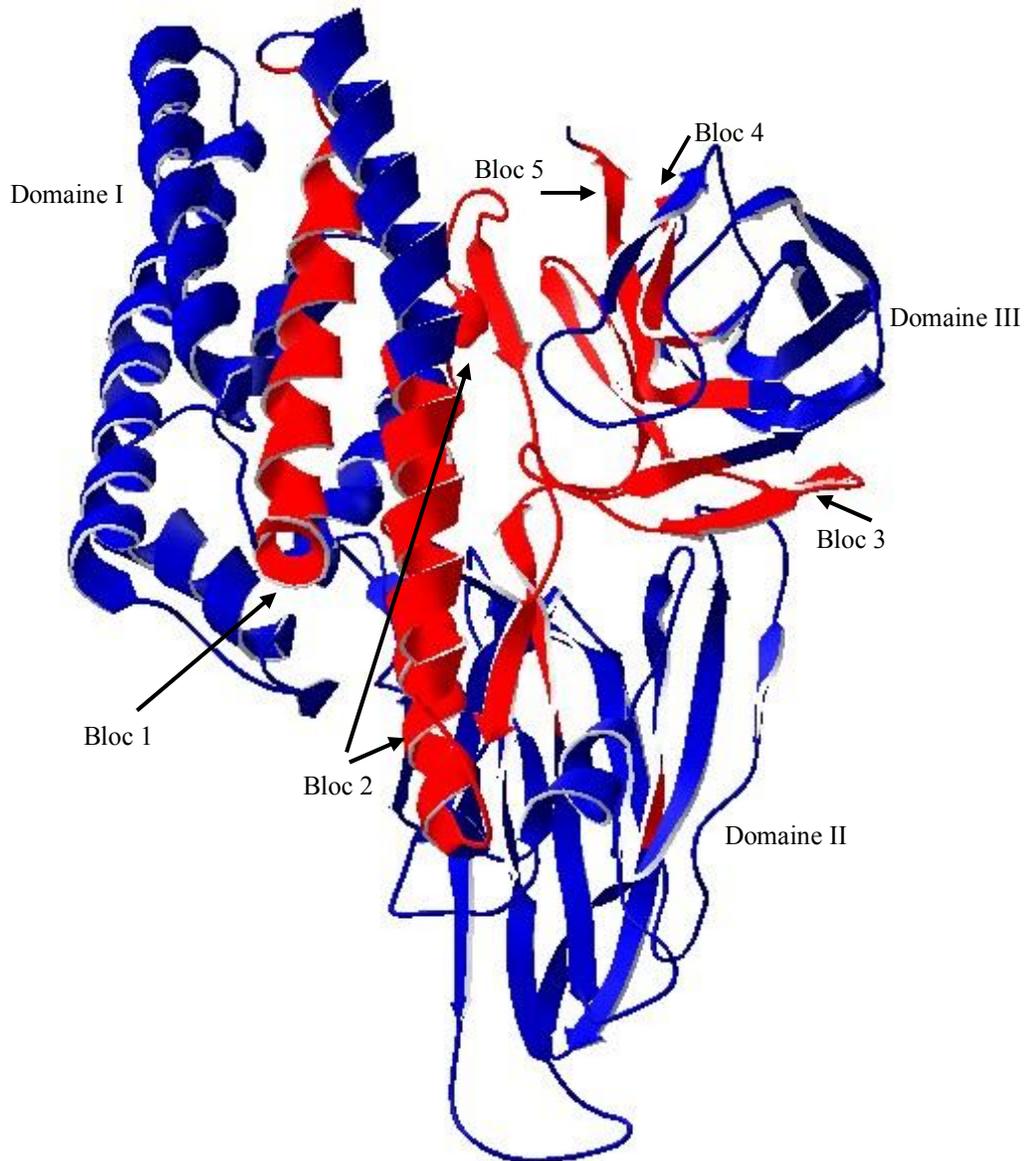


Figure I.1 : **Structure tridimensionnelle de la Cry1Aa.** Structure cristallographique 1CIY de la Cry1Aa, résolue avec une précision de 2,25 Å. La position des trois domaines est indiquée ainsi que

Tout récemment, la structure tridimensionnelle d'une autre toxine Cry, la parasporine 2 (Cry46Aa1), a été publiée (Akiba *et al.*, 2009). Contrairement aux huit autres toxines Cry dont la structure a été élucidée, celle-ci possède trois domaines composés principalement de feuillets- β (Figure I.2A). Son Domaine I comprend cependant quatre hélices dont trois sont très courtes (moins de deux tours). Bien qu'elle possède aussi trois domaines, cette toxine n'est pas classée parmi les toxines dites à trois domaines. Ceci implique que le terme « toxine à trois domaines », bien qu'abondamment utilisé, peut porter à confusion et devrait être remplacé. En fait, la

nouvelle structure révèle plutôt une grande ressemblance avec celle d'une protéine cristalline de *B. thuringiensis* pour laquelle aucune toxicité n'a encore été démontrée (Figure I.2B, Akiba *et al.*, 2006). La structure de ces deux protéines partage aussi une grande similarité avec celle de toxines bactériennes formant des pores à l'aide d'assemblages de feuillets- β telles que la toxine- ϵ de *Clostridium perfringens* et l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila*, et une lectine hémolytique produite par le champignon parasite *Laetiporus sulphureus* (Akiba *et al.*, 2006, 2009). Malgré sa structure radicalement différente, la parasporine 2 semble agir de façon similaire aux autres toxines Cry : elle doit être protéolysée à chacune de ses extrémités avant de pouvoir se fixer sur la membrane plasmique de cellules cancéreuses et en augmenter la perméabilité (Kitada *et al.*, 2006). Enfin, la structure tridimensionnelle d'une toxine hémolytique du bacille de Thuringe, la Cyt2Aa, a aussi été élucidée. Elle ne ressemble pas à celle des toxines Cry dont la structure est connue, incluant la parasporine 2. En effet, elle ne compte qu'un seul domaine composé d'un feuillet- β de 7 brins de chaque côté duquel se trouve une structure en épingle à cheveux formée par une hélice- α et une hélice 3_{10} (Figure I.2C, Li *et al.*, 1996). Le mode d'action des toxines Cyt demeure controversé. Si plusieurs considèrent qu'elles fonctionnent elles aussi en formant des pores (Promdonkoy et Ellar, 2003), d'autres considèrent plutôt qu'elles agissent en déstabilisant la membrane comme des détergents (Butko, 2003).

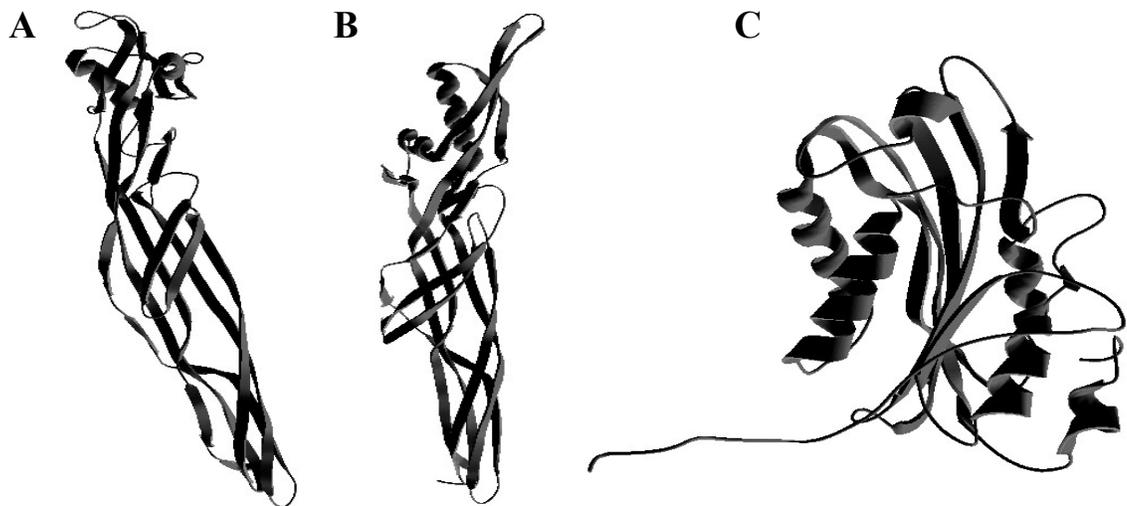


Figure I.2 : **Structure tridimensionnelle de trois protéines cristallines du bacille de Thuringe.** (A) Structure cristallographique 2ZTB de la parasporine 2 (Cry46Aa1, résolution de 2,38 Å). (B) Structure cristallographique 2D42 d'une protéine de 26 kDa sans toxicité connue (résolution de 2,07 Å). (C) Structure cristallographique d'une toxine hémolytique du bacille de Thuringe, la Cyt2Aa.

I.1.4 – La Cry9Ca

Tant en termes d'homologie qu'en termes de toxicité spécifique aux lépidoptères, la famille des Cry9 est sans doute l'une des plus proches de celle des Cry1 (Crickmore *et al.*, 2009), la plus étudiée d'entre toutes. Des gènes *cry9* ont été identifiés dans de nombreuses souches du bacille de Thuringe provenant de plusieurs régions du monde (Bravo *et al.*, 1998; Shevelev *et al.*, 1998; Ben-Dov *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2005; Święcicka et Mahillon, 2005; Konecka *et al.*, 2007; Cinar *et al.*, 2008; Jouzani *et al.*, 2008; Rosas-Garcia *et al.*, 2008; Thammasittirong et Attathom, 2008; Nazarian *et al.*, 2009). À l'été 2009, au moins vingt-six toxines de cette famille avaient été identifiées (Crickmore *et al.*, 2009). La plus connue de celles-ci est sans doute la Cry9Ca1, cette toxine ayant défrayé la manchette en l'an 2000 à cause de sa découverte dans des coquilles de tacos de la chaîne de restauration rapide américaine Taco Bell. Ces coquilles auraient été en partie produites avec du maïs Starlink™, un organisme génétiquement modifié créé par la firme Aventis dans lequel une variante du gène de la Cry9Ca1 avait été introduite (Bucchini et Goldman, 2002; Orlandi *et al.*, 2002). Ce maïs n'avait pourtant été homologué que pour la consommation animale. Plusieurs personnes se sont plaintes de réactions allergiques suite à la consommation de tacos chez Taco Bell. Aucun lien n'a cependant pu être établi entre d'éventuelles réactions allergiques et la toxine Cry9Ca1 (Bucchini et Goldman, 2002; Bernstein *et al.*, 2003; Raybourne *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2006).

La Cry9Ca1, originellement désignée CryIH, fut clonée en 1993 par Bart Lambert dans les laboratoires de la firme belge Plant Genetic Systems (Lambert *et al.*, 1996). Son gène code pour une protoxine de 1157 acides aminés et 129,8 kDa de masse moléculaire. Suite à l'action de protéases, cette protoxine perd sa moitié C-terminale ainsi que les 43 ou 57 premiers acides aminés de son extrémité N-terminale (Lambert *et al.*, 1996). Issue de ces coupures, la toxine Cry9Ca1 activée a une masse de 68,7 ou 67,1 kDa. Plus récemment, une Cry9Ca2 a été identifiée par les chercheurs de la firme Monsanto (Baum *et al.*, 2003). Cette dernière partage plus de 98% d'identité avec la Cry9Ca1, les différences se situant au niveau de 22 acides aminés répartis entre les résidus 566 et 676 et de la délétion du résidu 624. Tous ces résidus se répartissent entre

le milieu du Domaine III et le début du domaine C-terminal de la protoxine (Chapitre IV). Étant donné cette grande similarité et le fait que les quelques différences ne touchent qu'une section de la protéine peu abordée dans cette thèse, la Cry9Ca1 ne sera plus désignée que par le nom de Cry9Ca dans le reste de ce document.

Tableau I.I : Espèces contre lesquelles la Cry9Ca est toxique

Espèce vulnérable	Références
<i>Agrotis ipsilon</i>	de Maagd <i>et al.</i> , 2003b
<i>Agrotis segetum</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996
<i>Bombyx mori</i>	van Frankenhuyzen <i>et al.</i> , 1997
<i>Cacyreus marshalli</i>	Herrero <i>et al.</i> , 2002
<i>Chilo suppressalis</i>	Alcantara <i>et al.</i> , 2004
<i>Choristoneura fumiferana</i>	van Frankenhuyzen <i>et al.</i> , 1997; Pang <i>et al.</i> , 2002
<i>Diatraea grandiosella</i>	Reed et Halliday, 2001
<i>Earias insulana</i>	Ibargutxi <i>et al.</i> , 2006
<i>Epinotia aporema</i>	Sauka <i>et al.</i> , 2007
<i>Helicoverpa armigera</i>	Avilla <i>et al.</i> , 2005
<i>Heliothis virescens</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996
<i>Lobesia botrana</i>	Ruiz de Escudero <i>et al.</i> , 2007
<i>Mamestra brassicae</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996
<i>Manduca sexta</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996; Jansens <i>et al.</i> , 1997; Walker <i>et al.</i> , 2000; Hua <i>et al.</i> , 2001; Reed et Halliday, 2001
<i>Papaipema nebris</i>	Binning et Rice, 2002
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Tabashnik <i>et al.</i> , 2000b
<i>Plodia interpunctella</i>	Giles <i>et al.</i> , 2000
<i>Plutella xylostella</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996; Tabashnik <i>et al.</i> , 2000a
<i>Scirpophaga incertulas</i>	Alcantara <i>et al.</i> , 2004
<i>Spodoptera exigua</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996
<i>Spodoptera littoralis</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1996

N'eut été de la publicité négative, deux propriétés de la Cry9Ca auraient pu en faire une toxine des plus utilisées. Premièrement, la Cry9Ca est toxique pour un vaste éventail de lépidoptères, dont plusieurs ravageurs (Tableau I.I), tout en restant peu efficace contre une espèce inoffensive et populaire comme le papillon monarque (*Danaus plexippus*, Hellmich *et al.*, 2001). Deuxièmement, la Cry9Ca utilise un

récepteur différent de ceux qu'utilisent les toxines du groupe Cry1A (Moar *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 1996; Denolf *et al.*, 1997; Jansens *et al.*, 1997; van Frankenhuyzen *et al.*, 1997; Tabashnik *et al.*, 2000a, b; Hua *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2002; de Maagd *et al.*, 2003b; González-Cabrera *et al.*, 2003; Alcantara *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2004; Ibargutxi *et al.*, 2006; Ruiz de Escudero *et al.*, 2007). Ces dernières étant les toxines les plus utilisées en agriculture, la Cry9Ca pourrait devenir un outil des plus utiles pour combattre l'apparition éventuelle de résistance aux toxines de *B. thuringiensis*. De nouvelles lignées de riz exprimant la Cry9Ca ont d'ailleurs récemment été créées (Chen *et al.*, 2008). Dans un tout autre registre, cette toxine a aussi servi comme outil en protéomique, une nouvelle stratégie de développement de banques de protéines ayant d'abord été testée avec la création d'une nouvelle série de mutants de la Cry9Ca (Vanhercke *et al.*, 2005).

I.2 — L'Intestin médian des larves de lépidoptères

Les toxines Cry sont actives de par leur action contre les cellules intestinales d'un insecte sensible. Pour les toxines des familles Cry1, Cry2 et Cry9, entre autres, cet insecte est plus particulièrement un lépidoptère. Cette section se propose donc de faire un survol des connaissances disponibles sur l'organe cible de ces toxines, l'intestin médian, et plus particulièrement sur le système biophysique qui, décrit à l'origine comme étant une « pompe à potassium », est à l'origine des propriétés particulières de cet intestin.

I.2.1 – Description morphologique de l'intestin médian

Plusieurs dizaines de millions d'espèces d'insectes se partagent la quasi-totalité des niches écologiques de notre planète. Cette diversité se traduit par une impressionnante variation dans la morphologie et les mécanismes fonctionnels du tube digestif d'un ordre d'insecte à l'autre. Quelques constantes se dégagent néanmoins. Ainsi, chez tous les insectes, le tube peut être divisé en trois grandes sections. Il débute par un site étanche de digestion des aliments et de leur mise en réserve, le stomodeum (intestin antérieur) et se termine par une section un peu plus perméable, le proctodeum (intestin postérieur), qui permet de compléter l'absorption d'éléments nutritifs essentiels avant l'expulsion finale de la matière fécale. Entre les deux se trouve l'intestin médian,

ou mésentéron, un épithélium simple qui joue un rôle central dans les processus de transport par lesquels l'insecte interagit avec son environnement (Dow, 1986). Une membrane lâche et très poreuse de chitine et de glycoprotéines (dite membrane péritrophique) se situe habituellement du côté apical. Elle protège l'épithélium des bactéries et des aliments non digérés sans poser d'obstacle aux composés essentiels présents dans la lumière intestinale (Dow, 1986).

Au-delà de cette structure générale, le tube digestif diffère selon l'alimentation de l'insecte. Chez les larves de lépidoptères, la principale source de nutriments est d'origine végétale solide, et le canal digestif a une structure relativement simple. Comme le proctodeum est court et le stomodeum, ne permettant aucun emmagasinage, l'est encore plus, le mésentéron occupe la majeure partie du canal digestif et une partie considérable du volume de la chenille. La couche cellulaire unique de l'épithélium de l'intestin médian est composée de quatre types de cellules. Les plus fréquentes, et les plus actives dans le transport des substances nutritives et des ions, sont les cellules en colonne, typiques des épithéliums d'animaux, et les cellules en gobelet, propres à certains arthropodes, qui présentent une large cavité interne s'ouvrant sur la lumière intestinale par une valve. Des cellules régénératrices, qui s'activent durant les périodes de mue ou en cas de blessure, et quelques cellules endocrines complètent cet organe (Dow, 1986).

Même si des résultats similaires ont été obtenus chez différents lépidoptères, le cas le plus étudié reste celui du sphinx du tabac (*Manduca sexta*) (Dow, 1986). Chez cet insecte, le mésentéron est constitué de six lanières tissulaires repliées (Figure I.3A). Un long muscle longitudinal court le long de ces minces bandes. Longitudinalement, on distingue clairement trois segments différenciés entre eux par l'ampleur de leurs repliements et leur contenu cellulaire, tels que décrits dans la figure I.3 (B-D). La transition entre les segments antérieur et médian est floue et caractérisée par une diminution progressive du degré de repliement, ce qui contraste avec la jonction abrupte, aux deux tiers de l'organe, entre les segments médian et postérieur. La morphologie des cellules en gobelet est différente selon le segment où elles se retrouvent (Figure I.3E-H) avec une forme intermédiaire sur les quelques premiers millimètres du segment postérieur, assouplissant ainsi la transition (Cioffi, 1979).

Une propriété fort particulière du mésentéron des larves de lépidoptères (et de certains autres insectes) est son alcalinité très élevée, avec des pH pouvant dépasser 12 (Dow, 1984). Cette propriété de l'intestin permet de contrer les effets d'une diète riche en tannins, composés qui, à pH plus bas, se lient aux protéines et ralentissent ainsi leur

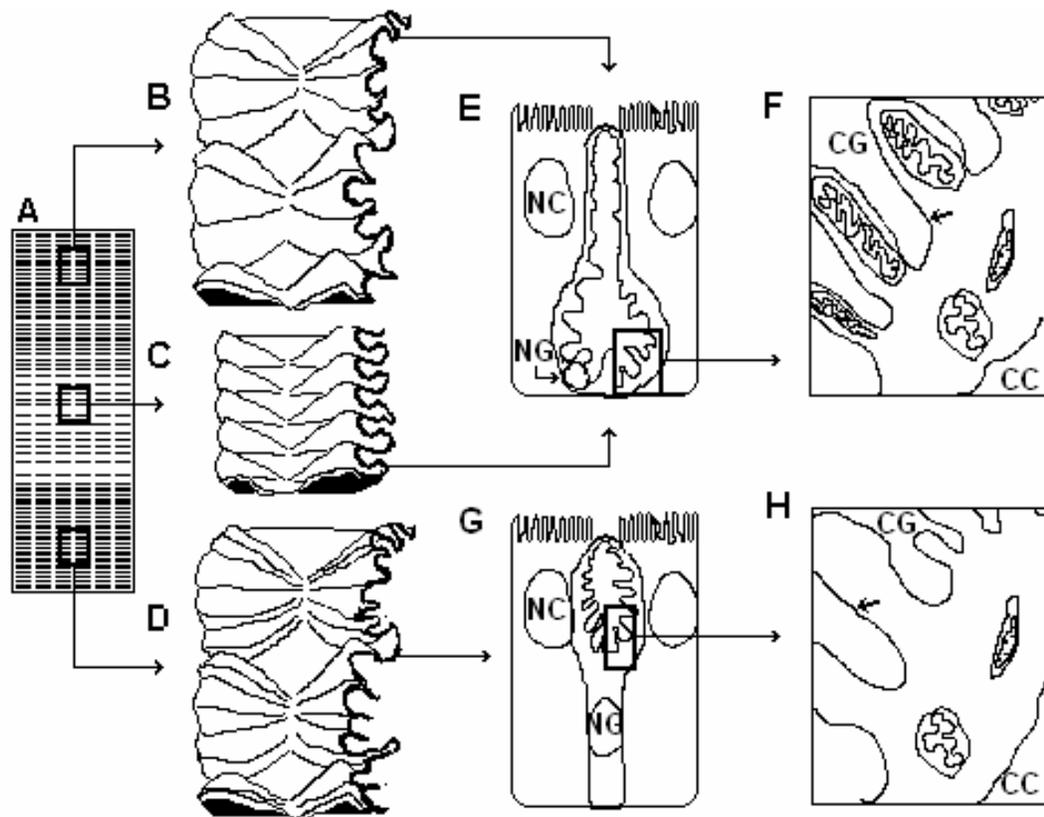


Figure I.3 : Représentation schématisée des différences de structure entre les trois segments du mésentéron de *M. sexta*. (A) montre un mésentéron isolé ouvert longitudinalement pour former un feuillet plat. Il y a six bandes plissées de tissus, parallèles les unes aux autres, séparées par une mince bande lisse. (B) à (D) montrent le repliement de chaque segment, tel que vu depuis le côté de l'hémolymphe. Ce repliement est beaucoup plus simple dans la section médiane (C) que dans les sections antérieure (B) et postérieure (D). (E) Dans les segments antérieur et médian, les cellules en gobelet ont une très large cavité basale formée par une invagination de la membrane apicale qui s'ouvre sur la lumière intestinale par une longue structure étroite et une valve refermée. (F) L'invagination de la membrane apicale de ces cellules ne laisse souvent que quelques μm d'épaisseur au cytoplasme. Par ailleurs, cette membrane est repliée en de nombreuses projections qui s'étendent vers l'intérieur de la cavité ; chacune contient une mitochondrie allongée. La membrane apicale est parsemée de petites particules, les portosomes, dont une est indiquée par une flèche. (G) Dans le segment postérieur, la cavité des cellules en gobelet n'occupe plus que la moitié supérieure de la cellule et présente une valve digestion (Dow, 1984; Martin *et al.*, 1985; Makkar et Becker, 1996). Le profil d'alcalinité suit un gradient à la fois radial et longitudinal. Le pH du contenu du

mésentéron grimpe rapidement au-dessus de celui de la nourriture ingérée, atteignant son maximum entre la moitié et les deux tiers du tube intestinal, pour ensuite plonger et retrouver dans la matière fécale un niveau semblable à celui de la nourriture ingérée (Dow, 1984; Skibbe *et al.*, 1996). Cette augmentation de l'alcalinité semble être directement générée par les deux premiers tiers du mésentéron (Dow, 1984). L'origine de ce phénomène étant le transport ionique induit par les cellules de ces segments (Section I.2.2), l'espace ectopéritrophique (entre l'épithélium et la membrane péritrophique) est le premier alcalinisé (Gringorten *et al.*, 1993). Le pH est effectivement plus élevé en bordure de l'intestin qu'en son centre, où la nourriture, ingérée à grande vitesse, est relativement protégée des mécanismes cellulaires d'excrétion responsables de l'alcalinisation. La membrane péritrophique ne constitue pas une barrière à l'alcalinisation (Gringorten *et al.*, 1993; Skibbe *et al.*, 1996). Ce profil radial caractéristique n'est pas observé chez un insecte qui vient juste de sortir d'une mue, l'absence de nourriture facilitant l'équilibration (Skibbe *et al.*, 1996). De plus, isolé dans des conditions non physiologiques, un épithélium ne peut maintenir le pH élevé à sa surface apicale (Gringorten *et al.*, 1993), ce qui indique l'importance de l'apport énergétique dans ce processus. Par ailleurs, la nature de la diète, le temps écoulé depuis le dernier repas et le stade de développement de l'insecte influencent aussi les valeurs mesurées de pH (Schultz et Lechowicz, 1986).

I.2.2 – La « Pompe à potassium » de l'intestin des lépidoptères : une H⁺-ATPase

En plus d'être riche en tannins, une diète constituée de feuilles est aussi très riche en potassium, soit d'environ 250 mM au total. Dans le mésentéron des lépidoptères, la concentration de cet ion peut atteindre 300 mM et suit un profil longitudinal similaire à celui qui est observé pour le pH. Sa concentration est cependant beaucoup plus faible dans l'hémolymphe : de 25 à 32 mM. Le gradient transépithélial de potassium, quant à lui, demeure essentiellement constant, indépendamment de la concentration initiale dans la nourriture (Dow & Harvey, 1988). Comme la différence de potentiel électrique mesurée entre la lumière de l'intestin et l'hémolymphe est de 150 mV et devrait favoriser un mouvement des ions potassium vers cette dernière, il doit nécessairement

exister un transport actif de ces ions vers la lumière intestinale, une «pompe à potassium».

Un transport de potassium contribue effectivement à l'établissement du potentiel membranaire (Harvey *et al.*, 1968). D'autre part, la diffusion facilitée des ions potassium à travers la membrane basolatérale des cellules intestinales a été mise en évidence ainsi que le fait que la pompe électrogène est située du côté apical (Wood *et al.*, 1969), spécifiquement dans les cellules en gobelet (Harvey *et al.*, 1983). De plus, le transport du potassium dans le mésentéron des larves dépend directement du métabolisme oxydatif (formation d'ATP dans les mitochondries) (Mandel *et al.*, 1980). Il est aussi rapidement devenu clair que la pompe joue un rôle dans le maintien du pH élevé dans le mésentéron en plus de contribuer à l'établissement du gradient électrochimique de potassium (Dow, 1984). Ce gradient permet aux cellules en colonne d'absorber les acides aminés. De nombreux cotransporteurs K^+ : acides aminés ont d'ailleurs été découverts dans les larves de lépidoptères et étudiés de façon détaillée (Giordana *et al.*, 1989; Sacchi et Wolfersberger, 1996; Wolfersberger, 2000). Les travaux de Wieczorek *et al.* (1986) ont montré que l'activité de la pompe n'est pas inhibée par les inhibiteurs classiques des Na^+/K^+ -ATPases, ni par ceux des F-ATPases, mais qu'elle l'est par le dicyclohexylcarbodiimide, à une dose relativement élevée (150 μ M). Une telle sensibilité à ce composé est caractéristique des V-ATPases des organites intracellulaires acides. L'analyse de l'ensemble des propriétés physiques de la pompe a permis de confirmer que la pompe est bien une V-ATPase et de proposer le modèle suivant pour le transport de potassium (Wieczorek *et al.*, 1989, 1991). La V-ATPase est en fait une pompe à protons qui produit un potentiel électrique, lequel fournit assez d'énergie pour actionner un transport actif secondaire de potassium par l'intermédiaire d'un échangeur H^+/K^+ (Schweikl *et al.*, 1989; Wiecezorek *et al.*, 1989) dont la stœchiométrie est d'un potassium extrait pour deux protons réintégrés dans la cellule (Azuma *et al.*, 1995). Le clonage du gène codant pour une première sous-unité de la pompe a permis d'établir sa séquence et de confirmer ainsi son homologie avec celle des autres V-ATPases (Gräf *et al.*, 1992). D'autre part, des anticorps dirigés contre certains segments des sous-unités de la pompe ont été utilisés pour confirmer que celles-ci sont situées dans la membrane apicale des cellules en gobelet (Klein *et al.*, 1991).

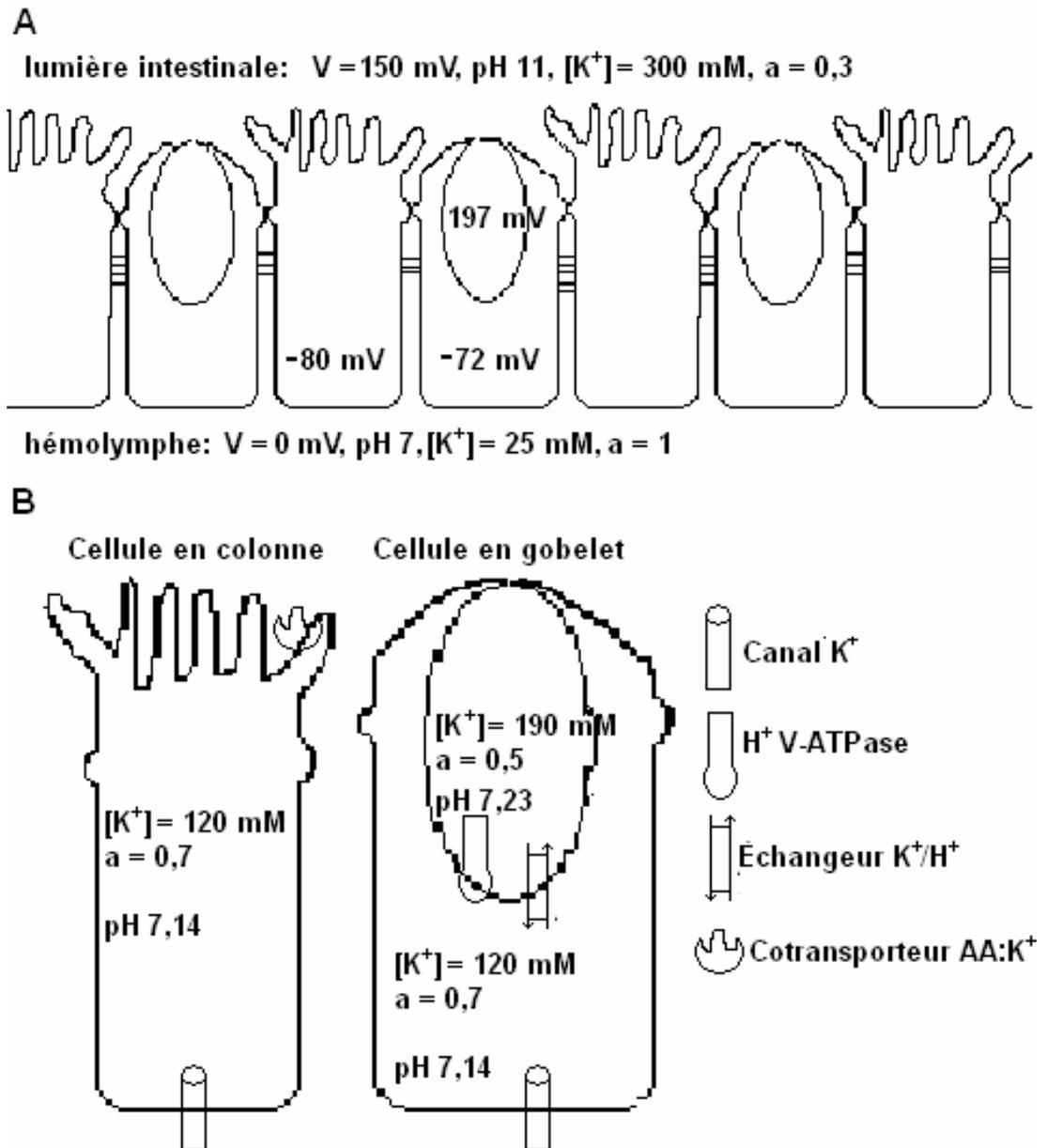


Figure I.4. **Modélisation du mésentéron médian de l'intestin d'une larve de lépidoptère.** (A) Modèle montrant les cellules en colonne et les cellules en gobelet. (B) Gros plan sur chacun de ces types de cellules. Y sont aussi indiquées des valeurs typiques de potentiels membranaires et de concentrations ioniques, des coefficients d'activité, a , de l'ion K^+ (lorsque connus) et la localisation de

Les données actuelles concernant le potentiel membranaire et les concentrations de protons et d'ions potassium libres dans le mésentéron médian sont présentées dans la figure I.4 inspirée de Martin et Harvey (1994). De façon générale, une V-ATPase comme celle de la membrane apicale des cellules en gobelet de l'intestin des larves de lépidoptères crée un gradient électrochimique de protons qui consiste en la somme d'un potentiel membranaire et d'un gradient de concentration. Aussi bien l'un que l'autre, ou

toute combinaison de ces deux gradients, peut être utilisé pour effectuer un travail utile à la cellule. Sur la base des coefficients d'activité, qui ne tiennent compte que des ions libres, les potentiels d'équilibre pour H^+ et K^+ à travers la membrane apicale des cellules en colonne, sont d'environ -258 et 2 mV, respectivement. Le potentiel mesuré au niveau de cette membrane étant d'environ -230 mV, les protons sont près de leur potentiel d'équilibre et les ions potassium en sont loin. Ce potentiel membranaire favorise donc fortement le mouvement du potassium vers l'intérieur de la cellule, d'où le rôle du gradient électrochimique de potassium dans le transport des acides aminés. À l'intérieur des cavités des cellules en gobelet, on trouve comme potentiel d'équilibre des protons environ 5 mV contre un potentiel membranaire de -269 mV. Avec une force proton-motrice d'environ -264 mV, l'entrée des protons dans la cellule est donc favorisée, une caractéristique qu'utilise la cellule pour faire fonctionner l'échangeur H^+/K^+ . Pour le potassium, le gradient chimique de part et d'autre de la membrane apicale des cellules en gobelet est pratiquement nul (en tenant compte de l'activité) et seul le potentiel membranaire très défavorable doit être vaincu pour le maintien de son gradient. Si l'on multiplie ce potentiel par la constante de Faraday, on obtient environ 26 kJ/mol, soit la quantité d'énergie qu'il faut extraire de la force proton-motrice pour transporter chaque mole de potassium. Cette énergie étant légèrement supérieure à celle que peut fournir une mole de protons, on trouve ici une confirmation à la stœchiométrie observée de deux protons pour un ion potassium.

I.3 — Mode d'action des toxines Cry à trois domaines du bacille de Thuringe dans l'intestin des larves de lépidoptères

I.3.1 – Protéolyse des toxines Cry

Une fois la δ -endotoxine solubilisée dans l'intestin médian d'un insecte cible, elle est exposée aux protéases. En une série d'étapes bien précises, ces enzymes la découpent en une protéine active (Choma *et al.*, 1990; Oppert, 1999; Rukmini *et al.*, 2000). Pour de nombreuses toxines Cry actives contre les lépidoptères et ayant un poids initial d'environ 120 kDa, la section coupée correspond à la moitié C-terminale de la protoxine ainsi qu'à un court segment à l'extrémité N-terminale. La formation du cristal dans la bactérie, puis l'activation des protoxines dans le tube digestif de l'insecte font

intervenir un fragment d'ADN fixé à la moitié N-terminale de la protoxine, ce qui procure à cet ensemble une structure qui rappelle certains virus, d'ailleurs eux aussi efficaces en milieu alcalin (Clairmont *et al.*, 1998). La toxine active composée de trois domaines, telle que décrite précédemment (Section I.1.3), provient de cette digestion. Il s'agit d'une protéine maintenant assez résistante aux protéases et suffisamment petite pour traverser la membrane péritrophique et atteindre la surface apicale de cellules formant l'épithélium, là où elle pourra se fixer sur un récepteur spécifique.

La protéine Cry9Ca (Section I.1.4) possède toutefois un site de clivage supplémentaire au niveau d'une arginine en position 164 (Lambert *et al.*, 1996). Selon la structure prédite (Chapitre IV), ce résidu est situé au cœur de la boucle inter-hélicale $\alpha 3$ - $\alpha 4$ du Domaine I. Le fragment de 55 kDa résultant de ce clivage s'est avéré non toxique pour l'insecte *Spodoptera exigua*, un lépidoptère contre lequel la Cry9Ca non clivée est active (Tableau I.I). Des mutations empêchant partiellement ou complètement l'hydrolyse de la toxine à cet endroit ont été réalisées en substituant l'arginine par une lysine ou une alanine (Lambert *et al.*, 1996).

Un tel clivage au cœur de la structure de la toxine activée n'est d'ailleurs pas unique (Figure I.5) et on ne peut pas exclure la possibilité que de telles coupures puissent jouer un rôle dans le mode d'action de plusieurs d'entre elles. D'ailleurs, plusieurs cas similaires à celui de la Cry9Ca ont été observés. La Cry3Aa, une toxine active contre certains coléoptères, est en effet clivée en un fragment de 55 kDa à l'un ou l'autre des résidus Lys158 ou His161 de sa boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (Carroll *et al.*, 1989, 1997). Dans ce cas, le fragment de 55 kDa conserve une toxicité complète contre les deux espèces de coléoptères utilisés, *Phaedon cochleariae* et *Tenebrio molitor*. Le bris d'une liaison covalente entre les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ ne nuit donc pas à la toxicité de cette protéine Cry. L'équipe ayant fait cette découverte a également mentionné, mais malheureusement sans plus de précision, qu'ils avaient aussi observé un clivage similaire dans une toxine du groupe des Cry1B (Carroll *et al.*, 1997). Un autre exemple de ce type de comportement est celui de la Cry2Aa, une toxine active contre les lépidoptère et les diptères qui, lorsqu'elle est coupée au début de son hélice $\alpha 4$, conserve sa toxicité envers *Pieris brassicae* (Nicholls *et al.*, 1989). Toutefois, ce même clivage entraîne aussi une perte de toxicité contre des larves de *L. dispar*, laquelle peut

néanmoins être restaurée si le site de clivage est aboli par mutagenèse (Audtho *et al.*, 1999). Un fragment de 57 ou de 55 kDa est aussi produit par clivage protéolytique dans la boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ des toxines Cry1Ia (Sekar *et al.*, 1997) et Cry1Ie (Guo *et al.*, 2009), deux toxines actives à la fois contre certain lépidoptères et certains coléoptères. Dans le premier cas, la toxine n'a conservé que 22% de sa toxicité contre *O. nubilalis* en absence de ce clivage alors que dans le second, la toxicité contre *P. xylostella* reste aussi forte.

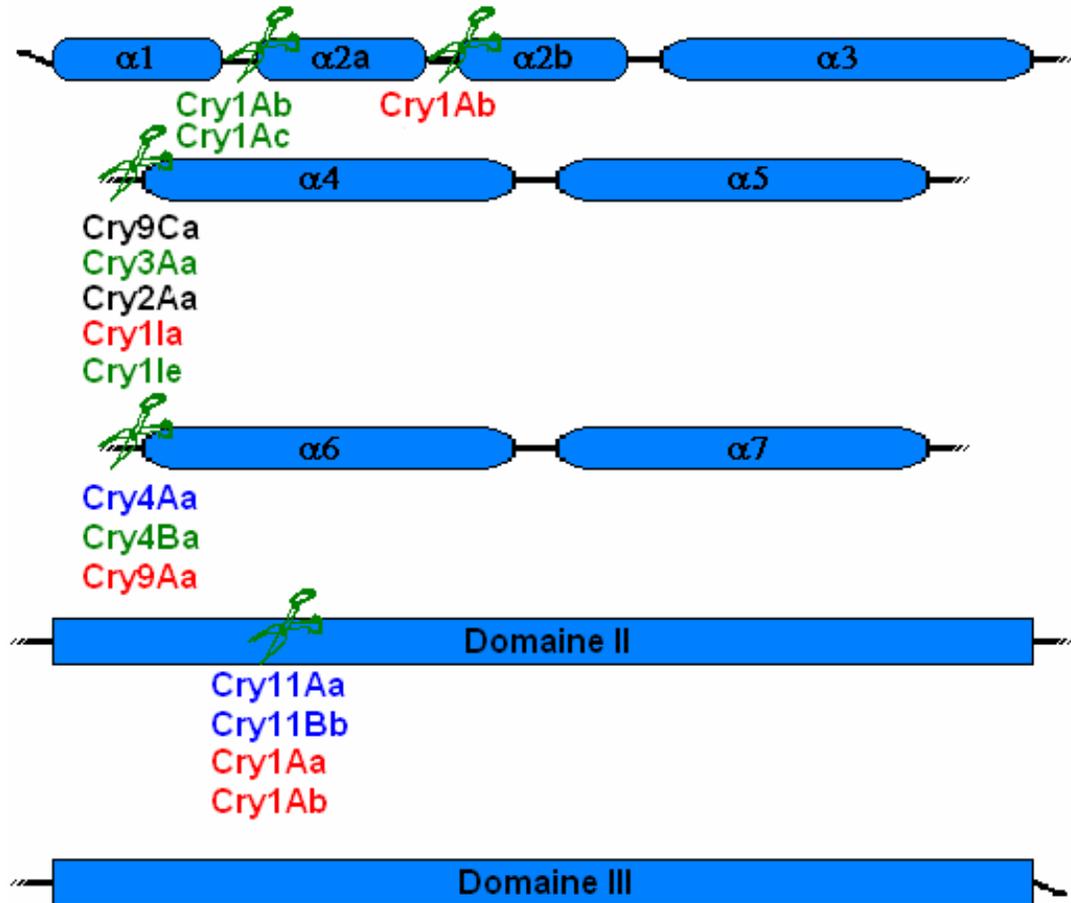


Figure I.5. Localisation de sites de protéolyse identifiés au sein des toxines Cry à trois domaines.

Les sites approximatifs de protéolyse pour lesquels un impact sur la toxicité a été publié sont identifiés à l'aide d'un modèle sommaire de la topologie des toxines Cry à trois domaines. Sous chacun d'entre eux est inscrit le nom des toxines pour lesquelles ces sites ont été identifiés, selon le code de couleur suivant: en vert, la toxicité de cette toxine n'est pas affectée par cette protéolyse, en

Un clivage entre les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ est observé dans les toxines Cry4Aa, Cry4Ba et Cry20Aa, toutes trois spécifiques aux diptères. Pour la Cry4Aa, la coupure

est faite au niveau du résidu arginine en position 235. Des fragments de 20 et de 45 kDa en résultent. Ni l'un ni l'autre de ces fragments n'est toxique pour le moustique *Culex pipiens* lorsqu'il est appliqué seul. Une activité insecticide significative est toutefois recouvrée lorsqu'ils sont utilisés simultanément (Yamagiwa *et al.*, 1999). Dans un tel cas, on peut supposer que les deux fragments peuvent demeurer liés grâce à de nombreuses interactions électrostatiques, ce qui préserverait l'intégrité de la structure tridimensionnelle de la toxine (Pang *et al.*, 1999). La mutation R235Q qui empêche ce clivage ne modifie pas la toxicité de la Cry4Aa envers le moustique *Aedes aegypti* (Boonserm *et al.*, 2004). Pour ce qui est de la Cry4Ba, elle se fait cliver à son résidu R203, ce qui résulte en deux fragments de 20 et 50 kDa. Cette fois, le plus gros de ces fragments est suffisant pour assurer la liaison à un récepteur (Buzdin *et al.*, 2002) en plus d'être toxique (Zalunin *et al.*, 1998). Néanmoins, le mutant R203A, dans lequel la coupure ne peut pas se produire, est encore plus toxique que la souche sauvage pour *A. aegypti* (Angsuthanasombat *et al.*, 1993). Quant à la Cry20Aa, elle est brisée simultanément au résidu A215 de sa boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et à son extrémité C-terminale pour donner un fragment de 43 kDa (Lee et Gill, 1997). Les auteurs présument, sans toutefois le démontrer, que ce fragment est inactif. Une quatrième toxine qui se fait cliver au niveau de la boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$ est la Cry9Aa, spécifique aux lépidoptères. Elle forme alors un fragment de 50 kDa dont la présence abaisse légèrement la toxicité de la protéine intacte envers *M. sexta* (Zalunin *et al.*, 1998).

D'autres toxines se font aussi cliver dans le premier domaine. La Cry39Aa, par exemple, se fait cliver *in vivo* en fragments de 25 et 40 kDa par les protéases intestinales du diptère *Anopheles stephensi* (Ito *et al.*, 2006). La toxine Cry8Ca, spécifique aux coléoptères, est aussi clivée dans le Domaine I, mais aucun test de toxicité n'a été effectué avec le fragment résultant de 50 kDa (Sugimura *et al.*, 1997). Des clivages limités au début du Domaine I (hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2a$) ont été démontrés pour les toxines Cry1Ab (Gómez *et al.*, 2002) et Cry1Ac (Lightwood *et al.*, 2000), deux toxines actives contre les lépidoptères. Dans le cas de la Cry1Ab, il a même été avancé que le clivage de l'hélice $\alpha 1$ était essentiel à l'oligomérisation et à la formation subséquente de pores (Gómez *et al.*, 2002; voir aussi la section suivante). Cependant, un mutant duquel le site

de protéolyse de la boucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$ a été éliminé est quand même toxique (Lebel *et al.*, 2009).

Des clivages protéolytiques ont aussi été observés dans le Domaine II de certaines protéines Cry. C'est le cas des toxines Cry11Aa et Cry11Bb, spécifiques aux diptères, et dont la pleine toxicité est restaurée lorsque les deux fragments sont utilisés de concert (Dai et Gill, 1993; Segura *et al.*, 2000; Revina *et al.*, 2004). Pour la Cry1Aa, le « noyau résistant » des trois domaines dépend grandement du type de protéase utilisée (Ogiwara *et al.*, 1992; Shao *et al.*, 1998). Lorsqu'elle est clivée entre ses brins $\beta 6$ et $\beta 7$ par la pronase ou la subtilisine, les deux segments demeurent liés. Néanmoins, la toxicité est pratiquement abolie (Pang *et al.*, 1999). La Cry1Ab se fait protéolyser en deux fragments de 30 kDa, lesquels coéluent, en chromatographie d'exclusion, avec un fragment de 58 kDa, lui-même le résultat d'un clivage au sein de la boucle $\alpha 2a$ - $\alpha 2b$ du Domaine I (Miranda *et al.*, 2001). La toxine ainsi traitée perd de sa toxicité. La Cry1Ac peut être clivée au résidu R423, situé entre les brins $\beta 9$ et $\beta 10$, par les protéases du suc intestinal de *Mamestra brassicae*, ce qui forme des fragments de 20 et 40 kDa (Lightwood *et al.*, 2000). Ce clivage a pu être prévenu par diverses mutations sans entraîner d'effets importants sur la toxicité de la protéine pour cet insecte. Une chimère combinant les Domaines I et II de la Cry1Ac avec le Domaine III de la Cry1Ca, déjà efficace contre *M. brassicae*, le devient encore plus lorsqu'on y introduit la mutation R423S. En fait, la chimère mutée engendre, en plus d'une grande mortalité, une forte inhibition de la croissance des larves survivantes (Ayra-Pardo *et al.*, 2007).

Il n'est donc pas nécessaire que les toxines Cry soient formées d'une chaîne ininterrompue d'acides aminés comprenant l'intégralité des trois domaines pour qu'elles soient actives, même si, pour plusieurs d'entre elles, les toxicités les plus élevées sont observées lorsque tous leurs fragments sont présents. On note de plus que la majorité des mutants ayant perdu leur site de protéolyse, comme le mutant R164A de la Cry9Ca (Lambert *et al.*, 1996), ont des toxicités similaires, mais pas supérieures, à celle de leur souche sauvage.

I.3.2 – Fixation de la toxine à son récepteur et modèles proposés pour le mode d'action

Une fois activées, les toxines Cry à trois domaines, avec clivage supplémentaire ou non, agissent au niveau de la membrane apicale de l'épithélium intestinal. Bien que, à de très fortes concentrations, une insertion de la toxine soit possible dans une simple bicouche lipidique, cette insertion est grandement facilitée par la présence de récepteurs spécifiques sur lesquels se fixe la toxine (Lorence *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997b; Peyronnet *et al.*, 2001). Plusieurs récepteurs, tous situés à la surface de la membrane apicale des cellules en colonne, ont été identifiés chez les lépidoptères. Les plus étudiés sont des aminopeptidases N et des protéines de type cadhérine (Pigott et Ellar, 2007). Les aminopeptidases N forment une vaste famille d'enzymes d'un poids moléculaire de 90 à 170 kDa, situées à la surface externe des membranes plasmiques, qui enlèvent un acide aminé neutre à l'extrémité N-terminale des peptides. Au moins chez les insectes, elles sont ancrées dans la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol. Dans l'intestin des lépidoptères, où plusieurs isoformes peuvent être exprimés simultanément, elles participent directement à la digestion des protéines issues de l'alimentation. Au milieu de 2007, au moins 17 aminopeptidases N pouvant fixer des toxines Cry1 et provenant de 12 espèces différentes de lépidoptères, avaient été identifiées (Pigott et Ellar, 2007). Un lien entre cette fixation et l'activité insecticide de la toxine a pu être démontré dans deux cas : celui d'une aminopeptidase N de classe 1 de *Heliothis virescens* et les Cry1A, et celui d'une aminopeptidase N de classe 4 de *Spodoptera litura* et la Cry1Ca. Dans le premier cas, on observe, en présence des toxines, une augmentation marquée de la perméabilité au rubidium de vésicules de phospholipides dans lesquelles le récepteur purifié a été reconstitué (Luo *et al.*, 1997). Dans le deuxième cas, une diminution marquée de la toxicité, consécutive à la neutralisation du gène de l'aminopeptidase avec de l'ARN complémentaire, a été mise en évidence (Rajagopal *et al.*, 2002). Pour leur part, les cadhérines sont des protéines membranaires, généralement rattachées à la membrane par un segment transmembranaire unique, caractérisées par la présence d'une répétition multiple d'un domaine de fixation du calcium. Elles peuvent jouer plusieurs rôles, notamment au niveau de l'adhésion et de la migration cellulaire, de l'organisation du cytosquelette et de la morphogenèse. Leur expression est donc finement régulée. En exprimant ces

protéines dans des lignées cellulaires, un lien direct a pu être démontré entre la fixation de toxines du sous-groupe des Cry1A à au moins cinq cadhérines issues d'autant d'espèces d'insectes et l'activité de ces toxines (Pigott et Ellar, 2007). Chez les lépidoptères, on a aussi observé une fixation de toxines Cry1A sur des glycolipides chez *M. sexta*, de la Cry1Ac sur des phosphatases alcalines chez *Heliothis virescens* et *M. sexta*, de quelques Cry1 sur une protéine glycoconjuguée de 270 kDa chez *Lymantria dispar*, et finalement de certaines Cry1A sur une protéine de 252 kDa chez *Bombyx mori* (Pigott et Ellar, 2007).

Malgré le fait que de nombreuses études ont multiplié les exemples où la Cry9Ca n'entre pas en compétition avec les Cry1A (Section I.1.4), très peu de cas de fixation ont été directement démontrés pour les toxines Cry9. La Cry9Aa se fixe, d'une part sur une protéine non identifiée de 60 kDa issue du mésentéron du lépidoptère *Galleria mellonella*, contre lequel elle est active et, d'autre part, sur une phosphatase alcaline d'*Aedes aegypti*, un diptère contre lequel elle est inoffensive (Buzdin *et al.*, 2002). Cette dernière fixation se fait sur un site de la phosphatase alcaline différent de celui qui est ciblé par les toxines effectivement toxiques contre *A. aegypti*. La Cry9Da peut se fixer sur une protéine non identifiée de 110 kDa de *B. mori* ainsi que sur une aminopeptidase N de cette même espèce (Shinkawa *et al.*, 1999). Elle entre d'ailleurs en compétition avec la Cry1Aa et la Cry1Ac pour la fixation sur cette enzyme. Un seul cas de compétition de la Cry9Ca avec une autre toxine a été documenté à ce jour. La toxine avec laquelle elle partage un même récepteur, dont la nature n'a d'ailleurs pas été élucidée, est une Cry9Ea (Hua *et al.*, 2001).

Selon le modèle défendu par l'équipe de la professeure A. Bravo, l'insertion de la Cry1Ab dans la membrane intestinale de *M. sexta* serait précédée, non pas d'une seule fixation sur un récepteur, mais bien d'une séquence de deux tels événements (Bravo *et al.*, 2004, 2007; Jiménez-Juárez *et al.*, 2008). Les monomères de la toxine se fixeraient d'abord sur une cadhérine, ce qui entraînerait un changement de conformation de la protéine qui faciliterait l'élimination par protéolyse de l'hélice $\alpha 1$. Ainsi clivés, les monomères se rassembleraient alors pour former des tétramères, appelés « pré-pores » par les auteurs. C'est alors que surviendrait la fixation sur un deuxième récepteur, une aminopeptidase N, pour lequel le pré-pore aurait une affinité supérieure à celle du

monomère. Ce ne serait qu'une fois le pré-pore fixé sur ce second récepteur que l'insertion dans la membrane, préférentiellement au niveau des radeaux lipidiques, et la formation du pore pourraient avoir lieu. Ce modèle complexe n'est toutefois pas sans problèmes. Ainsi, étant donné les affinités différentes observées pour chacun des récepteurs, les fixations successives à chacun d'eux pourraient être interprétées comme une simple indication d'une quantité beaucoup plus importante d'aminopeptidase N que de cadhérine, un fait d'ailleurs prouvé chez certaines espèces (Pigott et Ellar, 2007). Il demeure que la nécessité d'un clivage de la première hélice, l'existence d'un lien entre la cadhérine et l'oligomérisation, de même que le rôle des pré-pores oligomériques dans la formation des pores transmembranaires sont encore loin d'avoir été démontrés. Entre autres, la technique de fluorescence utilisée par l'équipe de la professeure A. Bravo pour obtenir un certain nombre de résultats à l'origine de ce modèle n'a pas su résister à une analyse critique (Kirouac *et al.*, 2003). De plus, la nécessité d'enlever, par protéolyse, l'hélice $\alpha 1$ devrait faire en sorte que la formation de pore soit empêchée en inhibant les enzymes protéolytiques. Or, même en présence d'une kyrielle d'inhibiteurs de protéases, la formation de pores est toujours observée (Kirouac *et al.*, 2006b). En fait, dans des conditions où l'activité protéolytique du tissu est élevée, comme dans des intestins d'insectes fraîchement isolés, la présence d'inhibiteurs de protéases n'empêche pas la formation des pores par la Cry1Ab, mais la stimule fortement (Fortier *et al.*, 2007a). Finalement, un tel modèle n'explique pas le rôle des autres récepteurs identifiés pour les Cry1A et ignore complètement les toxines qui, comme la Cry9Ca, ne partagent pas les mêmes récepteurs.

Un autre modèle proposé récemment remet en question l'idée même de la formation d'un pore. Selon ce nouveau modèle (Zhang *et al.*, 2005, 2006), la liaison d'un monomère de toxine à une cadhérine initie une cascade enzymatique dépendante du magnésium qui provoque la mort cellulaire. Plus précisément, la cascade implique la stimulation d'une protéine G et de l'adénylate cyclase, une hausse de l'AMP cyclique et l'activation d'une protéine kinase A, ce qui déstabilise le cytosquelette et les transports ioniques. De plus, cette cascade suicidaire s'amplifie d'elle-même en favorisant le transport de cadhérines vers la membrane plasmique, multipliant du coup les possibilités de fixation de la toxine et l'amplitude du signal mortel (Zhang *et al.*, 2008; Griko *et al.*, 2008). La pertinence d'un tel modèle, toutefois, mériterait d'être justifiée. En effet, peu

des observations desquelles il découle sont nouvelles, et aucun chercheur n'avait pour autant remis en cause la formation de pores (Pigott et Ellar, 2007). De plus, l'une de ces observations clés est que la présence d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique), mais pas celle d'EGTA (acide éthylène-glycol-*bis*[β -aminoéthyl éther]-N,N,N',N'-tétraacétique), empêche la toxine de tuer des cellules en culture dans lesquelles le gène de la cadhérine a été cloné et exprimé. Parce qu'à pH neutre et contrairement au premier de ces acides, le second fixe très peu le magnésium* les auteurs sautent à la conclusion que l'activité de la toxine dépend uniquement d'une voie de signalisation dépendante du magnésium. Pourtant, l'EDTA empêche aussi la toxine d'agir au niveau des vésicules de la membrane en bordure en brosse (Kirouac *et al.*, 2006b), un système dans lequel il est impossible qu'une voie de signalisation intracellulaire puisse être fonctionnelle. De plus, l'idée même d'une réponse biochimique de la cellule à l'activité de toxines n'a rien de bien surprenant. De nombreux changements dans la transcription des gènes ont d'ailleurs été observés même à une dose de toxine qui n'est pas létale (Meunier *et al.*, 2006; van Munster *et al.*, 2007). Rien n'indique toutefois que ces changements ne soient dus qu'à la seule fixation de la toxine plutôt qu'à la formation des pores et à l'abolition des gradients ioniques essentiels au fonctionnement de la cellule qui en découle. De même, les cadhérines ne sont pas les seuls récepteurs dont la concentration dans la membrane change suite à l'activité des toxines Cry. Un important relargage des protéines liées à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol, dont les aminopeptidases N, a récemment été démontré (Valaitis, 2008). Or, les aminopeptidases N ne jouent aucun rôle dans le modèle de Zhang *et al.* Il faudrait peut-être considérer plus sérieusement un modèle qui prédit l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire suivant la fixation de la toxine en plus de la formation de pores (Jurat-Fuentes et Adang, 2006), bien qu'un tel modèle demeure extrêmement spéculatif (Pigott et Ellar, 2007).

I.3.3 – « Pompe à potassium » et intoxication par les toxines Cry

Une fois fixées à un récepteur spécifique de la membrane en bordure en brosse des cellules en colonne du mésentéron d'une larve d'un lépidoptère sensible, les toxines

* Le pK_{MZ} de l'EGTA liant le magnésium n'étant que de 5,2 contre 8,7 pour l'EDTA, à 20°C et 0,1 M de force ionique (Schwarzenbach et Flaschka, 1969)

y forment des pores faiblement sélectifs aux cations (Schnepf *et al.*, 1998; Gringorten, 2001; Kirouac *et al.*, 2002). Bien que de nombreux états de conductance aient été observés *in vitro* (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993, 1997b; Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001, 2002), des recherches récentes démontrent qu'il s'agit en fait de multiples d'une même conductance de base, estimée à 10 pS dans le cas de la Cry1Ca, lorsque les pores sont formés en présence de 300 mM de KCl (Peyronnet *et al.*, 2002). Ces résultats mettent en évidence la présence non pas de pores de différentes tailles, mais plutôt d'agrégats, plus ou moins grands, de pores d'une même taille fonctionnant de façon coopérative. De tels pores sont tout de même assez larges pour laisser diffuser des ions divalents, un trisaccharide (le raffinose) et divers acides aminés (Kirouac *et al.*, 2002). La conséquence physiologique immédiate de la formation de ces pores est l'abolition du potentiel membranaire et des gradients de potassium et de pH (Wolfersberger, 1992; Gringorten, 2001).

Le courant électrique mesuré à travers un intestin de *M. sexta* dont le potentiel transépithélial est maintenu constant chute de 60 à 70% de sa valeur initiale en moins de 40 minutes suivant une application de toxine du côté apical (Harvey et Wolfesberger, 1979). Ce long délai s'explique en partie par le fait que ces expériences, qui datent d'une trentaine d'années, ont été réalisées avec de la protoxine. On sait maintenant que celle-ci doit être activée avant de pouvoir interagir avec la membrane cellulaire (Section I.3.1). Dans les expériences de gonflement osmotique réalisées avec des vésicules de membrane en bordure en brosse, l'effet maximal de la toxine déjà pleinement activée n'est observé qu'après quelques dizaines de secondes qui semblent nécessaires pour son interaction avec les récepteurs et la formation des pores (Fortier *et al.*, 2007b). Dans un premier temps, le transport actif n'est pas modifié et la baisse du courant net qui est observée s'explique par un flux presque triplé en direction opposée, du côté luminal vers le côté basolatéral (Pendleton, 1970; Harvey et Wolfesberger, 1979). Cette baisse de courant s'explique aussi, tant que la jonction de type « gap » entre les cellules en colonne et en gobelet reste ouverte et que la pompe à potassium reste fonctionnelle, par un courant futile de potassium : aussitôt pompé vers l'extérieur, l'ion retourne dans la cellule en passant par les pores formés par la toxine (Crawford et Harvey, 1988). L'importance de ce courant futile peut se mesurer ainsi : il y a d'une part, suivant Knowles et Dow (1993), une cellule en gobelet qui pompe environ 10^{11} ions K^+ chaque

seconde et, d'autre part, un pore de toxine Cry, d'une conductance linéaire à cet ion de 10 pS (Peyronnet *et al.*, 2002), présent dans une membrane où règne initialement une différence de potentiel de 230 mV (Figure I.4) et qui peut donc laisser passer un courant maximal de 2,3 pA, c'est-à-dire d'environ 14×10^6 ions par seconde. Dans ces conditions, et considérant qu'il y a généralement deux cellules en colonne pour chaque cellule en gobelet, il faudrait près de 3500 pores sur chaque cellule en colonne pour annuler immédiatement l'effet de la pompe à potassium. Ce calcul illustre donc le fait que l'effet des toxines n'est pas immédiat.

Un mécanisme complet pour expliquer la mort cellulaire suivant la formation des pores a été proposé par Knowles et Dow (1993). Au départ, la cellule possède un fort potentiel membranaire généré par la pompe à potassium et un gradient électrochimique considérable pour tous les ions présents et en particulier pour les protons. Or, la présence d'un pore facilite le passage de ces ions au travers de la membrane plasmique. Les pores des toxines Cry étant peu sélectifs, le fort gradient de pH entraîne, dès leur formation, un important flux de protons depuis le cytoplasme (pH de 7.14) vers la lumière intestinale (pH de 11 ou plus encore). Le potentiel membranaire tend alors vers le potentiel de Nernst des protons, inférieur à -225 mV. Ce flux, tout comme celui du potassium, est toutefois si important que le fort gradient chimique ne peut être maintenu longtemps. En conséquence, le potentiel membranaire s'abaisse rapidement. En accord avec le modèle de Knowles et Dow (1993), la Cry1Ca permet au pH intracellulaire des cellules Sf9 de s'équilibrer avec celui du milieu (Vachon *et al.*, 1995).

Des changements dans les potentiels membranaires ou dans le pH cytoplasmique sont deux mécanismes connus pour fermer les jonctions de type « gap ». En conséquence, l'étape suivante du processus suggéré par Knowles et Dow (1993) implique la fermeture de ces jonctions, un événement qui se produit rapidement suivant une intoxication aux toxines Cry (Lane *et al.*, 1989). Après cette fermeture, le cycle futile des ions potassium cesse, la pompe ayant perdu sa principale source d'ions potassiques. Le potassium ne peut plus s'échapper des cellules en colonne que par les canaux basolatéraux dont la conductance est inférieure à celle des pores. Il en résulte une augmentation marquée de la concentration ionique dans le cytoplasme qui induit un gonflement osmotique incontrôlable conduisant irrémédiablement à la lyse de la cellule.

La cellule en gobelet, quant à elle, voit sa cavité gonfler et son cytoplasme rétrécir, probablement parce que la concentration en macromolécules est plus importante dans la cavité. Sa pompe reste fonctionnelle longtemps après la lyse des cellules en colonne. Son action continue mène rapidement à une diminution des concentrations d'ATP, de H⁺ et de K⁺ dans le cytoplasme. Son inhibition sera causée principalement par l'épuisement des réserves d'ATP. La hausse du pH intracellulaire dans la cellule en gobelet avant la fermeture de la jonction a, quant à elle, un effet inhibiteur sur la synthèse d'ATP dans les mitochondries. En d'autres termes, la hausse du pH (donc la baisse du nombre de protons disponibles) et la rareté de l'ATP inhibent la V-ATPase avant que la cellule n'ait pompé tout les ions potassium dans la cavité. Ceci contribue à empêcher le gonflement incontrôlé des cellules en gobelet (Knowles et Dow, 1993).

I.3.4 – Formation des pores

Le modèle de Knowles et Dow (1993) décrit les importants changements que les pores formés par les toxines engendrent dans le micro-environnement immédiat des membranes cellulaires. Mais la formation des pores est elle-même grandement influencée par l'état de ce micro-environnement. Des études théoriques (Biggin et Sansom, 1996) et expérimentales (Lemeshko *et al.*, 2005) ont mis en évidence que la présence d'un potentiel membranaire, par exemple, pouvait faciliter l'insertion de peptides α -hélicaux correspondant à des segments que l'on retrouve dans le Domaine I de certaines toxines Cry à trois domaines. De même, des effets différentiels du pH sur le mode d'action de certaines toxines Cry ont été observés (Tran *et al.*, 2001). En effet, la capacité de la toxine Cry1Ac à former des pores dans les vésicules de membranes en bordure en brosse de *M. sexta* demeure semblable sur l'ensemble du spectre physiologique du pH, soit de 7,5 à 10,5 alors que celle de la Cry1Ca est fortement réduite à des pH supérieurs à 9. Dans les deux cas, le résultat obtenu à pH élevé se rapprochait qualitativement des résultats *in vivo* (bioessais) pour ces deux toxines. Cette corrélation entre résultats *in vivo* et *in vitro* contrastait toutefois avec ceux qui avaient été obtenus à l'aide d'une seconde technique *in vitro*, celle-là utilisant une sonde fluorescente. Dans les conditions expérimentales propres à cette technique, la Cry1Ac et la Cry1Ca montraient en effet toutes deux une forte activité formatrice de pores à pH 10,5 (Kirouac *et al.*, 2003). La principale différence entre les conditions expérimentales

utilisées avec la sonde fluorescente et celles qui sont utilisées pour les expériences de gonflement osmotique est que, lorsque l'on travaille avec la sonde fluorescente, les toxines et les vésicules doivent être incubées en présence d'une force ionique élevée, généralement 150 mM de KCl. La confrontation des résultats obtenus pour la Cry1Ca avec chacune de ces deux techniques suggérait donc que la force ionique jouait un rôle plus important que le pH dans la formation de pores par cette toxine. Cette suggestion fut vérifiée à l'aide d'une méthode électrophysiologique (Fortier *et al.*, 2005) développée auparavant dans notre laboratoire (Peyronnet *et al.*, 1997). Cette technique, fort polyvalente, nécessite toutefois la présence d'au moins 5 mM de calcium, un ion généralement absent des expériences de fluorescence ou de gonflement osmotique. Une série supplémentaire d'expériences de gonflement osmotique, cette fois en présence de calcium, permet d'harmoniser entièrement les résultats obtenus pour la Cry1Ac et la Cry1Ca avec chacune des trois techniques et ainsi confirmer l'importance de la force ionique pour la formation des pores. Parallèlement à ces travaux, la technique de gonflement osmotique a aussi permis de démontrer que l'effet du pH sur l'activité de la toxine se fait sentir directement au niveau de la formation des pores plutôt que sur les propriétés des pores déjà formés (Vachon *et al.*, 2006; Fortier *et al.*, 2005).

L'insertion de la toxine nécessite une réorganisation de sa structure tridimensionnelle. Selon le modèle en canif, les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ s'éloignent du corps du Domaine I, telle la lame d'un canif, et s'insèrent dans la membrane lipidique (Hodgman et Ellar, 1990; Knowles, 1994). Le modèle en parapluie propose plutôt que les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, d'une part, et les hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$, de même que l'ensemble des Domaines II et III, d'autre part, s'éloignent de la structure en épingle à cheveux formée par les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$. Ces deux hélices s'inséreraient alors dans la membrane et $\alpha 4$ tapisserait la lumière du pore (Schwartz *et al.*, 1997a; Gazit *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999; Gerber et Shai, 2000; Aronson et Shai, 2001; Girard *et al.*, 2008, 2009a) alors que le reste de la protéine s'étalerait sur la surface membranaire. D'autres modèles d'insertion, incluant celui dit du « dragon enterré », vont toutefois plus loin et proposent que c'est la quasi-totalité de la protéine qui s'insère dans la membrane (Loseva *et al.*, 2001; Alzate *et al.*, 2006; Tomimoto *et al.*, 2006; Nair et Dean, 2008; Nair *et al.*, 2008).

Les changements de conformation impliqués par les différents modèles d'insertion discutés ci-dessus laissent sous-entendre que les boucles inter-hélicales du Domaine I de la toxine pourraient jouer un rôle important dans son insertion. Or, dans l'ensemble, ces boucles ont été peu étudiées. Une cystéine a récemment été introduite par mutagenèse dirigée dans chacune des boucles inter-hélicales du Domaine I de la Cry1Aa (Lebel *et al.*, 2009). La majorité des mutants ainsi produits ont montré une formation de pore semblable, ou réduite par rapport, à celle de la souche sauvage. Un mutant, V150C, présentant une modification dans la boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$, s'est toutefois révélé inactif alors qu'un autre, I88C, modifié dans la boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$, s'est plutôt révélé plus rapide à former des pores que la souche sauvage. De tels résultats ne semblent pas appuyer ni l'un ni l'autre des modèles proposés, sans toutefois contredire le modèle du « dragon enterré » de Tomimoto *et al.* (2006) (Lebel *et al.*, 2009). Dans une étude subséquente, plusieurs mutants cystéine de la Cry1Aa, incluant ceux de l'étude qui vient d'être discutée, furent préparés en conditions réductrices afin d'éviter l'oxydation du groupement thiol des cystéines puis soumis à diverses modifications chimiques. Ainsi traités, seuls les mutants modifiés au niveau de leurs boucles $\alpha 3$ - $\alpha 4$, $\alpha 4$ - $\alpha 5$ et $\alpha 5$ - $\alpha 6$ subissent un changement significatif de leur activité formatrice de pores. De tels résultats appuient le modèle en parapluie (Girard *et al.*, 2009a).

Chapitre II

Présentation de la recherche

II.1 — Mise en contexte

Le projet initial, qui ne devait constituer qu'un mémoire de maîtrise, a pris forme au printemps de l'an 2000. Il s'agissait alors de déterminer, à l'aide de la technique de gonflement osmotique mesuré par diffusion lumineuse (Carroll et Ellar, 1993), si l'ajout de suc intestinal aux solutions de base utilisées avec cette approche expérimentale permettrait de réconcilier les résultats obtenus préalablement pour certaines toxines Cry avec les résultats *in vivo*. Malheureusement, les vésicules se sont rapidement montrées instables en présence de suc intestinal, même à de très faibles concentrations. Le projet a donc dû être mis de côté.

L'été de l'an 2000 commençait à peine qu'un nouveau projet m'était proposé. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Jeroen Van Rie, chercheur chez Aventis Cropscience (anciennement Plant Genetic Systems, devenue depuis Bioscience NV, une division de Bayers Cropscience, logée à Gand en Belgique), financée par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, notre laboratoire avait reçu une série de mutants de la Cry9Ca (Section I.1.4). Il s'agissait des mutants R164A et R164K (Section I.3.1), et d'une série de doubles mutants ayant tous la mutation R164A et une seconde substitution qui introduit, neutralise ou renverse une charge électrique dans l'une ou l'autre des boucles inter-hélicales du Domaine I de la toxine. Ces boucles étant peu étudiées, ces mutants fournissent une occasion idéale d'en apprendre plus sur leur rôle dans le processus de formation de pores dans la membrane. Il fut donc décidé de les étudier systématiquement à l'aide de la technique de gonflement osmotique.

Le travail concernant les mutants de la Cry9Ca avançait rondement et les premiers résultats furent présentés dans le cadre de la 128^e (2001) réunion annuelle de la Société d'entomologie du Québec, à Belœil au Québec. Parmi ces résultats, toutefois, se trouvait une surprise de taille. Malgré une activité mesurable à l'aide de la diffusion lumineuse dans les conditions de base, à pH 7,5, la Cry9Ca et la très grande majorité de ses mutants se sont révélés tout à fait inactifs à un pH comparable à celui qu'on retrouve

dans l'intestin des lépidoptères, et ce, même si la toxicité de la toxine parentale contre *M. sexta* était connue (Lambert *et al.*, 1996) . Des travaux antérieurs (Coux *et al.*, 2001) avaient montré qu'une protéine Cry non toxique pouvait être active dans les conditions habituelles de l'expérience de gonflement osmotique. Pour la première fois, nous nous retrouvions face à la situation inverse. Ces résultats soulignaient à nouveau la question de l'importance du micro-environnement. Le projet initial, abandonné depuis plus d'un an, sur le rôle du micro-environnement, et le projet l'ayant remplacé, sur les mutants de la Cry9Ca, se trouvaient donc plus étroitement liés qu'on aurait pu le prévoir au départ. En effet, pour effectuer une analyse intéressante des résultats déjà obtenus sur ces mutants, il fallait d'abord expliquer les résultats imprévus obtenus avec la souche parentale. De plus, il fallait faire appel à une technique praticable en présence de suc intestinal. Une méthode électrophysiologique développée quelques années plus tôt dans notre laboratoire (Peyronnet *et al.*, 1997) nous apparut très prometteuse. Devant le grand intérêt et l'ampleur du projet, il fut décidé que j'effectuerais un passage direct au doctorat, ce qui fut officialisé au printemps 2002.

II.2 — Présentation des travaux

Le présent travail de doctorat vise deux aspects fondamentaux de la formation de pores par la protéine Cry9Ca. D'une part, il est question d'étudier l'effet du micro-environnement physico-chimique de l'intestin de l'insecte sur la formation de pores et, d'autre part, en se penchant sur la structure de la protéine elle-même, d'approfondir le rôle que jouent les boucles inter-hélicales du Domaine I dans la formation des pores.

II.2.1 – Structure tridimensionnelle de la Cry9Ca

Avant d'entreprendre ces études, il parut utile de mieux connaître la structure de la toxine. En effet, aucune structure cristallographique n'a été résolue pour la Cry9Ca. Une telle structure ayant toutefois été élucidée pour plusieurs toxines Cry similaires (Section I.1.3), il était possible, en se basant sur elles, de produire une structure par homologie de la Cry9Ca. Le résultat de cette opération est présenté dans le chapitre IV.

II.2.2 – Étude de l'influence du micro-environnement sur le mode d'action de la Cry9Ca à l'aide d'une technique de gonflement osmotique

Bien qu'initiés dès le début de mes études supérieures, les travaux effectués sur le mode d'action de la toxine Cry9Ca en utilisant la technique de gonflement osmotique mesuré à l'aide de la diffusion lumineuse se sont échelonnés sur la presque totalité de la durée de ces études. Plus particulièrement, en ce qui a trait à l'étude du rôle du micro-environnement, les travaux ont d'abord été effectués en 2002 avec la souche sauvage de Cry9Ca et les deux mutants simples R164A et R164K. Une deuxième série de travaux a été réalisée sporadiquement de 2005 à 2008 avec l'ajout du fragment de 55 kDa. Ces travaux sont présentés dans le chapitre V. Comme il s'agissait de mes premiers travaux sur la Cry9Ca, ce chapitre comprend aussi les résultats de toxicité obtenus grâce à une série de bioessais effectués de l'été 2004 au printemps 2006. Ces études étaient effectivement importantes pour établir avec certitude la toxicité de notre protéine Cry et de ses dérivés, et particulièrement du fragment de 55 kDa, contre le sphinx du tabac (*M. sexta*). Divers résultats préliminaires de cette étude ont été présentés dans le cadre des événements suivants : les 20^e (2002) et 21^e (2003) symposiums annuels du Groupe de recherche en transport membranaire (rebaptisé depuis le Groupe d'étude des protéines membranaires) à Montréal, la 5^e (2002) Conférence internationale francophone d'entomologie, à Montréal, les 3^e (2003) et 4^e (2004) réunions annuelles du Réseau Biocontrôle du Canada, respectivement à Halifax en Nouvelle-Écosse et Windsor en Ontario, le 72^e (2004) congrès de l'ACFAS, l'Association francophone pour le savoir, à Montréal, ainsi que la 36^e (2003) réunion annuelle de la *Society for Invertebrate Pathology*, à Burlington au Vermont.

II.2.3 – Étude de l'influence du micro-environnement sur le mode d'action de la Cry9Ca à l'aide d'une technique électrophysiologique

Bien que le volet « gonflement osmotique » de l'étude du rôle du micro-environnement physico-chimique ait permis de mieux connaître le comportement de la toxine, l'approche expérimentale de choix pour l'étude de l'influence du micro-environnement est demeurée, telle que choisie lors du passage au doctorat (Section II.1), l'étude électrophysiologique. La grande polyvalence de cette technique a pu être mise à

profit et l'activité de la toxine Cry9Ca et de ses mutants simples a été, de l'hiver 2002 à l'automne 2007, testée avec six ensembles de conditions expérimentales différentes. Les résultats de ces tests sont décrits dans un second article qui est présenté dans le chapitre VI. De nombreux résultats préliminaires furent présentés en même temps que les résultats de gonflement osmotique (Section II.2.2) et dans le cadre de la 38^e (2005) réunion annuelle de la *Society for Invertebrate Pathology*, à Anchorage en Alaska.

II.2.4 – Étude du rôle de résidus des boucles du Domaine I de la Cry9Ca

Le troisième article présenté dans cette thèse contribue à la recherche concernant son deuxième thème, c'est-à-dire l'étude du rôle des boucles inter-hélicales du Domaine I de la toxine Cry9Ca dans son mode d'action. Pour ce faire, nous avons mis à profit les mutants doubles fournis par le Dr. J. Van Rie. Bien que plusieurs données aient été recueillies à l'aide de la technique de gonflement osmotique avant mon passage au doctorat, les résultats obtenus à la même époque avec la souche sauvage de Cry9Ca nous ont plutôt incités à recentrer la recherche sur l'approche électrophysiologique. Chaque mutant fut alors testé successivement en présence de suc intestinal et d'inhibiteurs de protéases, ces deux ensembles de conditions physico-chimiques étant ceux qui s'étaient avérés les plus appropriés pour l'étude de la souche sauvage. Ces résultats *in vitro* furent complétés par une série de bioessais. Les résultats obtenus avec chacune de ces techniques sont présentés et discutés dans le chapitre VII. Certains résultats préliminaires ont aussi été présentés dans le cadre des événements suivants : le 24^e (2006) symposium annuel du Groupe d'étude des protéines membranaires et sa première journée scientifique (2007), tous deux à Montréal, et la 5^e (2006) réunion annuelle du Réseau Biocontrôle du Canada, à Kananaskis en Alberta.

II.2.5 – Contribution des coauteurs

Les articles reproduits dans les chapitres V, VI et VII sont cosignés par plusieurs co-auteurs. Pour le premier article, Vincent Vachon, Marc Juteau, Jeroen Van Rie, Geneviève Larouche, Charles Vincent, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade se sont joints à moi. Pour le second, j'ai été secondé de Vincent Vachon, Mireille Marsolais, Jeroen Van Rie, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade. Pour le troisième, enfin,

Vincent Vachon, Mireille Marsolais, Greta Arnaut, Jeroen Van Rie, Lucie Marceau, Geneviève Larouche, Charles Vincent, Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade m'ont prêté main forte. V. Vachon a réalisé un certain nombre d'expériences de gonflement osmotique et la compilation de leurs résultats. Il a de plus contribué à l'encadrement au quotidien du travail et à la rédaction finale des manuscrits. En plus de procéder à quelques tests biochimiques, M. Juteau fut d'une aide précieuse pour l'élaboration du protocole de purification de la Cry9Ca et de ses dérivés et pour en avoir assuré, avec l'aide de L. Marceau, la production. J. Van Rie nous a fourni les souches bactériennes à l'origine de cette production (souche sauvage, mutants simples R164A et R164K, de même que de l'ensemble des doubles mutants). G. Arnaut a assuré la mutagenèse pour les mutants doubles. G. Larouche a réalisé la partie des bioessais effectués dans les laboratoires d'Agriculture Canada à St-Jean-sur-Richelieu sous la direction de C. Vincent. M. Marsolais a effectué quelques expériences d'électrophysiologie en plus d'assurer un soutien technique indispensable au bon fonctionnement de ces expériences. J.-L. Schwartz a fourni un espace en laboratoire essentiel à la production des toxines de même qu'un soutien scientifique et financier. Enfin, R. Laprade, en tant que directeur de thèse, a dirigé l'ensemble des travaux, révisé les manuscrits et fourni un soutien scientifique et financier constant.

Pour ma part, pour le premier article, j'ai réalisé une grande part des expériences de gonflement osmotique et de biochimie. Pour les premier et troisième articles, j'ai été responsable de la planification des bioessais et réalisé une partie importante de ceux qui ont été effectués à l'Université de Montréal. Pour les deuxième et troisième articles, j'ai effectué la quasi-totalité des expériences d'électrophysiologie. Pour les trois articles, enfin, je suis aussi le principal compilateur et analyste des résultats de l'ensemble des expériences en plus d'avoir rédigé le premier jet de chaque manuscrit ainsi que les versions subséquentes en tenant compte des commentaires des co-auteurs.

Chapitre III

Matériel et Méthodes

III.1 — Production de la toxine Cry9Ca du bacille de Thuringe

Les souches bactériennes utilisées pour la production de la toxine Cry9Ca et de l'ensemble de ses mutants nous ont été fournies par le Dr. Jeroen Van Rie, chercheur chez Bayer Bioscience NV, à Gand en Belgique. La structure primaire de la souche sauvage de la Cry9Ca1 est donnée dans le premier article consacré à cette toxine (Lambert *et al.*, 1996) de même que sur Internet, avec pour numéro d'accèsion le CAA85764 (ou Z37527 pour le gène). On peut notamment consulter le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=547556>.

III.1.1 – Modélisation par homologie

La structure de la Cry9Ca a été modélisée par homologie avec le logiciel en ligne Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>; Peitsch, 1995, 1996; Guex et Peitsch, 1997). Les structures tridimensionnelles cristallographiques connues de trois autres toxines du bacille de Thuringe, soit celles de la Cry1Aa (fichier PDB 1CIY), de la Cry2Aa (1I5PA) et de la Cry3Aa (1DLC), ont été utilisées à titre de modèles de référence. La demande, présentée avec la séquence de la Cry9Ca, a été soumise au site Internet du logiciel et une structure a été retournée le jour même sous la forme d'un fichier PDB (AAAa0D4Cy.pdb). Ce fichier a par la suite été décodé, consulté et analysé à l'aide du logiciel Swiss PdbViewer (Version 3.7b2, Glaxo Wellcome Experimental Research, Genève, Suisse).

III.1.2 – Production, Activation et Purification de la toxine

La souche sauvage de la Cry9Ca et l'ensemble de ses mutants ont été préparés à partir de souches de *Escherichia coli* WK6 produisant la toxine recombinante appropriée grâce à l'inclusion d'un plasmide contenant l'entièreté du gène de la toxine (Lambert *et al.*, 1996). Ces bactéries ont été cultivées dans un milieu TB (Lambert *et al.*, 1996) additionné de 100 µg/mL d'ampicilline. Lorsque la densité optique à 600 nm a atteint

0,6 ± 0,2, l'expression du gène de la toxine a été induite à 28°C par l'addition d'isopropyle-β-D-thiogalactoside à une concentration finale de 1 mM. La Cry1Ac, utilisée comme contrôle positif dans certaines expériences, a été produite à partir de la souche HD73 de *B. thuringiensis*, cultivée dans un milieu YT contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Girard *et al.*, 2008). Les protoxines, isolées selon la technique décrite par Masson *et al.* (1990), ont été activées avec de la trypsine d'origine porcine (1 mg de trypsine pour 10 mg de protoxine). Afin de minimiser la conversion de la Cry9Ca et du mutant R164K en fragments de 55 kDa, l'activation a été arrêtée à l'aide d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem, San Diego, Californie) composé de 100 mM de AEBSF (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonylfluoride-HCl), 80 µM d'aprotinine, 5 mM de bestatine, 1,5 mM de E-64 (*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane), 2 mM de leupeptine et 1 mM de pepstatine A et dilué 100 fois. Pour isoler ce fragment de 55 kDa, par contre, de la trypsine fraîche a été régulièrement ajoutée à une préparation de protoxine de la souche sauvage de Cry9Ca jusqu'à ce que la conversion soit complète. Les toxines activées ont été purifiées par chromatographie en utilisant une colonne échangeuse d'ions de type mono-Q (Pharmacia Biotech, Montréal) et en éluant la toxine fixée à l'aide d'un gradient de NaCl allant de 50 à 500 mM (Masson *et al.*, 1990, 1994). Elles ont finalement été diluées à 2 mg/mL. La qualité de chaque préparation a régulièrement été vérifiée par électrophorèse.

III.2 — Manipulation des insectes

Les oeufs fertilisés de sphinx du tabac (*Manduca sexta*) ont d'abord été obtenus de la Carolina Biological Supply Company (Burlington, Caroline du Nord), puis de l'insectarium du département d'entomologie de la North Carolina State University (Raleigh, Caroline du Nord), et après éclosion, les larves ont été élevées sur la nourriture artificielle fournie avec les insectes.

III.2.1 – Bioessais

Des larves de sphinx du tabac du stade néonatal ont été installées isolément sur une surface de nourriture artificielle contaminée avec la toxine (Girard *et al.*, 2008). Les puits de nourriture, d'une grandeur de 1,8 cm², ont d'abord été recouverts de toxine (ou de protoxine) diluée dans un tampon phosphate. Ils ont ensuite été séchés avant de

recevoir chacun une chenille de sphinx du tabac. Les insectes ont été conservés pour une semaine à 27°C et à une humidité relative de 70%. Chacune des toxines a été testée sur au moins dix groupes de vingt-cinq larves, et ce pour chacune des concentrations choisies. La mortalité et, pour les insectes survivants, la prise de poids ont été notées à la fin de la semaine. La mortalité mesurée a été corrigée pour tenir compte de celle du groupe témoin, élevé en absence de toxine. Pour la Cry9Ca sauvage, les deux mutants simples et le fragment de 55 kDa, des doses-réponses complètes ont été générées avec des tests à six concentrations différentes. Les données de dose-réponse ont été traitées par analyse de probit (Finney, 1971). Les concentrations nécessaires pour tuer 50 et 90% des larves (LC₅₀ et LC₉₀) ainsi calculées ont ensuite été comparées à l'aide du logiciel InStat software (Graphpad Software Inc., San Diego, Californie). Quant aux doubles mutants, ils ont d'abord été testés à une concentration barème de 10 µg/mL, proche de la valeur calculée pour la LC₉₀ du mutant R164A. Si le mutant s'avérait toxique à cette première dose, il était testé à nouveau à une dose de 5 µg/mL, cette fois proche de la LC₅₀ de R164A. Sinon, le deuxième test était effectué à une dose 10 fois plus élevée.

III.2.2 – Isolement de l'intestin médian de *M. sexta*

Afin d'être utilisés pour des mesures de potentiel membranaire, des intestins complets ont été isolés de larves du troisième stade, débarrassés de leurs tubules de Malpighi et de leur membrane péritrophique, vidés de leur contenu et enfin rincés dans le tampon physiologique de l'expérience (Peyronnet *et al.*, 1997; Fortier *et al.*, 2007a). D'un intestin ayant subi un tel traitement, un petit segment a finalement été prélevé pour être aspiré dans une pipette de soutien et ainsi être intégré au montage expérimental (Section III.3.2).

III.2.3 – Production des vésicules de membrane en bordure en brosse

Pour la fabrication de vésicules de membranes en bordure en brosse, des intestins complets ont été isolés de larves du cinquième stade, débarrassés de leurs tubules de Malpighi, coupés longitudinalement pour en retirer le contenu et la membrane péritrophique, et enfin rincés dans un tampon glacial (Tran *et al.*, 2001). Les intestins ainsi traités pouvaient être conservés plusieurs mois à -80°C. Les vésicules ont été

préparées selon la méthode de Wolfersberger *et al.* (1987), laquelle combine précipitation au Mg^{2+} de l'intestin préalablement homogénéisé et centrifugation différentielle, le tout étant effectué au frais (4-8°C).

III.2.4 – Isolement et Traitement du suc intestinal de *M. sexta*

Le contenu d'intestins isolés de larves du cinquième stade a été recueilli dans un tube et soumis à une centrifugation à $7500 \times g$ pendant 10 minutes (Fortier *et al.*, 2007a). Le matériel insoluble a été jeté alors que le surnageant, le suc intestinal, a été conservé en petits échantillons congelés à -80°C. Le suc pouvait ainsi être conservé plusieurs années avant son utilisation. Le jour de l'expérience, le suc dégelé était conservé sur de la glace pour un maximum de 7 heures.

Pour certaines expériences, le suc a d'abord été chauffé 5 minutes par immersion dans de l'eau à 95°C. Le suc ainsi traité a été soumis à une centrifugation supplémentaire de 5 min et le surnageant a été conservé. Les concentrations totales de sodium [(1,7 ± 0,2) mM] et de potassium [(238 ± 3) mM] du suc ont été mesurées avec un spectromètre à flamme (Fisher Scientific, Montréal). Afin de maintenir la concentration de potassium constante autour du segment d'intestin étudié lorsque le suc intestinal, chauffé ou non, a été utilisé dans une expérience, celui-ci a été suffisamment dilué dans une solution de chlorure de calcium à 5 mM contenant 5 mM de tampon CAPS (acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique)-KOH (pH 10,5).

Pour une autre série d'expériences, le suc intestinal a été dialysé pendant toute une nuit à l'aide d'une membrane Spectra/Por® molecularporous (limite d'exclusion: 6-8 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, Californie). L'échantillon a été immergé dans un volume 1000 fois plus grand de solution tampon (Section III.2.2.), ce qui l'a purgé de son contenu en ions et en petites molécules. Pour d'autres expériences, les lipides ont été extraits du suc intestinal en utilisant la méthode développée par Bligh et Dyer (1959) telle que modifiée par Kates (1972). Enfin, dans certaines expériences, un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été ajouté à la place du suc intestinal. La solution stock (100 X) de ce cocktail contenait 50 mM de AEBSF, 1 mg/mL d'antipaine, 0,015 mM d'aprotinine, 0,1 mM de E-64 et 0,1 mM de leupeptine, le tout dissous dans

l'eau. Ces inhibiteurs de protéases ont été obtenus de Sigma Aldrich Canada, (Oakville, Ontario).

III.3 — Techniques biophysiques

Deux techniques biophysiques ont été mises à profit afin de mieux cerner le rôle des facteurs physicochimiques ainsi que celui des résidus de boucle du Domaine I dans le mode d'action de la toxine Cry9Ca.

III.3.1 – Mesure du gonflement osmotique par diffusion lumineuse

La perméabilité membranaire induite par la Cry9Ca et ses mutants a été mise en évidence à l'aide d'une technique de gonflement osmotique mesuré par diffusion lumineuse. Une telle technique a d'abord été adaptée à l'étude des toxines du bacille de Thuringe par une équipe britannique (Carroll et Ellar, 1993) et abondamment utilisée et développée dans le laboratoire du Professeur Raynald Laprade (Tran *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2005; Kirouac *et al.*, 2002, 2006a, b; Vachon *et al.*, 2006). Des vésicules de membrane en bordure en brosse de l'intestin médian du sphinx du tabac (Section III.2.2) ayant été équilibrées dans une solution de faible osmolarité sont soudainement mises en contact avec une concentration relativement élevée d'un soluté. Le choc osmotique ainsi produit entraîne une contraction extrêmement rapide des vésicules. Celles-ci ont alors tendance à gonfler de nouveau. L'ampleur de ce gonflement dépend directement de la perméabilité de la membrane des vésicules aux solutés externes, laquelle est naturellement très faible. Par contre, en présence de toxines formant des pores peu sélectifs, les solutés peuvent pénétrer plus facilement les vésicules, ce qui provoque leur gonflement. Les changements de volume sont détectés grâce au fait que les vésicules diffusent la lumière d'un faisceau incident de façon inversement proportionnelle à leur volume (Kirouac *et al.*, 2006a).

La veille de l'expérience, une quantité suffisante de vésicules a été décongelée puis resuspendue jusqu'à concurrence d'environ 90% du volume final désiré, dans le tampon approprié et laissée à incuber pour la nuit au réfrigérateur. Selon le pH désiré pour l'expérience, ce tampon était composé de 10 mM de l'un ou l'autre des produits suivants : MES (acide morpholineéthanesulfonique)-KOH (pH 6,5), HEPES (acide 4-[2-

hydroxyéthyl]-1-pipérazineéthanesulfonique)-KOH (pH 7,5), Tris (2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol)-HCl (pH 8,5), CHES (acide 2-[N-cyclohexylamino]éthanesulfonique)-KOH (pH 9,5), ou CAPS-KOH (pH 10,5). Au moins une heure avant l'expérience, les vésicules en suspension ont été diluées de nouveau dans le tampon approprié de manière à atteindre la concentration finale de 0,4 mg de protéines membranaires par mL, avec assez d'albumine de sérum bovin pour atteindre une concentration finale de 1 mg/mL. Ce dernier ingrédient a été ajouté pour minimiser l'adhésion des toxines aux parois des tubes et seringues. Pour la plupart des expériences, les vésicules ont été préincubées à 23°C pendant environ une heure avec 0, 5, 15, 50, 100, ou 150 pmol de toxine par mg de protéines membranaires, ce qui correspond à une concentration finale de toxine de 0, 2, 6, 20, 40, ou 60 nM, respectivement. L'expérience a débuté par le mélange rapide des vésicules avec un volume égal de 10 mM du tampon approprié contenant 1 mg/mL d'albumine de sérum bovin et 150 mM de KCl à l'aide d'un appareil de type « stopped flow rapid kinetics apparatus » de la compagnie Hi Tech Scientific (Salisbury, Angleterre). Le mélange s'effectue directement dans la cuvette d'un spectrofluoromètre de marque Photon Technology International (South Brunswick, New Jersey). La lumière diffusée a été mesurée pendant une minute à la fréquence de 10 Hz et à une longueur d'onde de 450 nm avec un photomultiplicateur positionné à 90° du rayonnement incident, à température ambiante (24°C).

Plusieurs variantes de cette expérience ont été utilisées dans le cadre de l'étude présentée ici. Pour mieux étudier la taille du pore formé par la toxine ou encore juger de sa sélectivité ionique, le KCl a été remplacé par un soluté approprié : des sucres neutres, le saccharose et le raffinose, pour la taille du pore, ainsi que le N-méthyl-D-glucamine, un gros cation, et le gluconate, un gros anion, pour sa sélectivité ionique. La sélectivité ionique a également été étudiée en favorisant le passage d'une espèce ionique à travers la membrane par une voie parallèle à celle du pore. Ainsi, pour favoriser le passage des anions, le KCl a été remplacé par du KSCN, la bicouche lipidique des vésicules étant naturellement perméable à l'ion thiocyanate, en raison de sa taille plus grande. Pour rendre la membrane plus perméable aux cations, les expériences ont été réalisées en présence de KCl et de 7,5 μ M de valinomycine, un ionophore à potassium. La valinomycine, étant puisée à même une solution stock de 5 mM diluée dans de l'éthanol,

une expérience témoin en présence d'éthanol (0.15% (v/v)) a aussi été effectuée pour s'assurer que celui-ci n'avait pas d'effet.

Le gonflement osmotique a aussi été utilisé pour des expériences de cinétique. La procédure est similaire à celle des expériences décrites plus haut à la différence près que la période de préincubation est omise, la toxine étant préalablement dissoute dans la solution de KCl. Vésicules et toxines sont donc mises en contact au temps zéro de l'expérience et le gonflement osmotique résultant de la formation des pores est mesuré en temps réel pendant six minutes. Cette procédure a aussi servi à l'étude de l'effet de différents agents biochimiques sur la formation des pores. Avant le mélange final, 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Section III.2.3) ou 5 mM de dithiothreitol a été ajouté à la solution contenant les vésicules aussi bien qu'à celle de KCl.

Pour mieux résumer la grande quantité de données issues de ces mesures et en faciliter l'analyse, les résultats sont exprimés en termes du pourcentage de recouvrement de volume défini comme $100(1-I_t)$, où I_t est l'intensité de la lumière diffusée mesurée au temps t après le mélange rapide des vésicules et de la solution saline relativement au maximum atteint en absence de toxine. Les données sont généralement présentées sous la forme de moyennes \pm erreurs types calculées sur la moyenne de trois résultats expérimentaux obtenus avec des préparations différentes de vésicules, chaque expérience étant effectuée en quintuplicata. Dans le cas des expériences de cinétique, le pourcentage de recouvrement de volume a été calculé pour chaque point expérimental. Dans ce cas, les valeurs témoins, obtenues en absence de toxine, ont été soustraites des valeurs mesurées en présence de toxine (Carroll et Ellar, 1993; Tran *et al.*, 2001).

III.3.2 – Mesure électrophysiologique du potentiel membranaire

Lorsqu'un intestin fraîchement isolé de *M. sexta* (Section III.2.1) est coupé transversalement, ses deux extrémités s'enroulent sur elles-mêmes. Afin d'initier l'expérience, une extrémité d'un court segment de l'intestin médian a été aspiré dans une pipette de verre jusqu'à ce que l'extrémité opposée se soit enroulée autour du bout de la pipette. L'intestin expose ainsi la surface apicale de ses cellules épithéliales. La pipette ainsi chargée a été installée dans un bain perfusé et une cellule intestinale a été empalée par une microélectrode en verre remplie d'une solution d'un molaire de KCl (Peyronnet

et al., 1997; Fortier *et al.*, 2007a). La résistance de l'électrode variait entre 50 et 250 M Ω . Pour que l'expérience ait été jugée satisfaisante, le potentiel membranaire mesuré devait atteindre, en valeur absolue, au moins 20 mV. Le signal a été amplifié par un amplificateur « microprobe » M-707 (WP Instruments, Hamden, CT), surveillé à l'aide d'un oscilloscope (Kikusui Electronics, Yokohama, Japon), et enregistré sur papier par une table traçante (BBC Goerz Metrawatt, Wiener Neudorf, Autriche). Le bain a été perfusé avec une solution appelée 122K et contenant 122 mM de KCl, 5 mM de CaCl₂ et 5 mM de CAPS-KOH (pH 10,5). Préalablement à son utilisation, de l'oxygène a été barboté vigoureusement dans cette solution pendant au moins trente minutes. La perfusion a été continuée jusqu'à l'obtention d'un potentiel membranaire stable pendant au moins cinq minutes. Elle a alors été arrêtée, et 1,2 mL de 122K contenant 10 μ g/mL de la toxine choisie, en présence ou en absence de 10% de suc intestinal, nature, bouilli ou dialysé, de 10% de lipides extraits du suc intestinal ou encore de 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, a été ajouté directement dans le bain (Section III.2.3). Après 5 min, la préparation a été rincée avec de la solution de perfusion (122K) pendant 10 min. Les toxines restées en solution ont donc été évacuées, ne laissant derrière que celles qui s'étaient fixées à la paroi intestinale et dont l'effet sur le potentiel membranaire a été observé en temps réel grâce à l'électrode. Ces expériences ont été faites à la température de la pièce. Les données enregistrées sur papier ont été compilées manuellement à raison d'un point pour chaque trente secondes. Toutes les mesures ont été normalisées en divisant les valeurs expérimentales par la valeur obtenue au moment de l'ajout de la toxine dans le bain (V_0). Dans nos expériences, cette valeur de V_0 a généralement varié entre 53 et 85 mV (Chapitres VI et VII). Toutes les comparaisons statistiques portant sur les résultats obtenus pour les expériences *in vitro* ont été effectuées avec des tests de Student non jumelés, en mettant à profit la correction de Welch lorsque les écarts-types étaient trop différents, avec le logiciel InStat (Graphpad Software Inc., San Diego, Californie).

Chapitre IV

Modèle structural de la Cry9Ca

IV.1 — Description du modèle

Une connaissance approfondie de la structure d'une protéine est souvent d'une aide précieuse pour l'étude de son mode d'action et pour le développement de mutants pertinents. La structure tridimensionnelle remarquablement conservée, telle que révélée par cristallographie aux rayons X, de huit toxines Cry dites « à trois domaines » appartenant à cinq familles distinctes (Section I.1.3) permet de modéliser la structure de la Cry9Ca par homologie sur une base très solide.

La modélisation a été effectuée à l'aide du logiciel Internet Swiss Model (Peitsch, 1995, 1996; Guex et Peitsch, 1997). La séquence de la protéine Cry9Ca lui a été fournie en compagnie des structures cristallographiques de trois toxines du bacille de Thuringe, la Cry1Aa, la Cry2Aa et la Cry3Aa (Section III.1.1). Ces trois toxines partagent respectivement 33,18, 25,76 et 34,77 % d'identité avec la Cry9Ca. Le logiciel a aligné la séquence primaire des quatre toxines, créé un modèle tridimensionnel pour la Cry9Ca en utilisant la structure tridimensionnelle des trois autres à titre de références et l'a retourné à peine quelques heures plus tard. La structure obtenue ne couvre de la protéine que la portion allant du résidu 65, une sérine, au résidu 658, une asparagine. Dès le premier regard, on reconnaît la structure familière des toxines Cry à trois domaines (Figure IV.1A), avec un Domaine I formé de sept hélices- α allant du résidu 65 au résidu 292 (à l'exception des résidus 84 à 87), un Domaine II composé d'un prisme- β formé de trois feuillets- β allant du résidu 303 au résidu 504 et finalement un Domaine III, un sandwich- β , incluant les résidus 84 à 87, 293 à 302 et 505 à 658. Ce modèle préliminaire ne comptait que quelques encombrements stériques qui ont été corrigés par l'introduction, à l'aide de l'outil « mutation » du logiciel Swiss PDB Viewer, de rotamères différents des résidus problématiques. Enfin, l'ensemble du modèle a été soumis, par le logiciel, à une minimisation de l'énergie, exécutée à l'aide du champ de force GROMOS96; le calcul étant accompli *in vacuo*. L'accessibilité des résidus de la protéine a aussi été déterminée à l'aide de ce logiciel. Celle-ci est définie,

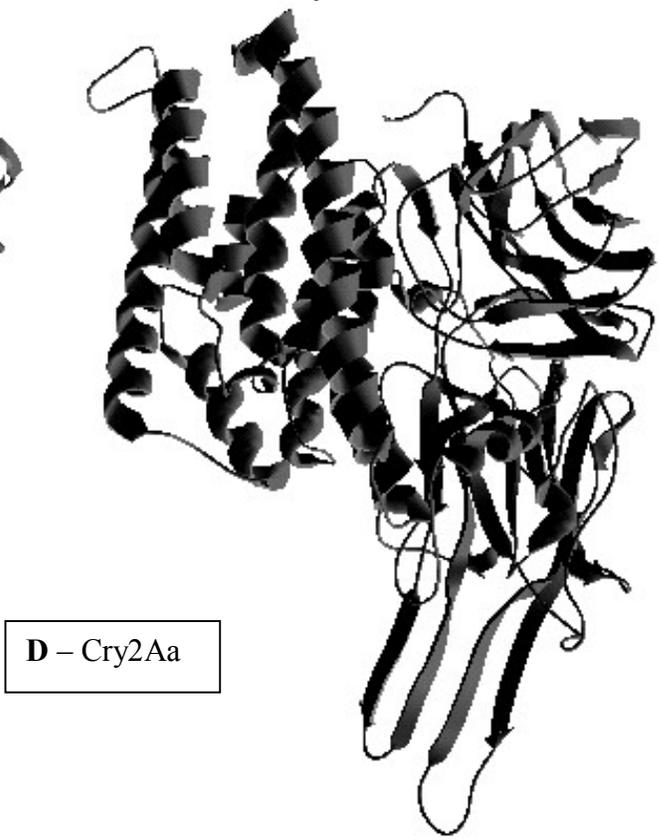
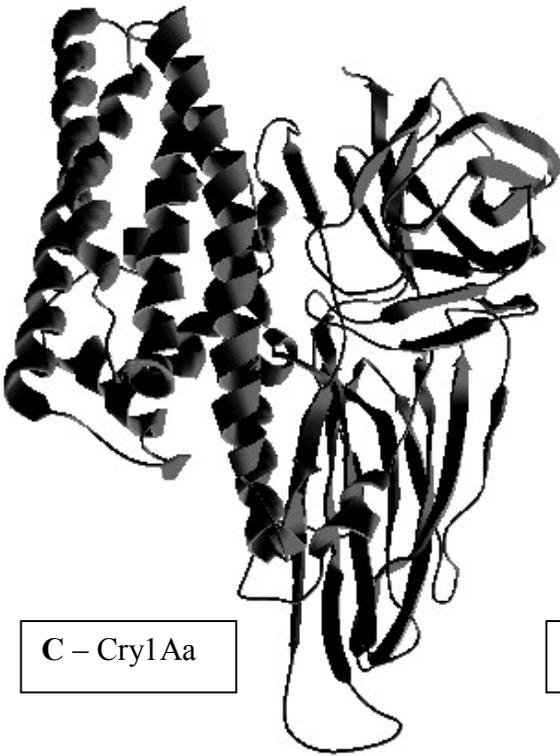
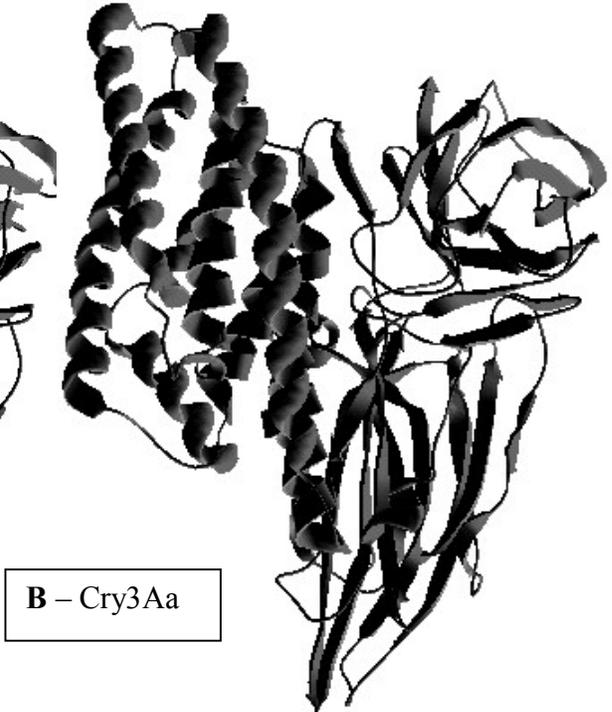
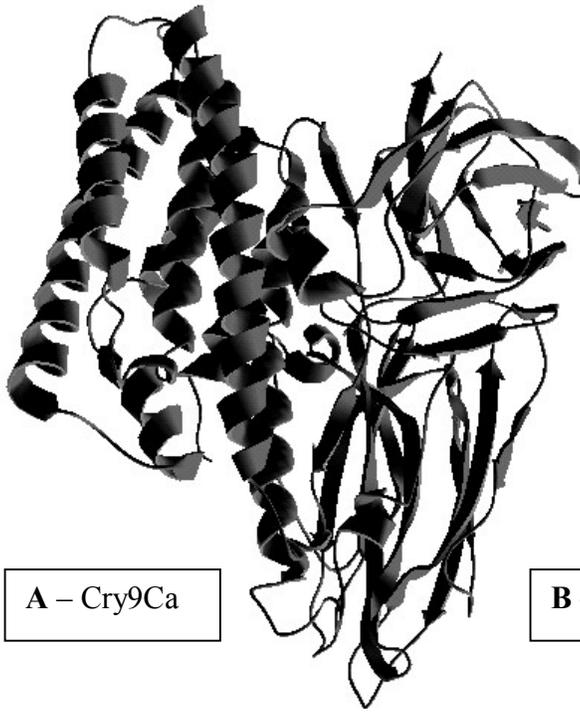
pour un acide aminé X, comme étant le pourcentage de la surface accessible de cet acide aminé dans la structure tridimensionnelle par rapport à celle de ce même acide aminé dans le pentapeptide GGXGG en conformation étendue.

IV.1.1 – Domaine I

Même si la structure proposée ici pour la Cry9Ca semble très similaire aux structures de référence utilisées (Figure IV.1B-G), quelques différences intéressantes peuvent être observées. La plus grande différence prédite pour le Domaine I (Figure IV.2A) se situe au niveau de la boucle intra- $\alpha 2$, laquelle se compose de neuf acides aminés dans la Cry9Ca alors que la Cry3Aa n'en compte que quatre, et la Cry1Aa et la Cry2Aa, que six. On remarque que les résidus 84 à 87, situés dans la boucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$, formeraient un court brin- β interagissant fortement avec le brin $\beta 1a$ (Figure IV.2B). En ce sens, ce segment de quatre résidus fait intégralement partie du sandwich- β et doit donc être considéré comme une section du Domaine III. Plus problématique pour le modèle tel que fourni par Swiss Model était la présence d'un encombrement stérique entre les atomes d'oxygène des résidus 193 (une glutamine située près de l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 5$) et 245 (une tyrosine située dans l'hélice $\alpha 6$). Il est important de spécifier ici que les deux mêmes acides aminés se retrouvent en position équivalente dans la structure de la Cry1Aa et de la Cry2Aa, mais avec une orientation légèrement différente de la chaîne latérale de la glutamine permettant d'éviter tout chevauchement atomique. Il est néanmoins tout à fait possible de reproduire l'orientation observée de la glutamine dans ces deux structures dans celle de la Cry9Ca, ce qui règle ce problème d'encombrement sans en introduire de nouveaux. Cette nouvelle orientation est conservée suite à la minimisation de l'énergie du modèle dans son ensemble.

IV.1.2 – Domaine II

Le Domaine II, où l'on retrouve les trois feuillets- β usuels, est celui où le plus de différences peuvent être observées entre le modèle proposé pour la Cry9Ca (Figure IV.3A) et les structures cristallographiques de référence. Dans ce domaine, la ressemblance entre la Cry9Ca et la Cry2Aa ne dépasserait d'ailleurs guère le niveau topologique (Figure IV.1F)



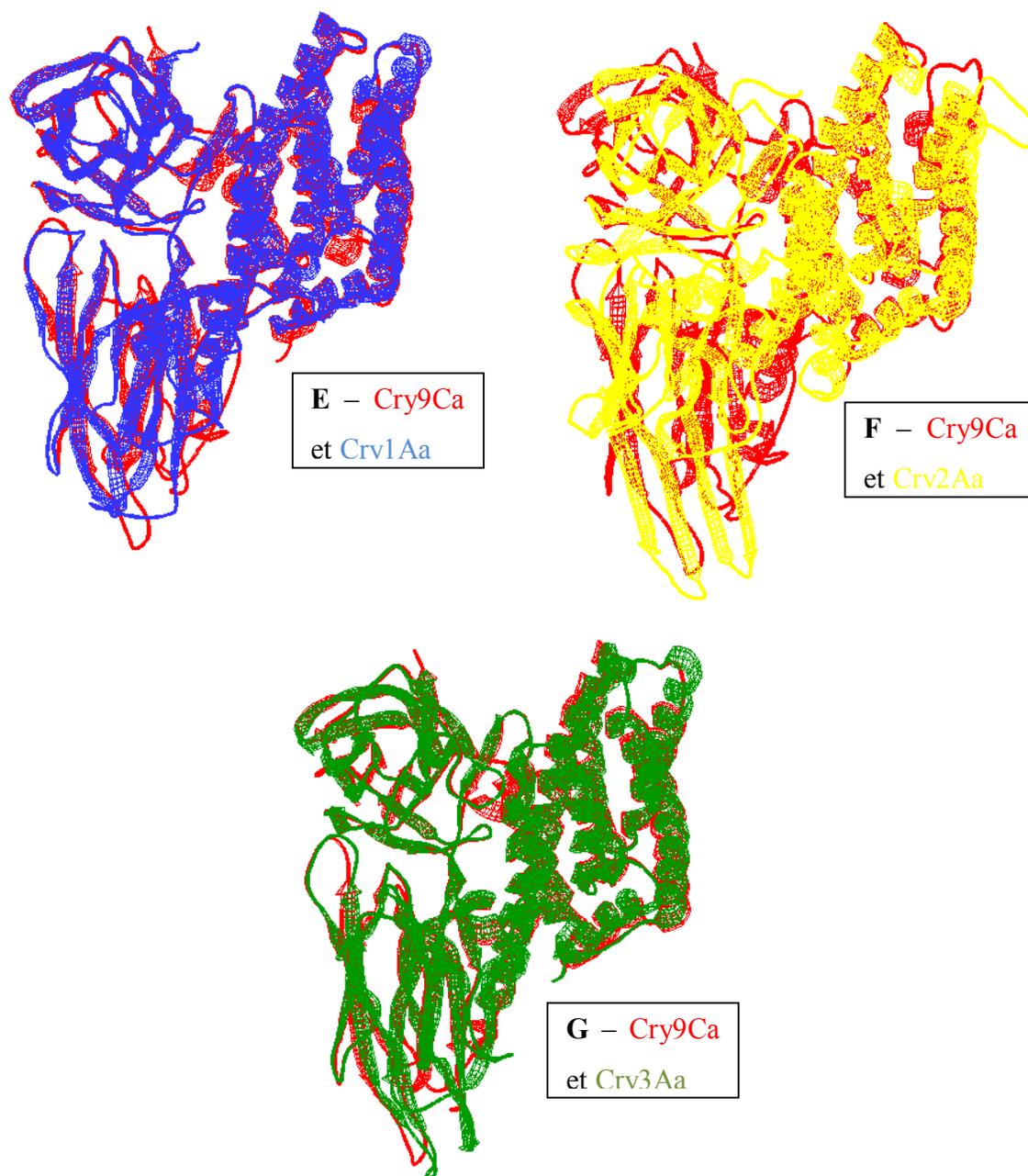


Figure IV.1 : **Modèle structural de la Cry9Ca et structures de référence.** (A) Modèle proposé pour la Cry9Ca par le logiciel en ligne Swiss Model. (B) Structure cristallographique 1DLC de la Cry3Aa. (C) Structure cristallographique 1CIY de la Cry1Aa. (D) Structure cristallographique 1I5PA de la Cry2Aa. Le modèle proposé pour la Cry9Ca est aussi présenté de sa structure cristallographique, dans la même orientation, de la Cry1A1 (E), de la Cry2Aa

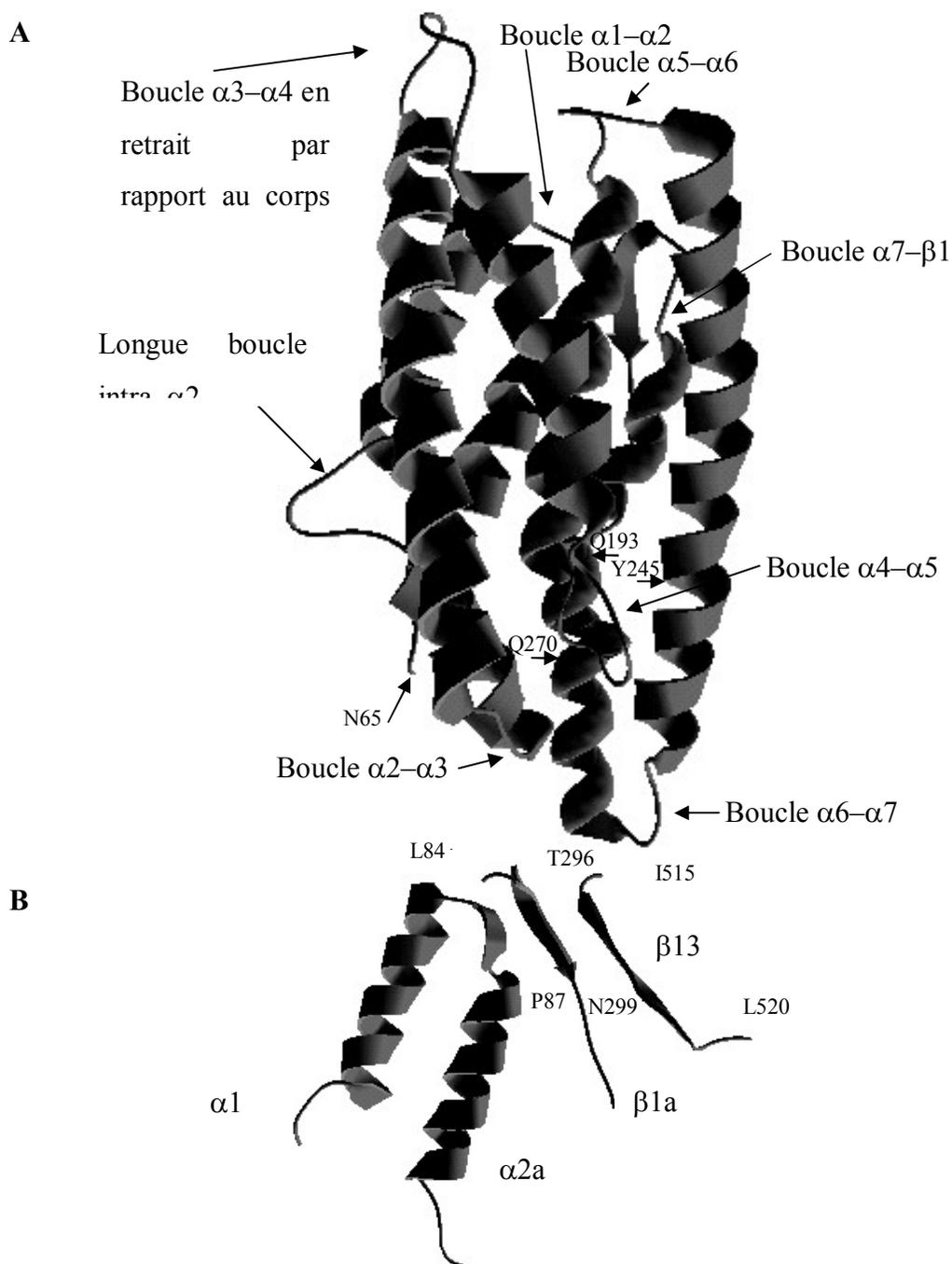


Figure IV.2 : **Domaine I de la Cry9Ca, tel que proposé par le modèle.** (A) Le Domaine I est ici représenté après une rotation de 90° en sens antihoraire, par rapport à l'orientation de la Figure IV.1A, afin de mieux faire ressortir la longueur caractéristique de la boucle intra- $\alpha 2$ et la position en retrait de la boucle $\alpha 3-\alpha 4$. La position des autres boucles de ce domaine est aussi notée, de même que celle des résidus N65 (résidu N-terminal du modèle), Q193 (hélice $\alpha 5$), Y245 (hélice $\alpha 6$) et Q270 (hélice $\alpha 7$). (B) Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2a$ et les brins $\beta 1a$ et $\beta 13$ de la Cry9Ca sont ici représentés seuls, dans la même orientation que dans la figure IV.1A, afin de

IV.1.2.1 – Feuillet 1

Le premier feuillet- β est composé des brins $\beta 2$ à $\beta 5$ qui adoptent une topologie dite de clé grecque (Figure IV.3B). La plus grande différence observée dans cette région entre la structure proposée pour la Cry9Ca et les structures de référence se situe au niveau de la boucle $\beta 2$ - $\beta 3$, plus longue dans la Cry9Ca (10 résidus) que dans les trois autres toxines (8 résidus dans les Cry3Aa et Cry2Aa, seulement 2 dans la Cry1Aa). Dans celles-ci, par contre, les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ sont plus longs (un total de 20 résidus pour ces deux brins dans la Cry9Ca contre un total de 24 dans la Cry3Aa et la Cry1Aa), surtout dans la Cry2Aa (29 acides aminés dans les deux brins). Tel que proposée initialement par le logiciel Swiss Model, le modèle comptait deux encombrements stériques : entre les résidus 354 (thréonine) et 401 (asparagine) et entre les résidus 358 (asparagine) et 396 (thréonine). Ces encombrements ont été éliminés.

IV.1.2.2 – Feuillet 2

Dans les trois structures de référence, le feuillet 2 est constitué de la même façon que le premier, c'est-à-dire de quatre brins- β formant un motif de clé grecque. La structure de la Cry9Ca, prédite par le modèle, présente plutôt une variation originale (Figure IV.3C). En fait, ce deuxième feuillet de la Cry9Ca suit initialement de très près la conformation adoptée par les autres toxines, du moins en ce qui concerne les brins $\beta 6$, $\beta 7$ et $\beta 8$. Mais sans doute la plus grande différence prédite entre la Cry9Ca et les structures de référence vient de l'absence de brin- β là où devrait pourtant se trouver le brin $\beta 9$. À sa place, on n'observe qu'une longue et informe succession d'acides aminés. Alors que, dans les structures de référence, les brins $\beta 6$ et $\beta 9$ interagissent par de multiples liaisons hydrogène, la seule liaison de ce type observée dans la Cry9Ca entre le brin $\beta 6$ et la chaîne peptidique qui lui fait face se situe au niveau de la chaîne latérale de l'acide aspartique en position 454. Néanmoins, la structure prédite de la Cry9Ca se superpose à nouveau très bien à celle de la Cry3Aa dans la boucle qui relie les deuxième et troisième feuillets (boucle « $\beta 9$ »- $\beta 10$).

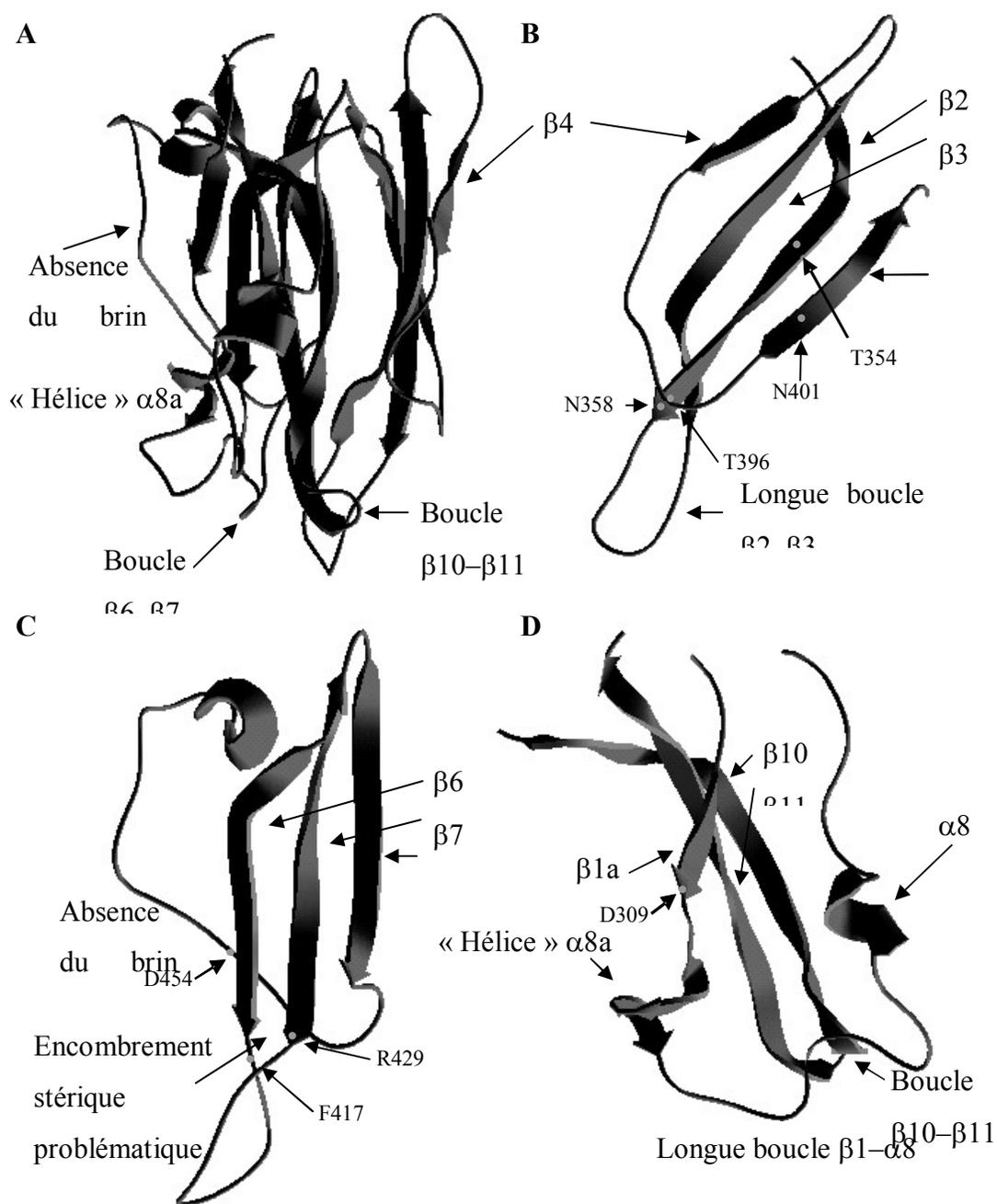


Figure IV.3 : **Domaine II de la Cry9Ca, tel que proposé par le modèle.** (A) Le Domaine II est ici représenté dans la même orientation que dans la figure IV.1A. (B) Feuillet 1, représenté sous un angle permettant d'en apprécier toutes les structures et particulièrement sa longue boucle $\beta 2-\beta 3$. La position des résidus T354 (brin $\beta 2$), N358 (brin $\beta 2$), T396 (boucle $\beta 4-\beta 5$) et N401 (brin $\beta 5$) est aussi précisée (le point gris représente la position approximative du carbone- α du résidu). (C) Feuillet 2, représenté sous un angle permettant d'en apprécier toutes les structures et particulièrement sa longue boucle $\beta 6-\beta 7$ et l'absence de brin $\beta 9$. La position des résidus F417 (boucle $\beta 6-\beta 7$), R429 (brin $\beta 7$) et D454 (boucle $\beta 8-\beta 9$) est aussi indiquée. (D) Feuillet 3, représenté sous un angle permettant d'en

Le point le plus faible du modèle se trouve dans ce feuillet. En effet, on y prédit un important encombrement stérique entre la phénylalanine en position 417 et l'arginine en position 429. Cet encombrement ne peut pas être corrigé par une simple rotation de l'un ou l'autre de ces deux résidus. Le premier d'entre eux est situé à l'extrémité C-terminale du brin $\beta 6$ et le second, à l'extrémité N-terminale du brin $\beta 7$. Ceci implique presque certainement qu'il y a un problème dans la reconstruction tridimensionnelle de la longue boucle $\beta 6$ - $\beta 7$, région qui correspond précisément à celle où la Cry9Ca et la Cry3Aa diffèrent le plus.

IV.1.2.3 – Feuillet 3

Le troisième feuillet- β (Figure IV.3D) est composé de deux segments distincts placés aux extrémités du Domaine II. Le segment N-terminal est composé du brin $\beta 1b$ et de l'hélice $\alpha 8$ et le segment C-terminal, des brins $\beta 10$ et $\beta 11$. Dans le modèle de la Cry9Ca, la première moitié du premier de ces deux segments, c'est-à-dire essentiellement le brin $\beta 1b$, reproduit de très près la structure équivalente de la Cry3Aa. En fait, cette similarité s'observe aussi pour l'hélice $\alpha 7$, le brin $\beta 1a$ et les boucles situées de part et d'autre de celui-ci. Toutefois, et en conformité cette fois avec la Cry1Aa, on observe dans la structure prédite de la Cry9Ca ce qui ressemble à une très courte hélice, nommée $\alpha 8a$, suivant le brin $\beta 1b$ et en prolongement de ce dernier. De plus, et ce contrairement à chacune des structures de référence, la Cry9Ca présente une boucle plus longue de quelques acides aminés entre le brin $\beta 1b$ et l'hélice $\alpha 8$. La similarité avec la Cry3Aa reprend ensuite avec la boucle $\alpha 8$ - $\beta 2$, où non seulement la structure de ces deux toxines, mais aussi celle de la Cry1Aa, se superposent remarquablement. Quant au second segment de ce feuillet (brins $\beta 10$ et $\beta 11$), le modèle prédit aussi que celui de la Cry9Ca sera très similaire à celui de la Cry3Aa, exception faite de la boucle $\beta 10$ - $\beta 11$. Toujours selon ce modèle, la boucle $\beta 11$ - $\beta 12$, qui fait le pont entre les Domaines II et III, est aussi très similaire dans la Cry9Ca et les toxines de référence, incluant même la Cry2Aa. Ceci n'est pas étonnant puisque cette boucle forme un lien structurel essentiel au sein des toxines Cry. Le modèle crée aussi un encombrement stérique entre un résidu de ce feuillet et un autre du Domaine I situé à proximité. Il s'agit, respectivement, d'une glutamine en position 270, située dans l'hélice $\alpha 7$ (Figure IV.2), et d'un aspartate en

position 309, que l'on retrouve au sein du brin $\beta 1b$ (Figure IV.3). Ce problème peut cependant être réglé facilement par l'utilisation d'un autre rotamère de la glutamine.

IV.1.3 – Domaine III

Dans le Domaine III (Figure IV.4), on observe à nouveau une excellente superposition de la structure de la Cry9Ca, telle que prédite par le modèle, avec les structures de référence, surtout lorsque la comparaison est faite avec celle de la Cry3Aa. On ne trouve que deux différences majeures. Premièrement, dans la boucle $\beta 19$ - $\beta 20$, la Cry9Ca possède six résidus de plus que la Cry3Aa et la Cry1Aa. Le modèle prédit aussi que cette région plus étendue de la toxine Cry9Ca formera une courte hélice- α , $\alpha 9$, disposée à proximité de l'hélice $\alpha 6$ du Domaine I. La seconde différence dans le Domaine III se trouve au niveau de la boucle $\beta 21$ - $\beta 22$. Cette boucle possède deux résidus de plus que celle de la Cry3Aa. Le seul encombrement stérique créé dans ce domaine est au niveau de la chaîne latérale de la glutamine (résidu 566) qui entre en conflit avec la chaîne peptidique au niveau du résidu 565, une autre glutamine. Un changement de rotamère pour la glutamine 566 règle facilement ce problème.

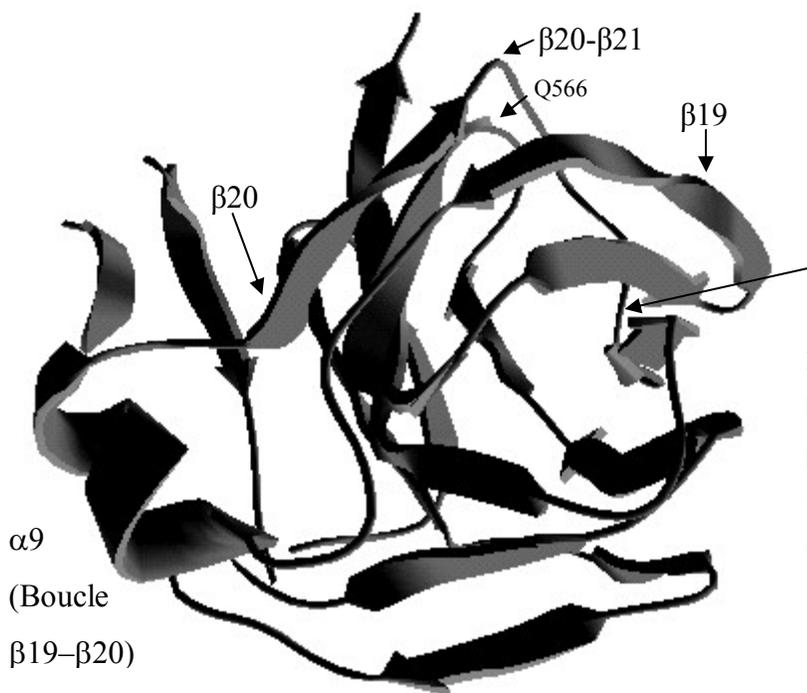


Figure IV.4 : **Domaine III de la Cry9Ca, tel que proposé par le modèle.** Le Domaine III est représenté dans la même orientation que dans la figure IV.1A. La position de l'hélice $\alpha 9$ est indiquée, ainsi que celle des brins $\beta 19$ et $\beta 20$, de la

IV.2 — Emplacement des résidus mutés

La position, dans la structure proposée de la Cry9Ca, de chacun des 29 résidus mutés dans le cadre de ce travail a également été analysée. La représentation usuelle des toxines Cry dans la littérature place le Domaine I sur la gauche avec les hélices α_3 et α_4 se positionnant à la verticale à l'extrême gauche du dessin. Cette façon de disposer la protéine dans l'espace, aussi utilisée dans la Figure IV.1, sera, à moins d'avis contraire, utilisée dans les descriptions présentées ci-dessous.

IV.2.1 – Résidu 164

La boucle α_3 - α_4 (Figure IV.5B) comprend l'arginine qui a été mutée dans les mutants simples R164K et R164A. Le second de ces deux mutants constitue la souche parentale de tous les doubles mutants étudiés dans le chapitre VII. Le modèle prédit que la boucle α_3 - α_4 est située légèrement au-dessus et en retrait du volume principal formé par le reste du Domaine I, rendant ainsi plusieurs de ses résidus plus facilement accessibles que ceux de la même boucle dans les structures de référence. Le modèle ne prédit toutefois qu'une accessibilité d'un peu moins de 46% à l'arginine située en position 164, cette même arginine qui forme le point de clivage particulièrement sensible à la digestion par la trypsine. On sait, bien sûr, que de tels modèles sont nécessairement moins précis dans les boucles, celles-ci étant de formes beaucoup plus diverses, surtout lorsqu'elles diffèrent de celles des structures de référence. Il n'en demeure pas moins intéressant de spécifier que, dans la structure cristalline de la Cry3Aa, la même méthode ne donne qu'une accessibilité à peine supérieure, de presque 50%, pour l'histidine en position 161, qui constitue quand même un site de protéolyse (protéinase acide d'*Aspergillus*) au sein de la boucle α_3 - α_4 de cette toxine (Carroll *et al.*, 1997).

IV.2.2 – Boucle α_2 - α_3

Selon le modèle, la boucle α_2 - α_3 de la Cry9Ca (Figure IV.5A) se superpose très bien sur les boucles équivalentes des trois toxines utilisées comme références. Elle se situe au bas du Domaine I (Figure IV.2A), vers l'arrière de la protéine telle qu'orientée dans la figure IV.1A. Parmi l'ensemble des doubles mutants, dix ont été forgés en modifiant l'un ou l'autre de sept résidus situés dans ou à proximité de cette boucle. Le

modèle place la chaîne latérale du résidu glutamate en position 121, dans le dernier tour de l'hélice $\alpha 2b$, de telle sorte qu'elle s'éloigne du corps de la protéine en s'étendant vers l'arrière. Quant à la chaîne latérale de l'asparagine (en position 124), elle pointerait vers le bas, s'éloignant elle aussi du corps de la protéine. Ces caractéristiques feraient de ces deux résidus les plus accessibles de cette région de la toxine. La chaîne latérale des deux glutamines voisines (en position 125 et 126) s'étendrait horizontalement, celle de la première directement vers l'observateur et celle de la seconde en direction opposée. La chaîne latérale de la thréonine en position 128 serait parallèle à celle de la glutamine en position 125 alors que celle de son voisin, un glutamate (position 129, extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 3$) suivrait plutôt la même orientation que la glutamine en position 126. Finalement, la chaîne latérale de la phénylalanine en position 130 se courberait autour de l'hélice, son cycle aromatique se retrouvant du côté extérieur de la protéine, à la gauche de l'observateur.

IV.2.3 – Boucle $\alpha 4$ – $\alpha 5$

Le modèle prédit que la boucle $\alpha 4$ – $\alpha 5$ (Figure IV.5C) est elle aussi semblable à celle des toxines de référence. De cette boucle, six résidus ont été modifiés par mutagenèse dirigée. Il s'agit de la leucine 186, de la phénylalanine 187, de la valine 189, de l'asparagine 190 et des glutamines 192 et 193. Cette dernière serait en fait le premier résidu de l'hélice $\alpha 5$. Parmi ces résidus, seule l'asparagine en position 190, qui s'élancerait en direction de l'observateur, dans l'orientation habituelle de la toxine (Figure IV.1A), devrait être accessible (à un peu plus de 54%). Au contraire, les chaînes latérales de la phénylalanine et des deux glutamines seraient complètement enfouies dans le corps de la protéine. Quant à la leucine et à la valine, elles s'étendraient en direction de l'hélice voisine, $\alpha 3$.

IV.2.4 – Boucle $\alpha 5$ – $\alpha 6$

Un seul résidu de la boucle $\alpha 5$ – $\alpha 6$ (Figure IV.5D) qui, dans la Cry9Ca, ressemblerait fort à ses homologues des toxines Cry3Aa et Cry1Aa, a été muté au cours de ce travail. Il s'agit de la thréonine en position 224. Ce résidu, situé juste avant le début de l'hélice $\alpha 6$, devrait être, avec le glutamate en position 219, le plus accessible de

la boucle. Le modèle positionne la chaîne latérale de la thréonine de telle sorte qu'elle prolonge l'hélice α_6 , pointant donc vers le haut de la protéine.

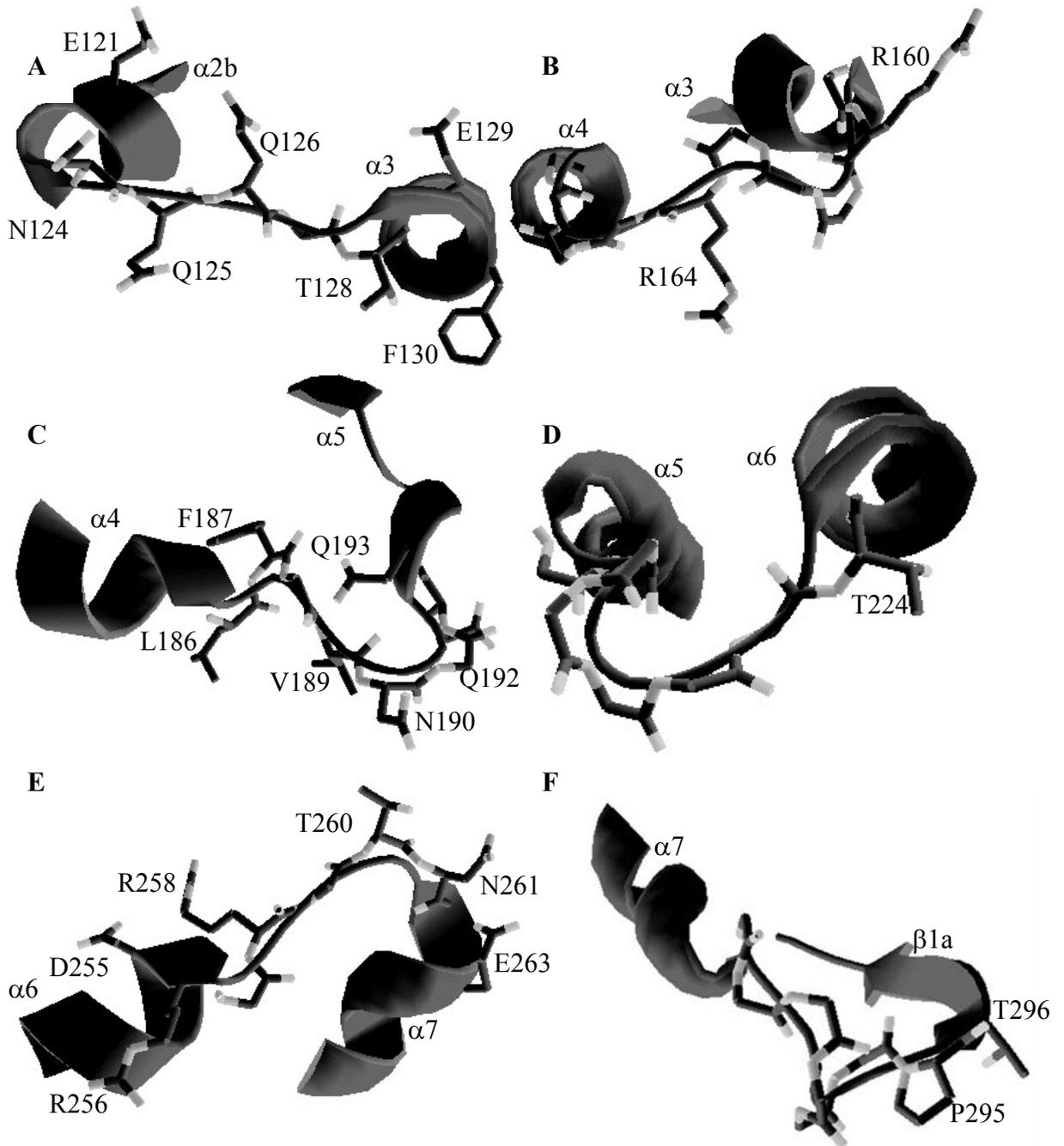


Figure IV.5 : Gros plans sur les boucles du Domaine I. Les boucles α_2 - α_3 (A), α_3 - α_4 (B), α_4 - α_5 (C), α_5 - α_6 (D), α_6 - α_7 (E), et α_7 - β_1 (F) sont représentées individuellement, chacune dans une orientation choisie pour mieux faire ressortir la position des acides aminés choisis pour les mutations. Chaque boucle est présentée sous forme d'un ruban qui inclut six acides aminés supplémentaires de part et d'autre de la boucle et auquel le squelette peptidique des résidus de la boucle (uniquement) est superposé. La chaîne latérale des résidus qui ont subi une mutation est représentée de même que celle du résidu R160, dont il est question dans le texte.

IV.2.5 – Boucle $\alpha 6$ – $\alpha 7$

Tout comme pour la boucle précédente, la boucle $\alpha 6$ – $\alpha 7$ de la Cry9Ca (Figure IV.5E) se superpose aisément à celle des toxines Cry1Aa et Cry3Aa. Dans cette région de la protéine, l'hélice $\alpha 6$ se termine par la succession d'un aspartate et d'une arginine, respectivement en position 255 et 256. Dans la boucle elle-même, les résidus ayant subi des mutations sont l'arginine 258, la thréonine 260 et l'asparagine 261. Enfin, le glutamate en position 263, qui serait en fait le second résidu de l'hélice $\alpha 7$, a aussi été la cible de nos études. Selon le modèle, tous ces résidus se retrouvent à la surface de la protéine, mais aucun ne devrait être particulièrement accessible. En effet, le plus accessible de ceux-ci, mais à seulement un peu plus de 37%, devrait être l'arginine en position 258, dont la chaîne latérale se retrouverait disposée parallèlement à celle de l'aspartate 255. Les trois résidus suivants, en position 260, 261 et 263, forment le point le plus bas du Domaine I. Leurs chaînes latérales s'étirent toutes vers le bas, hors du corps de la protéine.

IV.2.6 – Boucle $\alpha 7$ – $\beta 1$

La boucle $\alpha 7$ – $\beta 1$ (Figure IV.5F) fait le pont entre le Domaine I et le reste de la protéine. Telle que reconstruite par le modèle, son dernier résidu est la proline située en position 295. Celle-ci, de même que le résidu suivant, la thréonine 296 qui commencerait le brin $\beta 1a$, a été mutée. Ces deux résidus se retrouvent à la surface de la protéine, mais leur accessibilité reste relativement faible à un peu plus de 29% pour la proline et de 21% pour la thréonine.

Chapitre V

Pore-forming properties of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry9Ca in *Manduca sexta* brush border membrane vesicles

Jean-Frédéric Brunet ^a, Vincent Vachon ^a, Marc Juteau ^a, Jeroen Van Rie ^b, Geneviève Larouche ^c, Charles Vincent ^c, Jean-Louis Schwartz ^a, Raynald Laprade ^{a,*}

^a *Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, P. O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada*

^b *Bayer BioScience NV, Ghent, Belgium*

^c *Horticultural Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, Quebec, J3B 3E6, Canada*

* Corresponding author. Tel.: +1 514 343 7960; fax: +1 514 343 7146.

E-mail address: -----(R. Laprade).

Résumé

La toxicité et la capacité à former des pores de la toxine insecticide Cry9Ca du bacille de Thuringe, de ses mutants simples R164A et R164K et d'un fragment de 55 kDa qui résulte d'un clivage protéolytique au niveau de son résidu 164 ont été étudiées avec des larves du premier stade et des vésicules de membrane à bordure en brosse purifiées à partir de l'intestin moyen de larves du cinquième stade. Ni les mutations ni la protéolyse n'ont modifié la toxicité de la Cry9Ca. En comparaison avec la Cry1Ac, la Cry9Ca et ses mutants forment, dans les vésicules, des grands pores peu sélectifs. La formation de ces pores, et particulièrement par la souche sauvage de la Cry9Ca et ses deux mutants, dépend fortement du pH : une augmentation de celui-ci de 6,5 à 10,5 entraîne une diminution par étapes irrégulières de l'effet perméabilisant des toxines qui ne peut être expliquée par un changement de la sélectivité ionique des pores. La formation des pores est aussi beaucoup plus lente en présence de Cry9Ca et de ses dérivés, incluant le fragment de 55 kDa, qu'en présence de Cry1Ac. Sa vitesse n'est pas modifiée par l'ajout d'inhibiteurs de protéases ou d'un agent réducteur.

Abstract

The toxicity and pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* Cry9Ca insecticidal toxin, its single-site mutants, R164A and R164K, and the 55-kDa fragment resulting from its proteolytic cleavage at residue 164 were investigated using *Manduca sexta* neonate larvae and fifth-instar larval midgut brush border membrane vesicles, respectively. Neither the mutations nor the proteolytic cleavage altered Cry9Ca toxicity. Compared with Cry1Ac, Cry9Ca and its mutants formed large poorly selective pores in the vesicles. Pore formation was highly dependent on pH, however, especially for wild-type Cry9Ca and both mutants. Increasing pH from 6.5 to 10.5 resulted in an irregular step-wise decrease in membrane permeabilization that was not related to a change in the ionic selectivity of the pores. Pore formation was much slower with Cry9Ca and its derivatives, including the 55-kDa fragment, than with Cry1Ac and its rate was not influenced by the presence of protease inhibitors or a reducing agent.

Keywords: Insecticidal toxin; Pore formation; Micro-environment; Osmotic swelling assay; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Introduction

Among the insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis* [1], the three-domain Cry proteins have been most extensively used for pest control [2] and their mode of action has been studied in most detail [3,4]. They are synthesized as protoxins that accumulate within crystalline inclusions, usually during sporulation. Once ingested by susceptible insects, the protoxins are solubilized in the midgut and hydrolyzed to their active form by intestinal proteases [5,6]. The activated toxins then bind to specific receptors located on the surface of the luminal membrane of midgut epithelial columnar cells [7,8]. Finally, the toxins insert into the membrane and form pores that abolish transmembrane gradients and disrupt cellular functions, leading to cell lysis and death of the insect [3,9].

Although the activated toxins are thought to be resistant to further proteolysis, many cases of cleavage within their pore-forming domain (domain I) have been reported (summarized in [10]). However, the position of these cleavage sites differs widely depending on the toxin being studied and the consequences of such modifications remain somewhat controversial. For instance, it has been suggested that exposure of proteolytic sites following binding of the toxins to their receptors could play an important role in their mode of action by either facilitating [11] or allowing [12] toxin oligomerization and membrane insertion. The importance of such a cleavage step has been questioned, however, as the rate of pore formation by Cry1Aa in midgut brush border membrane vesicles was not altered in the presence of a wide variety of protease inhibitors [10]. Furthermore, protease inhibitors stimulated pore formation by Cry1Ab in freshly isolated midguts, suggesting that proteolysis within the activated toxin hinders, rather than stimulates, its activity [13]. On the other hand, elimination of a major trypsin cleavage site located within the putative $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop of domain I in Cry9Ca, by replacing Arginine 164 by an alanine residue using in vitro site-directed mutagenesis, did not alter significantly its toxicity [14].

In the present study, the possible role of proteolysis within the pore-forming domain of the activated toxins was further investigated by examining the ability of wild-type Cry9Ca, its R164A and R164K mutants, as well as the 55-kDa fragment resulting from cleavage at Arginine 164, to permeabilize brush border membrane vesicles isolated

from *Manduca sexta*, using a light scattering assay. Although in vitro the purified 55-kDa fragment was more active than the other toxin preparations, especially at alkaline pH, its toxicity, measured by in vivo bioassays, was similar to that of Cry9Ca and both of its mutants. This study constitutes the first characterization of the pores formed by Cry9Ca, its kinetics of pore formation, and the influence of micro-environmental factors on its pore-forming ability.

Materials and methods

Toxin activation and purification

Wild-type Cry9Ca, and its mutants R164A and R164K were prepared from *Escherichia coli* W6K strains producing the appropriate single recombinant toxins as described previously [14]. The bacteria were grown in TB medium containing 100 µg/ml ampicillin and, when the optical density at 600 nm reached 0.6 ± 0.2 , gene expression was induced at 28°C by addition of isopropyl-β-D-thiogalactoside to a final concentration of 1 mM. Cry1Ac was produced from *B. thuringiensis* HD73 grown in YT medium containing 100 µg/ml ampicillin as described earlier [15]. Protoxins were activated in vitro with porcine trypsin (Gibco, Grand Island, NY) and the resulting toxins were purified by fast protein liquid chromatography using a mono-Q ion exchange column (Pharmacia Biotech, Montreal, Qc) and eluting bound toxin with a 50 to 500 mM NaCl gradient as described elsewhere [16,17]. To minimize conversion of Cry9Ca and its R164K mutant to the 55-kDa species, activation was terminated by adding a cocktail of protease inhibitors (Calbiochem, San Diego, CA) composed of 100 mM 4-(aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), 80 µM aprotinin, 5 mM bestatin, 1.5 mM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64), 2 mM leupeptin and 1 mM pepstatin A at a 100-fold dilution. However, to isolate the 55-kDa fragment, fresh trypsin was repeatedly added to the wild-type protoxin preparation until the conversion was complete.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Toxin preparations were analyzed by sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [18] using either standard 10% polyacrylamide gels or 4-20%

polyacrylamide density gradient gels (Pierce, Rockford, IL). These were stained with GelCode Blue Stain reagent (Pierce) following the manufacturer's recommendations.

Bioassays

Fertilized eggs of *M. sexta* were obtained from the insectary of the North Carolina State University Department of Entomology (Raleigh, NC). Larvae were fed an artificial diet supplied with the insects. Toxicity assays were carried out by raising neonate larvae on artificial diet contaminated with either protoxin or activated toxin, as described elsewhere [15]. These were applied as 100- μ l samples that were layered onto 1.8-cm² wells and allowed to absorb into the medium. The tests were done with six concentrations ranging from 1.2 to 10 μ g/ml (66.7 to 555.6 ng/cm²) for the protoxins and 2 to 15 μ g/ml (111.1 to 833.3 ng/cm²) for the activated toxins and the 55-kDa fragment, using 10 groups of 25 larvae for each toxin concentration. Mortality and, for surviving insects, weight gain were recorded after 7 days. Values were adjusted for mortality of control larvae reared in the absence of toxin. The toxin concentrations required to kill 50% and 90% of the larvae (LC₅₀ and LC₉₀) or to inhibit weight gain by 50% (EC₅₀) were calculated by probit analysis [19]. Data were evaluated by one-way analysis of variance tests with the InStat software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Brush border membrane vesicle preparation

Whole midguts were isolated from fifth-instar *M. sexta* larvae as described earlier [15] and used to prepare brush border membrane vesicles with an Mg²⁺ precipitation and differential centrifugation method [20].

Osmotic swelling assay

Brush border membrane vesicle permeability was analyzed with an osmotic swelling technique based on light-scattering measurements [21]. Prior to the experiments, vesicles were resuspended to about 90% of the desired final volume in 10 mM of either MES (morpholineethanesulfonic acid)-KOH (pH 6.5), HEPES (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid)-KOH (pH 7.5), Tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)-HCl (pH 8.5), CHES (2-[*N*-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid)-KOH (pH 9.5), or CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)-KOH (pH 10.5) and

incubated overnight at 4°C. At least one hour before the beginning of the experiments, the vesicle suspensions were further diluted to a final concentration of 0.4 mg of membrane protein per ml with the appropriate buffer supplemented with enough bovine serum albumin to reach a final concentration of 1 mg/ml. The vesicles were preincubated at 23°C for about an hour with 0 to 150 pmol of activated toxin per mg of membrane protein (0 to 60 nM), except for kinetic experiments where preincubation was omitted. The assay was initiated by rapidly mixing the vesicles with an equal volume of 10 mM of the appropriate buffer, 1 mg/ml bovine serum albumin, and either 150 mM KCl, KSCN, N-methyl-D-glucamine-HCl or potassium gluconate, or 300 mM sucrose or raffinose with a Hi-Tech Scientific (Salisbury, UK) stopped flow rapid kinetics apparatus. For kinetic experiments, 150 pmol of toxin per mg of membrane protein was added to the 150 mM KCl solution before mixing with the vesicles. Scattered light intensity was monitored at the rate of 10 Hz and a wavelength of 450 nm, with a photomultiplier tube located at an angle of 90° from the incident beam, at 23°C in a PTI spectrofluorometer (Photon Technology International, South Brunswick, NJ).

Light-scattering data analysis

Percent volume recovery was defined as $100(1-I_t)$ where I_t is the scattered light intensity measured at time t after rapid mixing relative to the maximum attained in the absence of toxin. Data are given as means \pm SEM (standard error of the mean) of three experiments carried out with different vesicle preparations, each performed in quintuplicate. For kinetic experiments, percent volume recovery was calculated for each experimental point and control values obtained in the absence of toxin were subtracted from those measured in the presence of toxin.

Results

Toxin activation and further proteolysis

Because the activated Cry9Ca and R164K toxins are subject to further proteolysis [14], the composition of all toxin preparations was analyzed routinely by polyacrylamide gel electrophoresis. As described earlier in more detail [14], the solubilized protoxins of

wild-type Cry9Ca and its mutants, R164A and R164K, migrated as 130-kDa proteins. After activation, mutant R164A was transformed into a toxin of 67-69-kDa that did not undergo further proteolysis. Activated preparations of wild-type Cry9Ca and mutant R164K were composed of mixtures of a 67-69-kDa toxin and a 55-kDa fragment. The relative abundance of these two protein species remained remarkably stable for months when the samples were kept refrigerated (data not shown). On the other hand, preparations in which the trypsinization was deliberately prolonged and repeated contained mostly the 55-kDa fragment.

Toxicity

There was no significant difference between the *in vivo* toxicities, estimated for neonate larvae of *M. sexta*, of wild-type Cry9Ca, its purified 55-kDa fragment, and its mutants, R164A and R164K, when tested either as protoxins or as *in vitro* activated toxins (Table V.I). Although, for each preparation, the toxin concentration required to kill the larvae was systematically higher than that required to inhibit their growth, the LC₅₀ values were not significantly different from the EC₅₀ values estimated on the basis of larval weight (Table V.I).

Membrane permeabilization and effect of pH

The ability of each toxin preparation to permeabilize midgut brush border membrane vesicles isolated from fifth-instar *M. sexta* larvae was evaluated with an osmotic swelling assay [21]. In these experiments, scattered light intensity rises sharply immediately following rapid mixing of the vesicles with a hypertonic solution, due to vesicle shrinking. As illustrated in Fig. V.1A for wild-type Cry9Ca tested with a KCl solution at pH 7.5, in the presence of an active toxin, scattered light intensity subsequently decreases and stabilizes at a near steady-state value which depends on toxin concentration and pore-forming ability [22]. At pH 10.5, however, Cry9Ca was practically inactive (Fig. V.1B). Gradually increasing pH from 6.5 to 10.5 considerably reduced the ability of Cry9Ca (Fig. V.2A) and its R164A (Fig. V.2C) and R164K (Fig. V.2D) mutants to permeabilize the membrane. Within the range of pH values tested, the activity of all three toxins was highest at pH 6.5 and became negligible at pH 10.5. In

contrast, and while also decreasing as pH was increased, the activity of the 55-kDa fragment was still appreciable at the highest pH tested (Fig. V.2B). For all toxins, the decrease in activity was much sharper after pH was increased from 6.5 to 7.5 or from 8.5 to 9.5 than from 7.5 to 8.5 or from 9.5 to 10.5 (Fig. V.2).

Effect of pH on the ionic selectivity of Cry9Ca-induced channels

In the presence of a salt gradient, the osmotic swelling rate of the vesicles depends on the influx rate of the least permeant ionic species [21,23]. It was therefore hypothesized that the negligible activity of Cry9Ca and its mutants at high pH could result from a change in ionic selectivity of the pores due to the titration of critical residues within the toxin molecule. The possibility that the reduced rate of vesicle swelling could be due to a lower permeability of the pores to anions was tested by artificially increasing the anion permeability of the vesicles by replacing chloride with the more highly permeant thiocyanate ion (SCN^-). This substitution had no detectable effect on vesicle permeability in the presence of wild-type Cry9Ca (Fig. V.3A) or either of its mutants (data not shown). However, the vesicles swelled readily when the permeability to potassium ions was also increased, in the absence of toxin, by the addition of valinomycin, a potassium ion-specific ionophore, confirming that SCN^- was indeed more permeant than Cl^- . The possibility that the reduced rate of vesicle swelling could be the result of a lower permeability of the pores to cations was tested by increasing the permeability to potassium with valinomycin in the presence of KCl. This modification also had no effect on the rate of vesicle swelling induced by wild-type Cry9Ca (Fig. V.3B) or either of its mutants (data not shown).

These experiments strongly suggest that pH affected the capacity of the toxins to form pores, rather than their properties once formed. Further evidence for this conclusion was obtained by incubating vesicles with any one of the three toxins for one hour at pH 7.5 before measuring membrane permeability by diluting the vesicles with an equal volume of the KCl buffer at pH 10.5. In each case, a strong osmotic swelling activity, comparable to that observed at pH 7.5, was measured even though the pH of the mixture was 9.0 (data not shown).

Permeability to large charged solutes and oligosaccharides

To further characterize the properties of the pores formed by Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its single-site mutants, their permeability to different charged and neutral solutes was examined using the same experimental approach as for KCl (Fig. V.4). Replacing potassium (Fig. V.4A) by N-methyl-D-glucamine resulted in a very modest (less than two-fold) reduction in swelling rates for all toxins tested (Fig. V.4B). Replacing chloride (Fig. V.4A) by gluconate resulted, at pH 7.5, in a similarly modest reduction for Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its single-site mutants, but in a much stronger (four-fold) reduction in the presence of Cry1Ac (Fig. V.4C). At pH 10.5, however, a similar (four-five-fold) reduction in the osmotic swelling rates was observed in the presence of the 55-kDa fragment and Cry1Ac. In further experiments, KCl was replaced by a large neutral solute, sucrose (Fig. V.4D). This change resulted in a reduction in the osmotic swelling rates which was rather modest (less than two-fold) for all four Cry9Ca preparations, but more pronounced for Cry1Ac. At pH 7.5, replacing the disaccharide sucrose by the trisaccharide raffinose (Fig. V.4E) resulted in an approximately two-fold reduction in osmotic swelling rates in the presence of Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its single-site mutants, but in an approximately five-fold reduction in the presence of Cry1Ac. At the higher pH, the decrease in osmotic swelling rate was also about two-fold in the presence of the 55-kDa fragment and about five-fold in the presence of Cry1Ac.

Rate of pore formation

The kinetics of pore formation were examined by monitoring osmotic swelling after mixing simultaneously the vesicles with KCl and the toxin. Pore formation was much slower for Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its single-site mutants than for Cry1Ac (Fig. V.5), even at pH 7.5, at which these toxins formed pores in the preincubation experiments (Fig. V.2). This slow rate of pore formation does not appear to be due the activity of membrane-bound proteases since it was not altered significantly by the addition of a cocktail of protease inhibitors to the assay solutions (data not shown). The activated Cry9Ca molecule contains three cysteine residues located at positions 246, 322 and 449 [14]. These could possibly hinder pore formation by forming intermolecular

disulfide bridges, under the oxidizing conditions used in the light-scattering experiments, as was described recently for several Cry1Aa cysteine mutants [24]. For this reason, the kinetic experiments were repeated with 5 mM dithiothreitol, but this reducing agent had no detectable effect on the osmotic swelling rates measured in the presence of Cry9Ca, its mutants, or its 55-kDa fragment (data not shown).

Discussion

Toxicity

The toxicity of wild-type Cry9Ca measured in this study was quite similar to that published previously [14]. The somewhat higher value reported here (190 vs 83 ng/cm²) likely reflects minor differences in the experimental conditions used, including artificial diet composition, photoperiod, dilution buffer, and origin of the insects [25,26]. Toxicity data for the 55-kDa fragment and both mutants have not been published previously for *M. sexta*. In the present study, the LC₅₀ values calculated for all toxins, tested either as protoxins or as trypsin-activated proteins, were not significantly different, as was found when similar preparations of the wild-type and mutant toxins were tested in *Ostrinia nubilalis* [14]. However, the fact that the 55-kDa fragment of Cry9Ca was not significantly less toxic against *M. sexta* than the 67-69-kDa toxin may be surprising considering the observation that, in contrast with the wild-type toxin, it was inactive against *Spodoptera exigua* [14].

Other cases in which a Cry toxin was cleaved within the loop linking its α 3 and α 4 helices have been described with conflicting results concerning the effects of the cleavage on its toxicity. For instance, Cry2Aa was reported to be active, against *Pieris brassicae* larvae and a few cell lines derived from lepidopteran and dipteran insects, despite the removal of 144 residues from its N-terminus [27]. However, cleavage of this toxin at Leu144 was also reported to yield an inactive toxin, and mutants in which cleavage at this residue was prevented retained wild-type toxicity against *Lymantria dispar* larvae [28]. A similar cleavage occurring at Lys158 or His161 of the α 3- α 4 loop, and yielding a 55-kDa fragment as in the case of Cry9Ca, was reported for the coleopteran-specific Cry3Aa toxin [29,30]. The 55-kDa Cry3Aa fragment retained full

toxicity against the two coleopteran species that were tested, *Phaedon cochleariae* and *Leptinotarsa decemlineata* [30]. Moreover, engineering a specific chymotrypsin site that facilitates the formation of the 55-kDa fragment markedly increased Cry3Aa toxicity for *Diabrotica virgifera virgifera*, thus broadening its activity spectrum [31]. Finally, a 55-kDa trypsin-resistant fragment, resulting from the cleavage of Cry1Ie at residue 153, was as toxic as its full-length parental toxin for *Plutella xylostella* larvae [32], whereas a similar fragment resulting from the cleavage of the closely related toxin Cry1Ia at residue 155 retained only 22% of the full-length protein's toxicity [33].

The reason why the reported toxicity of the Cry9Ca 55-kDa fragment differs so drastically between *M. sexta* (this study) and *S. exigua* [14] thus remains unclear. The possibility that, in the present study, the N-terminal fragment of the activated toxin could have remained attached to its 55-kDa fragment by non-covalent electrostatic interactions, as was demonstrated for Cry3Aa [30], thus preserving its toxicity, appears unlikely since no polypeptide in the 10-15-kDa range was readily apparent when our 55-kDa fragment preparations were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

pH effects

The ability of Cry9Ca and both of its mutants to permeabilize midgut brush border membrane vesicles isolated from 5th-instar *M. sexta* larvae in light scattering experiments decreased sharply as pH was increased from 6.5 to 10.5 (Fig. V.2). This effect is very similar to that previously described for Cry1Ca, which was also much less active at pH 9.5 and 10.5 than at lower pH values [34], but contrasts with the much more subtle pH effects observed with wild-type Cry1Aa [15,35–38] and Cry1Ac [34,35] and a large number of their mutants. Cry1Ca was also shown previously [39] to permeabilize receptor-free phospholipid vesicles faster at pH 4 than at pH 7.4. In these experiments, however, no difference was observed between pH 7.4 and 10 [39]. Our results demonstrate that, as for Cry1Ca [34,40], the inability of Cry9Ca and its mutants to permeabilize brush border membrane vesicles efficiently at high pH is not due to a change in the ionic selectivity of the pores resulting from the titration of critical residues within the pore structure, but to a reduced ability to form pores under the conditions of the assay (Fig. V.3).

The pore-forming activity of the 55-kDa fragment was also pH-dependent, but much less strongly than that of the other toxins (Fig. V.2). In particular, it formed pores much more readily than the other toxin preparations at pH 9.5 and 10.5. This observation suggests that at least one titratable residue that is removed by the proteolytic cleavage at Arg164 contributes significantly to the pH sensitivity of the toxin. The possible candidates include three tyrosine residues located at positions 45, 53 and 57, near the N-terminal end of the activated Cry9Ca toxin, and two tyrosine residues, at positions 96 and 149, which are predicted to be located within its α 2a and α 3 helices, respectively. However, the fact that, for all four toxin preparations, as was observed for Cry1Ca [34], the pH effects were most evident between pH 6.5 and 7.5, and between pH 8.5 and 9.5 indicates that at least two more titratable residues located within the 55-kDa fragment are probably also involved. In the case of Cry9Ca, the possibilities include 3 cysteine, 4 lysine, 6 histidine and 20 tyrosine residues which are scattered throughout the rest of the toxin molecule. In addition, it cannot be excluded that changes in the ionization of critical residues located at the surface of the toxin receptor molecule could also contribute to the observed effects of pH.

Pore properties

The ability of the pores formed by Cry9Ca and its mutants to increase the permeability of brush border membrane vesicles to a variety of selected charged and uncharged solutes was examined at pH 7.5 and compared with that of Cry1Ac. At this pH, the osmotic swelling rates were much less strongly influenced by the size and charge of the test solutes when the experiments were carried out with Cry9Ca, either one of its mutants, or its 55-kDa fragment, than with Cry1Ac (Fig. V.4). At least under the conditions of these experiments, Cry9Ca therefore appears to form larger and less selective pores than Cry1Ac and several other Cry toxins known to be cation selective [23,41–46].

Of all the Cry9Ca toxin preparations that were tested, only the isolated 55-kDa fragment retained appreciable activity at pH 10.5. Interestingly, while this fragment's pore-forming properties were remarkably similar to those of the other Cry9Ca preparations, at pH 7.5, its behavior resembled strikingly that of Cry1Ac at the higher pH

(Fig. V.4A-E). Proteolytic cleavage at R164, therefore, not only increased the ability of Cry9Ca to form pores, but also modified the properties of the pores formed by the resulting 55-kDa fragment at high pH. To our knowledge, a similar effect of proteolytic cleavage on the pore-forming properties of a Cry toxin has not been reported earlier.

Kinetics of pore formation

Even at pH 7.5, osmotic swelling monitored for vesicles that were exposed simultaneously to an inwardly directed KCl gradient and to the toxin was remarkably slow in the presence of Cry9Ca, either one of its mutants, or its 55-kDa fragment (Fig. V.5). This conclusion is particularly evident when Cry9Ca results are compared with those obtained with Cry1Ac. These latter results agree closely with those of similar experiments published previously for this toxin [21,34,35], Cry1Aa [35–38], and even Cry1Ca [34]. Taken together with the pH effects discussed above, this observation suggests that the pore-forming ability of Cry9Ca depends strongly on electrostatic interactions between the toxin and the membrane. The influence of the biochemical and biophysical micro-environment in which toxin activity is assayed can differ considerably depending on the toxin being tested [13,34,40,47,48]. Cry9Ca appears to be particularly sensitive to such effects, but more work is required to fully evaluate the functional consequences of its interaction with components of the insect midgut.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and Valorisation-Recherche Québec. J.-F. Brunet received a graduate student scholarship from the FQRNT.

References

- [1] R.A. de Maagd, A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore, H.E. Schnepf, Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria, *Annu. Rev. Genet.* 37 (2003) 409-433.
- [2] J.Y. Roh, J.Y. Choi, M.S. Li, B.R. Jin, Y.H. Je, *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control, *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2007) 547-559.
- [3] E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, D.H. Dean, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 775-806.
- [4] A. Bravo, S.S. Gill, M. Soberón, Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon* 49 (2007) 423-435.
- [5] B. Oppert, Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42 (1999) 1-12.
- [6] V. Rukmini, C.Y. Reddy, G. Venkateswerlu, *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin, *Biochimie* 82 (2000) 109-116.
- [7] I. Gómez, L. Pardo-López, C. Muños-Garay, L.E. Fernandez, C. Pérez, J. Sánchez, M. Soberón, A. Bravo, Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*, *Peptides* 28 (2007) 169-173.
- [8] C.R. Pigott, D.J. Ellar, Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (2007) 255-281.
- [9] J.L. Gringorten, Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*, in: I. Ishaaya (ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer-Verlag, Berlin, 2001, pp. 167-207.
- [10] M. Kirouac, V. Vachon, D. Quievy, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 506-515.

- [11] D.J. Lightwood, D.J. Ellar, P. Jarrett, Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 5174-5181.
- [12] I. Gómez, J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo, M. Soberón, Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer prepore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin, *FEBS Lett.* 513 (2002) 242-246.
- [13] M. Fortier, V. Vachon, R. Frutos, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 6208-6213.
- [14] B. Lambert, L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet, M. Peferoen, A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 80-86.
- [15] F. Girard, V. Vachon, G. Préfontaine, L. Marceau, Y. Su, G. Larouche, C. Vincent, J.-L. Schwartz, L. Masson, R. Laprade, Cysteine scanning mutagenesis of α 4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2565-2572.
- [16] L. Masson, G. Préfontaine, L. Péloquin, P.C.K. Lau, R. Brousseau, Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1, *Biochem. J.* 269 (1990) 507-512.
- [17] L. Masson, A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas, R. Brousseau, Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system, *Mol. Microbiol.* 14 (1994) 851-860.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [19] D.J. Finney, *Probit Analysis*, Cambridge University Press, Cambridge, 1971, pp. 20-49.
- [20] M. Wolfersberger, P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F.V. Sacchi, B. Giordana, G.M. Hanozet, 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 (1987) 301-308.
- [21] J. Carrol, D.J. Ellar, An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay, *Eur. J. Biochem.* 214 (1993) 771-778.
- [22] M. Kirouac, V. Vachon, M. Fortier, M.-C. Trudel, A. Berteloot, J.-L. Schwartz, R. Laprade, A mechanical force contributes to the “osmotic swelling” of brush-border membrane vesicles, *Biophys. J.* 91 (2006) 3301-3312.
- [23] M. Kirouac, V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz, R. Laprade, 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 (2002) 171-179.
- [24] F. Girard, V. Vachon, G. Préfontaine, L. Marceau, J.-L. Schwartz, L. Masson, R. Laprade, Helix α 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin plays a critical role in the postbinding steps of pore formation, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 359-365.
- [25] L.J. Bird, R.J. Akhurst, Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins, *J. Invertebr. Pathol.* 94 (2007) 84-94.
- [26] K. van Frankenhuyzen, Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, *J. Invertebr. Pathol.* 101 (2009) 1-16.
- [27] C.N. Nicholls, W. Ahmad, D.J. Ellar, Evidence for two different types of insecticidal P2 toxins with dual specificity in *Bacillus thuringiensis* subspecies, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 5141-5147.
- [28] M. Audtho, A.P. Valaitis, O. Alzate, D.H. Dean, Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -endotoxin by protein engineering, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4601-4605.
- [29] J. Carroll, J. Li, D.J. Ellar, Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, *Biochem. J.* 261 (1989) 99-105.

- [30] J. Carroll, D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie, D.J. Ellar, Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity, *J. Invertebr. Pathol.* 70 (1997) 41-49.
- [31] F.S. Walters, C.M. Stacy, M.K. Lee, N. Palekar, J.S. Chen, An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in Domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against western corn rootworm larvae, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 367-374.
- [32] S. Guo, Y. Zhang, F. Song, J. Zhang, D. Huang, Protease-resistant core form of *Bacillus thuringiensis* CryIIe: monomeric and oligomeric forms in solution, *Biotechnol. Lett.* (2009) Published online DOI 10.1007/s10529-009-0078-2.
- [33] V. Sekar, B. Held, J. Tippett, B. Amirhusin, P. Robeff, K. Wang, H.M. Wilson, Biochemical and molecular characterization of the insecticidal fragment of CryV, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2798-2801.
- [34] L.B. Tran, V. Vachon, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4488-4494.
- [35] F. Coux, V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, M. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35546-35551.
- [36] V. Vachon, G. Préfontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin CryIAa, *Biochemistry* 41 (2002) 6178-6184.
- [37] V. Vachon, G. Préfontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade, L. Masson, Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin CryIAa display altered pore-forming abilities, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 6123-6130.
- [38] G. Lebel, V. Vachon, G. Préfontaine, F. Girard, L. Masson, M. Juteau, A. Bah, G. Larouche, C. Vincent, R. Laprade, J.-L. Schwartz, Mutations in domain I interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis*

- Cry1Aa toxin in insect midgut brush border membrane vesicles, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 3842-3850.
- [39] P. Butko, M. Cournoyer, M. Puzsai-Carey, W.K. Surewicz, Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC, *FEBS Lett.* 340 (1994) 89-92.
- [40] V. Vachon, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins, *J. Invertebr. Pathol.* 92 (2006) 160-165.
- [41] S.L. Slatin, C.K. Abrams, L. English, Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 (1990) 765-772.
- [42] J.-L. Schwartz, L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, E. Rousseau, Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers, *J. Membr. Biol.* 132 (1993) 53-62.
- [43] A. Lorence, A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero, A. Bravo, δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers, *FEBS Lett.* 360 (1995) 217-222.
- [44] J.-L. Schwartz, Y.-J. Lu, P. Söhnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson, M.J. Adang, Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors, *FEBS Lett.* 412 (1997) 270-276.
- [45] J.-L. Schwartz, L. Potvin, X.J. Chen, R. Brousseau, R. Laprade, D.H. Dean, Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by Cry1Aa, a *Bacillus thuringiensis* toxin, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3978-3984.
- [46] O. Peyronnet, V. Vachon, J.-L. Schwartz, R. Laprade, 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 (2001) 45-54.
- [47] M. Kirouac, V. Vachon, S. Rivest, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe, J. Membr. Biol. 196 (2003) 51-59.
- [48] M. Fortier, V. Vachon, M. Kirouac, J.-L. Schwartz, R. Laprade, Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins, J. Membr. Biol. 208 (2005) 77-87.

Table V.IToxicity of Cry9Ca and its two single-site mutants toward *M. sexta* neonate larvae

Protein	Form	EC ₅₀ ^a (ng/cm ²)	LC ₅₀ ^b (ng/cm ²)	LC ₉₀ ^b (ng/cm ²)
Cry9Ca	Protoxin	70 (30-170) ^c	190 (100-360)	570 (270-1190)
	Activated toxin	170 (70-400)	280 (140-570)	710 (320-1550)
	55-kDa fragment	180 (90-370)	450 (210-990)	940 (400-2200)
R164A	Protoxin	70 (30-160)	250 (110-380)	640 (290-1410)
	Activated toxin	130 (60-320)	250 (130-460)	460 (230-900)
R164K	Protoxin	70 (20-170)	210 (120-500)	520 (260-1020)
	Activated toxin	140 (70-300)	240 (120-450)	430 (220-870)

^a EC₅₀, toxin concentration required to cause a 50% reduction in larval weight gain.

^b LC₅₀ and LC₉₀, toxin concentrations required to kill 50 and 90% of the larvae, respectively.

^c 95% confidence intervals are shown in parentheses.

Figure legends

Fig. V.1. **Osmotic swelling of fifth-instar *M. sexta* larvae midgut brush border membrane vesicles induced by Cry9Ca.** Vesicles were incubated for 60 min with the indicated concentrations (in pmol of toxin per mg of membrane protein) of wild-type Cry9Ca in 1 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) (A) or CAPS-KOH (pH 10.5) (B). Their permeability to KCl was then assayed by monitoring scattered light intensity after rapid mixing with an equal volume of the same buffers supplemented with 150 mM KCl. The curves were averaged over 5 experiments performed with the same representative vesicle preparation and normalized relative to control values measured in the absence of toxin.

Fig. V.2. **Effect of pH on the KCl permeability of the pores formed by Cry9Ca, its 55-kDa fragment and single-site mutants R164A and R164K in fifth-instar *M. sexta* midgut brush border membrane vesicles.** These were incubated for 60 min with the indicated concentrations of Cry9Ca (A), its 55-kDa fragment (B), R164A (C), or R164K (D) in 1 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM MES-KOH (pH 6.5) (●), HEPES-KOH (pH 7.5) (■), Tris-HCl (pH 8.5) (▲), CHES-KOH (pH 9.5) (▼), or CAPS-KOH (pH 10.5) (◆). Their permeability to KCl was then assayed as illustrated in Fig. V.1. Percent volume recovery was calculated as described under Materials and Methods.

Fig. V.3. **Effect of thiocyanate and valinomycin on the Cry9Ca-induced permeability of *M. sexta* brush border membrane vesicles.** These were incubated for 60 min in 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5) and 1 mg/ml bovine serum albumin, with or without (Control) 150 pmol of wild-type Cry9Ca or Cry1Ac per mg of membrane protein, 0.15% (v/v) ethanol (EtOH), or 7.5 μ M valinomycin (Val), as indicated for each tracing. The vesicles were rapidly mixed with an equal volume of 10 mM CAPS-KOH (pH 10.5), 1 mg/ml bovine serum albumin, and 150 mM KSCN (A) or KCl (B). Scattered light intensity was monitored as described in the legend of Fig. V.1.

Fig. V.4. **Permeability of *M. sexta* brush border membrane vesicles to various solutes induced by Cry9Ca, its 55-kDa fragment, its single-site mutants, R164A and R164K, or Cry1Ac.** Experiments were carried at pH 7.5 (open bars) and

10.5 (hatched bars) with 150 pmol of toxin per mg of membrane protein as illustrated in Fig. V.1, except that 150 mM KCl (A) was replaced with either 150 mM N-methyl-D-glucamine-HCl (B) or potassium gluconate (C), or with 300 mM sucrose (D) or raffinose (E). Because N-methyl-D-glucamine is not ionized at pH 10.5, this solute was only tested at pH 7.5 (B). In addition, because Cry9Ca, R164A and R164K were poorly active at pH 10.5 in the presence of KCl (A), only the 55-kDa fragment and Cry1Ac were tested at the higher pH in the presence of the other solutes (C-E).

Fig. V.5. Kinetics of pore formation of Cry1Ac, Cry9Ca, its 55-kDa fragment, and its single-site mutants in *M. sexta* brush border membrane vesicles at pH 7.5. The KCl permeability of *M. sexta* brush border membrane vesicles was assayed at pH 7.5 as described in the legend of Fig. V.1 except preincubation with toxin was omitted. Instead, 150 pmol of the indicated toxins/mg membrane protein and 150 mM KCl were added simultaneously to the vesicles. Percent volume recovery was computed as described under Materials and Methods. For clarity, error bars are only shown for every 50th experimental point.

Figure V.1

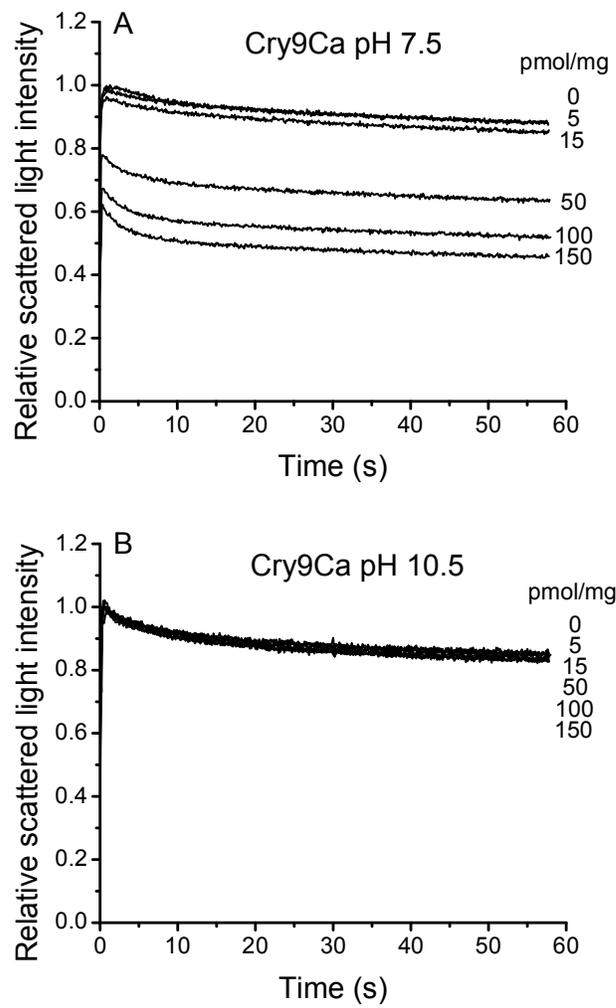


Figure V.2

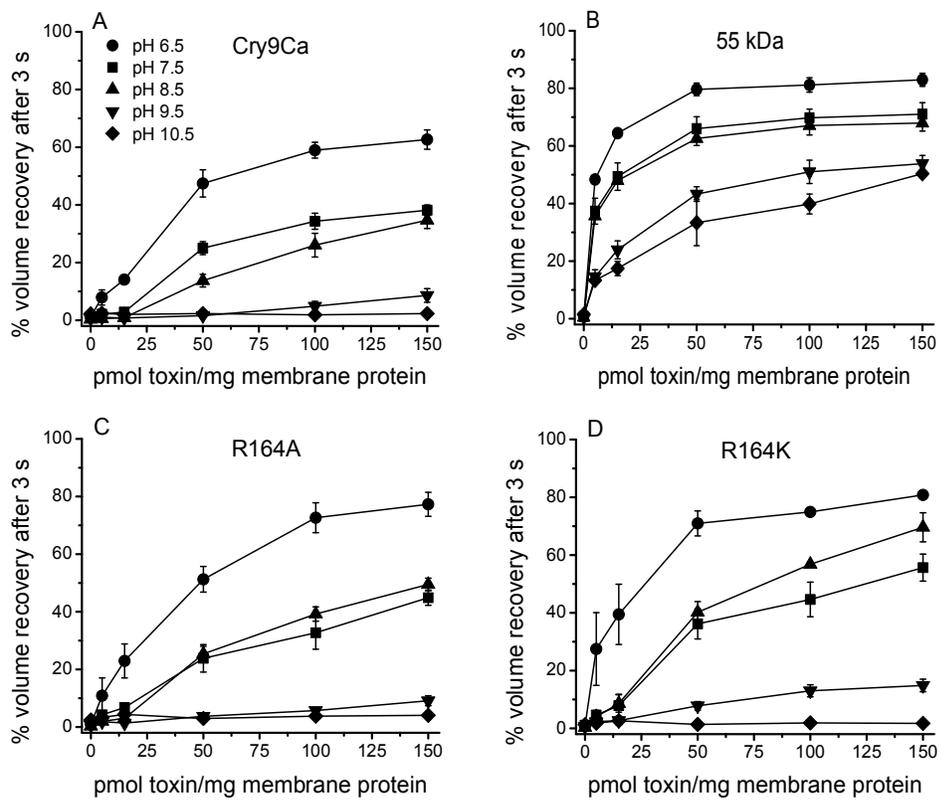


Figure V.3

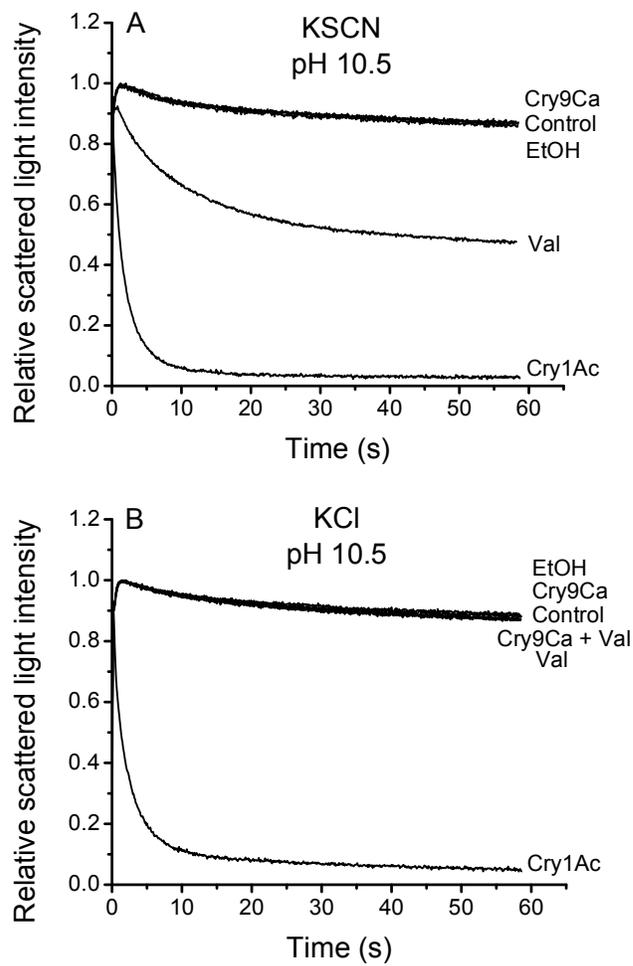


Figure V.4

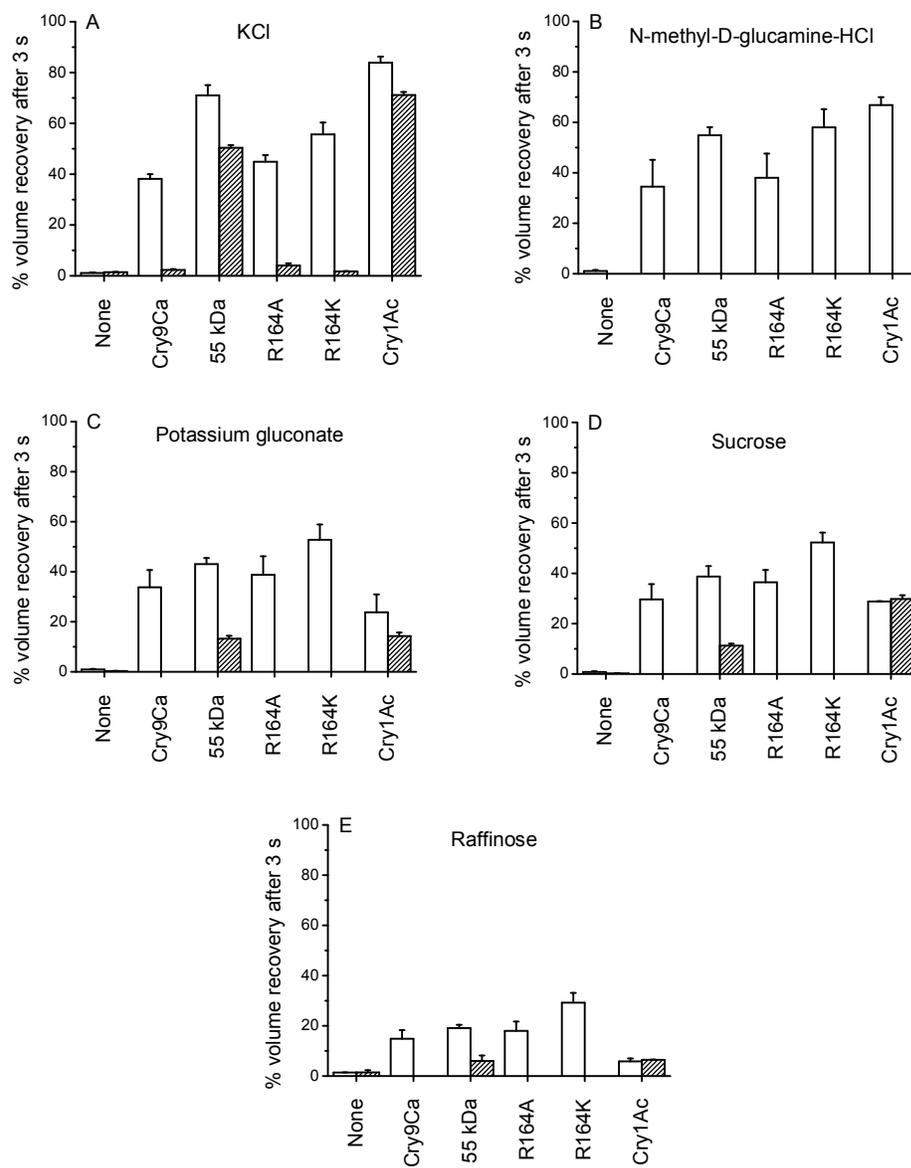
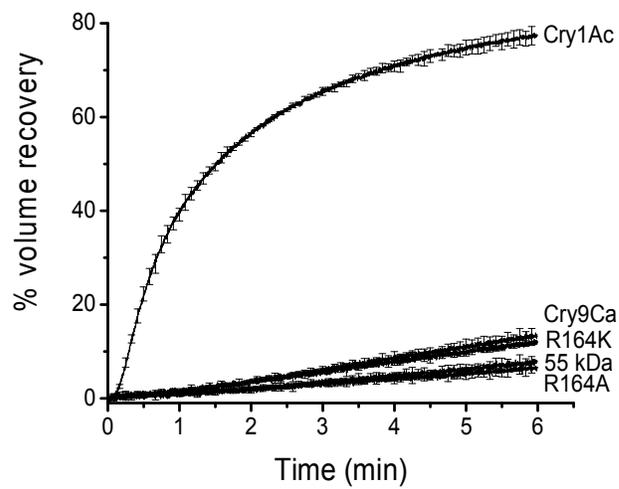


Figure V.5



Chapitre VI

**Midgut juice components affect pore
formation by the *Bacillus thuringiensis*
insecticidal toxin Cry9Ca**

Jean-Frédéric Brunet^{a,*}, Vincent Vachon^a, Mireille Marsolais^a, Jeroen Van Rie^b, Jean-
Louis Schwartz^a, Raynald Laprade^a

^a *Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, Montreal,
Quebec, H3C 3J7, Canada, and* ^b *Bayer BioScience NV, Ghent, Belgium*

* Corresponding author. Mailing address: Groupe d'étude des protéines membranaires,
Université de Montréal, P. O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal, Quebec H3C
3J7, Canada. Phone: (514) 343-7960. Fax: (514) 343-7146. E-mail: -----.

Résumé

La capacité à former des pores de la Cry9Ca, une toxine du bacille de Thuringe, de ses mutants simples R164A et R164K, et d'un fragment de 55 kDa résultant d'une protéolyse au niveau de son résidu R164 a été évaluée dans une variété de conditions expérimentales à l'aide d'une technique électrophysiologique. Les quatre préparations de toxine ont dépolarisé la membrane apicale d'intestins médians fraîchement isolés de larves de troisième stade du sphinx du tabac et baignant dans une solution à pH 10.5 contenant 122 mM de KCl. Le fragment de 55 kDa s'est toutefois révélé beaucoup plus actif que la forme non tronquée de la toxine et de ses deux mutants. L'activité de ces trois dernières formes de la toxine a néanmoins été fortement stimulée lorsque les expériences ont été exécutées en présence de suc intestinal provenant de larves du sphinx du tabac de cinquième stade. Cet effet a aussi été observé après que les protéines du suc eurent été dénaturées par chauffage à 95°C ou que son contenu en ions inorganiques et en petites molécules eût été fortement réduit par une dialyse prolongée. Une stimulation similaire de l'activité de la toxine a aussi été observée lorsque les expériences ont été effectuées en présence des lipides extraits à partir d'un volume équivalent de suc intestinal. La dépolarisation de la membrane cellulaire a aussi été grandement augmentée, en absence de suc intestinal, par l'addition d'un cocktail aqueux d'inhibiteurs de protéases. Ces résultats indiquent que, d'une part, selon le site de clivage et les conditions expérimentales utilisées, des protéolyses supplémentaires de la toxine Cry9Ca activée peuvent soit stimuler, soit nuire à son activité et que, d'autre part, le suc intestinal du sphinx du tabac contient probablement un inhibiteur de protéases qui pourrait jouer un rôle important dans l'activité des toxines du bacille de Thuringe.

Abstract

The pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry9Ca, its two single-site mutants R164A and R164K, and the 55-kDa fragment resulting from its proteolytic cleavage at R164 was evaluated under a variety of experimental conditions using an electrophysiological assay. All four toxin preparations depolarized the apical membrane of freshly isolated third-instar *Manduca sexta* midguts bathing in a solution containing 122 mM KCl at pH 10.5, but the 55-kDa fragment was considerably more active than Cry9Ca and its mutants. The activity of the latter toxins was greatly enhanced, however, when the experiments were conducted in the presence of fifth-instar *M. sexta* midgut juice. This effect was also observed after midgut juice proteins had been denatured by heating at 95°C or after inorganic ions and small molecules had been removed from the midgut juice by extensive dialysis. A similar stimulation of toxin activity was also observed when the experiments were carried out in the presence of the lipids extracted from an equivalent volume of midgut juice. Depolarization of the cell membrane was also greatly enhanced, in the absence of midgut juice, by the addition of a cocktail of water-soluble protease inhibitors. These results indicate that, depending on the cleavage site and on the experimental conditions used, further proteolysis of the activated Cry9Ca toxin can either stimulate or be detrimental to its activity and that *M. sexta* midgut juice probably contains protease inhibitors that could play a major role in the activity of *B. thuringiensis* toxins in the insect midgut.

Keywords: Insecticidal toxin; Membrane potential; Pore formation; Protease inhibitors; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Introduction

The mechanism of action of the insecticidal crystal toxins produced by the gram-positive bacterium *Bacillus thuringiensis* during sporulation has been the focus of intensive research (Schnepf et al., 1998; Gringorten, 2001; Bravo et al., 2007). Toxicity depends on the ability of these proteins to form pores in the luminal membrane of midgut epithelial columnar cells after having bound to specific receptors located at the surface of this membrane (Gómez et al., 2007; Pigott and Ellar, 2007). The rate of pore formation may vary considerably depending on the toxin which is being studied and the experimental conditions under which it is measured. In particular, pore formation has been found to depend on pH (Tran et al., 2001; Vachon et al., 2006), on the combined effect of pH and ionic strength (Kirouac et al., 2003; Fortier et al., 2005) and on the activity of midgut proteases. In fact, *B. thuringiensis* crystal proteins are first synthesized as inactive protoxins that are later converted into activated toxins by proteases in the insect midgut (Oppert, 1999; Rukmini et al., 2000). Further proteolysis, in the midgut lumen or once the toxin has bound to its receptor, has variously been suggested to be essential (Gómez et al., 2002; Bravo et al., 2004; Rausell et al., 2004), unnecessary (Kirouac et al., 2006; Lebel et al., 2009), stimulatory (Lightwood et al., 2000) and detrimental (Forcada et al., 1996; Keller et al., 1996; Pang and Gringorten, 1998; Shao et al., 1998; Fortier et al., 2007; Rausell et al., 2007) to toxin activity.

Among the crystal toxins studied so far, Cry9Ca is particularly sensitive to proteolysis at a trypsin cleavage site corresponding to R164 and predicted to be located within the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop, in the pore-forming domain of the activated toxin (Lambert et al., 1996). In addition, the pore-forming activity of this toxin, and of its single-site mutants R164A and R164K, has recently been shown to depend strongly on the pH of the solutions used in osmotic swelling experiments carried out with *Manduca sexta* brush border membrane vesicles (Brunet et al., in press). Although neither mutation had significant effects on toxicity, measured by bioassays on insect larvae, the isolated 55-kDa fragment resulting from cleavage at R164 was considerably more active at high pH than the other toxin preparations in the vesicles. Because these results demonstrate that the activity of Cry9Ca can be strongly influenced by the experimental conditions under

which it is measured, the ability of this toxin, its two mutants, and its 55-kDa fragment to depolarize the apical membrane of *M. sexta* midgut epithelial cells was further analyzed, in the present study, with intracellular microelectrodes. Our results indicate that membrane-bound proteases considerably reduce toxin activity and suggest that midgut juice probably contains protease inhibitors that could, along with the intestinal proteases, play an important role in *B. thuringiensis* toxin function.

Materials and Methods

Toxin activation and purification

The various forms of Cry9Ca were prepared using *Escherichia coli* W6K strains producing the appropriate single recombinant proteins as described earlier (Lambert et al., 1996). Protoxins were activated with porcine trypsin (Gibco, Grand Island, NY) and the resulting toxins were purified by fast protein liquid chromatography using a mono-Q ion exchange column (Pharmacia Biotech, Montreal, Qc) and eluting bound toxin with a NaCl gradient as described previously (Masson et al., 1990, 1994). The conversion of Cry9Ca and its R164K mutant to the 55-kDa species was minimized by stopping the reaction with a cocktail of protease inhibitors (Calbiochem, San Diego, CA) composed of 100 mM 4-(aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), 80 μ M aprotinin, 5 mM bestatin, 1.5 mM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E64), 2 mM leupeptin, and 1 mM pepstatin A, in dimethyl sulfoxide, and added at a final 100-fold dilution. On the other hand, the 55-kDa fragment was isolated by repeatedly adding fresh trypsin to the wild-type protoxin preparation, until the conversion was complete.

Midgut juice and protease inhibitors

M. sexta fertilized eggs were obtained from the North Carolina State University Department of Entomology insectary (Raleigh, NC) and larvae were reared on the artificial diet obtained from the same source. Intestinal juice was collected from whole midguts isolated from fifth-instar larvae as described earlier (Fortier et al., 2007) and stored at -80°C in small aliquots. For some experiments, the juice was heated at 95°C for 5 min and centrifuged for another 5 min at 16 000 \times g to remove insoluble material. Alternatively, heated midgut juice was dialyzed overnight in Spectra/Por ®

molecularporous membrane tubing (molecular mass cutoff: 6-8 kDa; Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) against a 1000-fold excess volume of 122 mM KCl, 5 mM CaCl₂ and 5 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid (CAPS)-KOH (pH 10.5) (122K solution). Lipids were extracted from *M. sexta* midgut juice using the method of Bligh and Dyer (1959) as modified by Kates (1972). Because dimethyl sulfoxide had detrimental effects on membrane potential, the protease inhibitor cocktail used in some electrophysiological experiments was composed of an aqueous solution of 50 mM AEBSF, 1 mg/ml antipain, 0.015 mM aprotinin, 0.1 mM E64 and 0.1 mM leupeptin and diluted 100-fold. The inhibitors were obtained from Sigma Aldrich Canada (Oakville, Ont.).

Membrane potential measurements

Electrical potential across the apical membrane of *M. sexta* midgut epithelial cells was measured as described earlier (Peyronnet et al., 1997). This approach takes advantage of the fact that, when a freshly isolated larval midgut is cut transversely, both of its ends curl back onto themselves. A short segment of midgut was aspirated into a glass pipette from one end until its other end curled around the pipette tip, thus exposing the apical surface of the epithelial cells. Experiments were carried out with midguts freshly isolated from third-instar larvae and bathed in the 122K solution. Midgut cells were impaled with a glass microelectrode filled with 1 M KCl. Electrode resistance was between 50 and 250 MΩ. The impalements were considered successful when a sharp and sustained change in potential (negative inside) was observed. The signal was amplified with an M-707 microprobe system (WP Instruments, Hamden, CT), monitored with an oscilloscope (Kikusui Electronics, Yokohama, Japan) and a strip chart recorder (BBC Goerz Metrawatt, Wiener Neudorf, Austria). The bath was perfused continuously with the 122K solution until the membrane potential was stable for 5 min. Perfusion was then stopped and 1.2 ml of perfusion solution containing 10 µg/ml of the appropriate toxin, in the presence or absence of 10% (v/v) midgut juice, the lipids extracted from the equivalent of 10% (v/v) midgut juice, or 1% (v/v) protease inhibitor cocktail, was added directly to the bath. After 5 min, the preparation was rinsed for another 10 min by resuming the perfusion. All experiments were carried out at room temperature.

Because midgut juice contains a high concentration of potassium ions (Fortier et al., 2007), the solutions used for experiments in which the tissue was exposed to either untreated or heated midgut juice were prepared by first diluting these materials sufficiently in a solution composed of 5 mM CaCl₂ and 5 mM CAPS-KOH (pH 10.5) to reach a potassium concentration of approximately 122 mM and adjusting the final volume with the appropriate amount of the 122K solution.

Data analysis

Measured voltages, V , were normalized relative to the voltage measured just before the perfusion was stopped, V_0 . The percentage of depolarization with respect to the control is defined as: $[1 - (V/V_0)_{\text{EXP}} / (V/V_0)_{\text{CTL}}] \times 100$, where $(V/V_0)_{\text{EXP}}$ is the normalized experimental result and $(V/V_0)_{\text{CTL}}$ is the normalized result measured in the absence of toxin. All statistical comparisons were made with unpaired Student's t tests, using the Welch correction when the standard deviations were too different, with the InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Results

Membrane potential measurements

Pore formation by Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its two single-site mutants, R164A and R164K, was studied by measuring membrane potential across the luminal membrane of midgut epithelial cells of isolated *M. sexta* midguts under a variety of experimental conditions (Fig. VI.1). As pointed out earlier (Peyronnet et al., 1997), membrane potential dropped somewhat during the 5 min during which the perfusion was stopped, even in the absence of toxin. The level attained during this period was especially low when the added material included unmodified (Fig. VI.1B) or heated midgut juice (Fig. VI.1C). Because the potassium concentration was adjusted as described under Material and Methods, this effect is probably due to a higher concentration of other ions in midgut juice than in the 122K bathing solution. In any case, in the absence of toxin, membrane potential always increased rapidly, as soon as the perfusion was resumed, approaching the value that was measured before the addition was made.

The wild-type toxin and its two mutants depolarized the cell membrane of midguts bathing in the 122K solution (Fig. VI.1A). The rate of depolarization was nevertheless rather slow when compared with that observed in the presence of the 55-kDa fragment. For instance, 15 min after the addition, percent depolarization reached (65 ± 13)% for the wild-type toxin, (47 ± 15)% for R164A, and (45 ± 12)% for R164K. In contrast, membrane potential was practically abolished during the same period in the presence of the 55-kDa fragment.

Effect of midgut juice

In the presence of 10% midgut juice, wild-type Cry9Ca and its R164K mutant completely depolarized the membrane, at a rate which was similar to that observed with the 55-kDa fragment (Fig. VI.1B). However, under these conditions, only a much smaller increase in the depolarization rate was observed for the R164A mutant. The percent depolarization attained (58 ± 14) 10 min after exposure to the toxin was significantly ($P < 0.05$) lower than that observed with the other toxins. To investigate whether this effect could be due to an enzymatic activity, these experiments were repeated using midgut juice that had previously been heated at 95°C for 5 min (Fig. VI.1C). Under these conditions, wild-type Cry9Ca and its R164K mutant still completely depolarized the membrane, and the R164A mutant was slightly, but not significantly, more active (79 ± 9)% depolarization after 10 min) than in the previous experiment. To investigate the possible contribution of inorganic ions and other small molecules, similar experiments were performed with heated midgut juice after extensive dialysis (Fig. VI.1D). However, the results were essentially the same as those obtained previously with heated midgut juice (Fig. VI.1C). Midguts were later exposed to the toxins in the presence of total lipids that had been extracted from midgut juice and resuspended in the 122K solution. The amount of added lipid was adjusted to ensure that it was equivalent to that present in the midgut juice used in the other experiments. Under these conditions, wild-type Cry9Ca again completely depolarized the membrane and both mutants displayed an activity (Fig. VI.1E) that was comparable to that measured previously in the presence of heated and dialyzed midgut juice (Fig. VI.1D).

Effect of protease inhibitors

Because membrane-bound proteases could affect toxin activity, experiments were conducted using a cocktail containing a broad range of water-soluble protease inhibitors. Under these conditions, Cry9Ca and its two mutants rapidly and fully depolarized the membrane, even in the absence of midgut juice components (Fig. VI.1F)..

Discussion

The results of the present study confirm and extend our previous conclusion that the pore-forming ability of Cry9Ca and its mutants is particularly sensitive to the biochemical and biophysical micro-environment in which it is tested (Brunet et al., in press). In particular, these toxins depolarized the apical membrane of midgut epithelial cells in the 122K solution, in which the pH was adjusted to 10.5 (Fig. VI.1A). This observation contrasts sharply with the results of our previous osmotic swelling experiments in which Cry9Ca and its two mutants were inactive at this high pH value, even after the brush border membrane vesicles had been incubated with either one of these three toxins for an hour. In contrast, however, the fact that the 55-kDa fragment was active in the experiments reported here, correlates well with its ability to form pores efficiently at pH 10.5 in osmotic swelling experiments.

As discussed earlier, the reason why the 55-kDa fragment is often more active than the other Cry9Ca toxin preparations tested is not fully understood considering the observation that its toxicity against insect larvae was found to be comparable to that of Cry9Ca and its two mutants (Lambert et al., 1996; Brunet et al., in press). On the other hand, the fact that the in vitro activity of wild-type Cry9Ca and its mutants was higher in the present study than could have been suggested from the osmotic swelling data suggests that these toxins could function more efficiently, at high pH, in the presence of a higher ionic strength or calcium ions as was observed previously for Cry1Ca (Fortier et al., 2005). The activity of Cry1Ca in the 122K solution (Fortier et al., 2005) was nevertheless much superior to that of Cry9Ca or either one of its mutants (Fig. VI.1A). Furthermore, osmotic swelling experiments in which the rate of pore formation was evaluated in the presence of calcium ions revealed that this ion stimulated pore formation

by Cry1Ca (Fortier et al., 2005), but had no significant effect on the activity of Cry9Ca and either one of its mutants (data not shown). Another factor that could possibly contribute to the higher activity of these toxins in the isolated midgut assay is the presence of an inside-negative electrical potential across the membrane, at least at the beginning of the experiment, which is absent during the vesicle assay. Such a potential was previously found, on the basis of theoretical (Biggin and Sansom, 1996) and experimental (Lemeshko et al., 2005) data, to enhance the insertion of α -helical peptides corresponding to segments of the putative pore-forming domain of different Cry toxins. However, in the case of the whole toxin, a detailed study of this possibility would probably necessitate a more elaborate experimental setup than that used in the present study in which membrane potential measurements are used to evaluate pore formation.

The fact that the 55-kDa fragment was more active than the other Cry9Ca preparations, at least in these *in vitro* experiments, may suggest that proteolysis at residue 164 contributes to pore formation. In agreement with this hypothesis, the activity of Cry9Ca and its R164K mutant was strongly stimulated by the addition of midgut juice, along with its proteases, to the bathing solution during exposure to the toxins, whereas that of the R164A mutant, in which the trypsin cleavage site at position 164 has been removed, was much less affected (Fig. VI.1B). Similar experiments have previously shown that, in the presence of midgut juice extract, the activity of the Cry1Ab toxin was greatly enhanced in comparison with those of Cry1Aa, its R233A mutant, Cry1Ac, Cry1Ca and Cry1Ea (Fortier et al., 2007). However, for both Cry9Ca (Fig. VI.1C) and Cry1Ab (Fortier et al., 2007), a similar stimulation was observed when the experiment was repeated with midgut juice that had previously been heated sufficiently to denature most proteins. Admittedly, it cannot be excluded, on the basis of this result, that midgut juice could contain a heat-resistant protease. However, such an enzyme could only contribute very slightly to the stimulatory effect of midgut juice since the toxins displayed a comparable activity when midgut juice (Fig. VI.1B) was replaced by its lipids (Fig. VI.1E).

Although these considerations strongly suggest that, after the activation step, midgut juice proteases have relatively little effect on toxin activity, our observation that

membrane depolarization by Cry9Ca, and by its R164A and R164K mutants, was greatly stimulated by the presence of protease inhibitors (Fig. VI.1F) indicates a major influence of membrane-bound proteases. A similar result was reported earlier for Cry1Ab (Fortier et al., 2007). These latter results contrast, however, with those of our previous study (Brunet et al., in press) in which the rate of pore formation, in brush border membrane vesicles, by these toxins was not influenced by the presence of the same inhibitors. It should nevertheless be pointed out that, in the membrane potential assay experiments, the midguts were used immediately after having been isolated. In contrast, the brush border membrane vesicles used for the osmotic swelling assay experiments were prepared from midguts that had been frozen and thawed. The vesicles were also frozen and thawed after having been purified. In addition, the preparation of brush border membrane vesicles involves a rather elaborate protocol which requires at least a few hours (Wolfersberger et al., 1987). In this context, the enzyme activity remaining, during the experiments, could be expected to be much higher in the isolated midguts than in the membrane vesicles.

The stimulation of toxin activity by protease inhibitors (Fig. VI.1F) indicates that, in the intact midgut, Cry9Ca toxins are sensitive to degradation by proteolytic enzymes. This degradation most probably involves proteolysis sites other than R164, however, since the inhibitors affected both mutants equally well. As discussed elsewhere in some detail for Cry1Ab (Fortier et al., 2007), stimulation of toxin activity by protease inhibitors is at variance with the suggestion, made for Cry1A (Gómez et al., 2002; Bravo et al., 2004) and Cry3 (Rausell et al., 2004) toxins, that a proteolytic cleavage within domain I of the toxin could play an obligatory role in toxin oligomerization and pore formation. On the other hand, addition of midgut juice, which undoubtedly contains proteases, did not hinder toxin activity, but had a rather strong stimulatory effect (Fig. VI.1B). Taken together, these observations may suggest that midgut juice contains one or more compounds that act like protease inhibitors. These are unlikely to be small hydrophilic compounds since the stimulatory effect of midgut juice was preserved after extensive dialysis (Fig. VI.1D). In fact, these molecules appear to be heat-stable (Fig. VI.1C) and hydrophobic enough to have been extracted by chloroform along with the other lipids (Fig. VI.1E). Alternatively, the midgut juice lipids could act, somewhat like surfactants, to stabilize the three-dimensional structure of the toxins, in the aqueous environment of

the midgut, and thus prevent their proteolysis. They could also possibly facilitate, like surfactants, the insertion of the toxins in the membrane. This explanation appears less likely, however, in view of the observation that the stimulation of toxin activity by midgut juice, which was clearly observed with Cry9Ca and its mutants (this study) and with Cry1Ab (Fortier et al., 2007), could not be demonstrated with several other Cry toxins (Fortier et al., 2007).

In summary, the functional properties of Cry9Ca depend, not only on pH (Brunet et al., in press), but also on several other biochemical and biophysical factors which include ionic strength and the presence of proteases, in the midgut lumen and at the surface of midgut epithelial cells, and possibly membrane potential and the presence, in midgut juice, of protease inhibitors. Although much work remains to be done in order to characterize these putative compounds, the fact that they could play a major role in preserving toxin activity is also supported by the observation that protease inhibitors can potentiate Cry toxin activity in bioassays with certain insect larvae (MacIntosh et al., 1990; Shao et al., 1998). Despite several reports demonstrating that midgut micro-environmental factors can greatly affect toxin activity (Pang and Gringorten, 1998; Shao et al., 1998; Tran et al., 2001; Fortier et al., 2005, 2007; Vachon et al., 2006), this aspect of their mode of action has been largely overlooked. Nevertheless, because at least some of these factors are likely to vary in function of the physiological state of the insect, they could contribute to the still poorly understood mechanisms by which the efficacy of *B. thuringiensis* crystal toxins often depends on biological factors such as larval instar (Wierenga et al., 1996; van Frankenhuyzen et al., 1997) and nutrition (Bauer, 1992; Meade and Hare, 1993; Appel and Schultz, 1994; Moldenke et al., 1994; Farrar et al., 1996; Beveridge and Elek, 2001; Kouassi et al., 2001).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and Valorisation-Recherche Québec. J.-F. Brunet received a graduate student scholarship from the FQRNT.

References

- Appel, H.M., Schultz, J.C., 1994. Oak tannins reduce effectiveness of Thuricide (*Bacillus thuringiensis*) in the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 1736–1742.
- Bauer, L.S., 1992. Response of the imported willow leaf beetle to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on poplar and willow. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 330–331.
- Beveridge, N., Elek, J.A., 2001. Insect and host-tree species influence the effectiveness of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis*-based insecticide for controlling chrysomelid leaf beetles. *Aust. J. Entomol.* 40, 386–390.
- Biggin, P.C., Sansom, M.S.P., 1996. Simulation of voltage-dependent interactions of α -helical peptides with lipid bilayers. *Biophys. Chem.* 60, 99–110.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 38–46.
- Brunet, J.-F., Vachon, V., Juteau, M., Van Rie, J., Larouche, G., Vincent, C., Schwartz, J.-L., Laprade, R., in press. Pore-forming properties of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry9Ca in *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, in press, doi:10.1016/j.bbamem.2010.02.006. (Chapitre V de cette these)
- Farrar, R.R., Jr., Martin, P.A.W., Ridgway, R.L., 1996. Host plant effects on activity of *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environ. Entomol.* 25, 1215–1223.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M.D., Martínez, R., 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one

- resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 31, 257–272.
- Fortier, M., Vachon, V., Frutos, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 2007. Role of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6208–6213.
- Fortier, M., Vachon, V., Kirouac, M., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 2005. Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. J. Membr. Biol. 208, 77–87.
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muños-Garay, C., Fernandez, L.E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M., Bravo, A., 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. Peptides 28, 169–173.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M., 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett. 513, 242–246.
- Gringorten, J.L., 2001. Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In: Ishaaya, I. (Ed.), Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. Springer-Verlag, Berlin, pp. 167–207.
- Kates, M., 1972. Techniques in Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 347–353.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. Insect Biochem. Mol. Biol. 26, 365–373.
- Kirouac, M., Vachon, V., Quievy, D., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 2006. Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. Appl. Environ. Microbiol. 72, 506–515.

- Kirouac, M., Vachon, V., Rivest, S., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 2003. Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* 196, 51–59.
- Kouassi, K.C., Lorenzetti, F., Guertin, C., Cabana, J., Mauffette, Y., 2001. Variation in the susceptibility of the forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) to *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* HD-1: effect of the host plant. *J. Econ. Entomol.* 94, 1135–1141.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., Van Rie, J., Van Vliet, A., Peferoen, M., 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 80–86.
- Lebel, G., Vachon, V., Préfontaine, G., Girard, F., Masson, L., Juteau, M., Bah, A., Larouche, G., Vincent, C., Laprade, R., Schwartz, J.-L., 2009. Mutations in domain I interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in insect midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3842–3850.
- Lemeshko, V.V., Arias, M., Orduz, S., 2005. Mitochondria permeabilization by a novel polycation peptide BTM-P1. *J. Biol. Chem.* 280, 15579–15586.
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J., Jarrett, P., 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5174–5181.
- MacIntosh, S.C., Kishore, G.M., Perlak, F.J., Marrone, P.G., Stone, T.B., Sims, S.R., Fuchs, R.L., 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1145–1152.
- Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V., Brousseau, R., 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* 14, 851–860.
- Masson, L., Préfontaine, G., Péloquin, L., Lau, P.C.K., Brousseau, R., 1990. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269, 507–512.

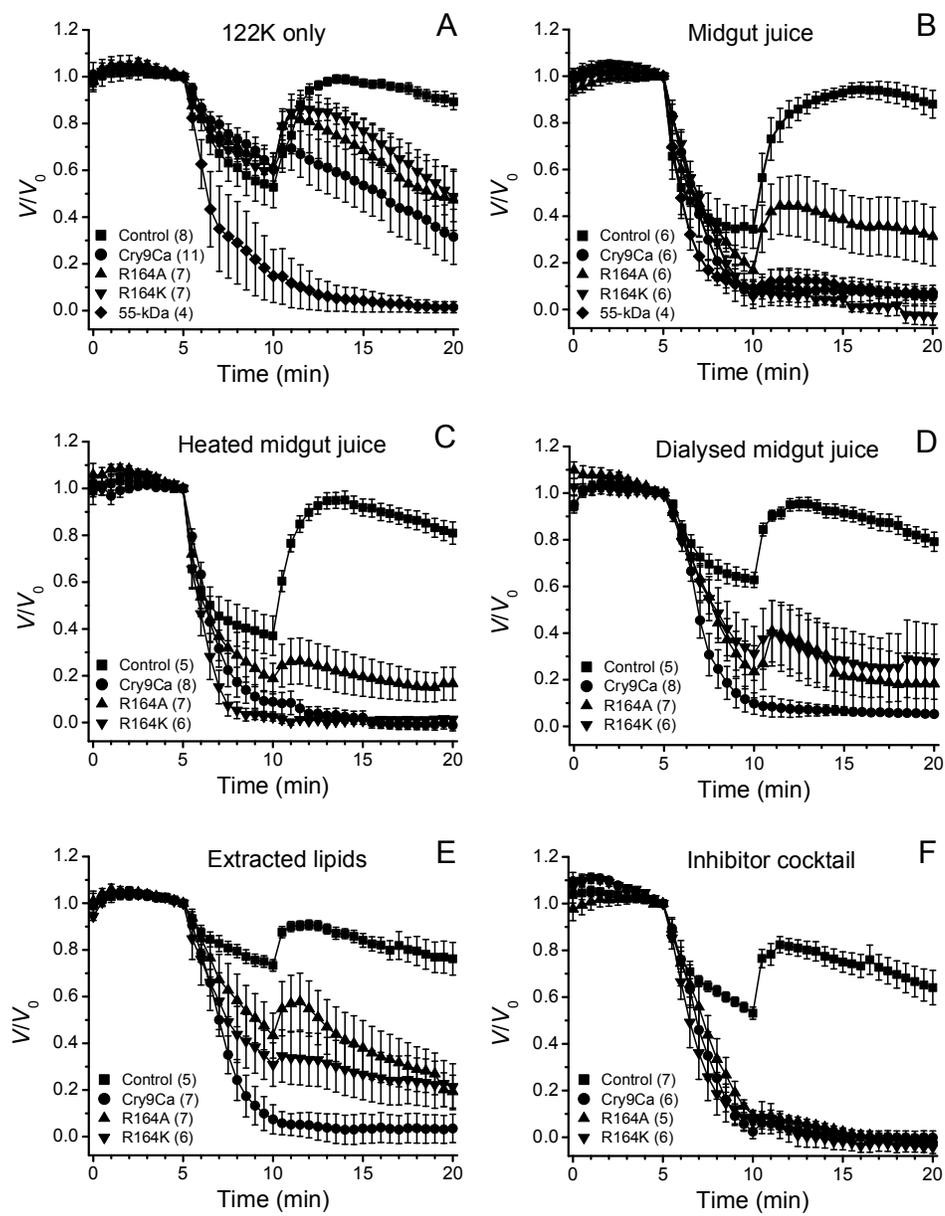
- Meade, T., Hare, J.D., 1993. Effects of differential host plant consumption by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on *Bacillus thuringiensis* efficacy. *Environ. Entomol.* 22, 432–437.
- Moldenke, A.F., Berry, R.E., Miller, J.C., Wernz, J.G., Li, X.-H., 1994. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to gypsy moth, *Lymantria dispar*, fed with alder or Douglas-fir. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 143–145.
- Oppert, B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 1–12.
- Pang, A.S.D., Gringorten, J.L., 1998. Degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in host insect gut juice. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 281–285.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Brousseau, R., Baines, D., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1679–1684.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255–281.
- Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, A.C., Real, M.D., Bravo, A., 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim. Biophys. Acta* 1660, 99–105.
- Rausell, C., Ochoa-Campuzano, C., Martínez-Ramírez, A.C., Bravo, A., Real, M.D., 2007. A membrane associated metalloprotease cleaves Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin reducing pore formation in Colorado potato beetle brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2293–2299.
- Rukmini, V., Reddy, C.Y., Venkateswerlu, G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* 82, 109–116.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.

- Shao, Z., Cui, Y., Liu, X., Yi, H., Ji, J., Yu, Z., 1998. Processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 73–81.
- Tran, L.B., Vachon, V., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4488–4494.
- Vachon, V., Schwartz, J.-L., Laprade, R., 2006. Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 160–165.
- van Frankenhuyzen, K., Gringorten, L., Dedes, J., Gauthier, D., 1997. Susceptibility of different instars of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* estimated with a droplet-feeding method. *J. Econ. Entomol.* 90, 560–565.
- Wierenga, J.M., Norris, D.L., Whalon, M.E., 1996. Stage-specific mortality of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on transgenic potatoes. *J. Econ. Entomol.* 89, 1047–1052.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 301–308.

Figure legend

FIG. VI.1. **Effect of Cry9Ca, its 55-kDa fragment and its single-site mutants R164A and R164K on the apical membrane potential of midgut epithelial cells from *M. sexta*.** Freshly isolated midguts from third-instar larvae were mounted as described in Materials and Methods and perfused for 5 min with the 122K solution. The perfusion was stopped and 1.2 ml of perfusion solution containing no toxin (■) or 10 $\mu\text{g/ml}$ of either Cry9Ca (●), its mutants R164A (▲) or R164K (▼), or its 55-kDa fragment (◆) was added directly to the bath. These additions were made in the absence (A) or presence of 10% midgut juice (B), heated midgut juice (C), heated and dialyzed midgut juice (D), lipids extracted from midgut juice (E), or a protease inhibitor cocktail (F). After 5 min, the midgut was rinsed with the 122K solution by resuming the perfusion. V is the membrane potential measured at the indicated times and V_0 , which averaged (-64 ± 4) mV in the 37 experiments illustrated in panel A, is the membrane potential measured immediately preceding the addition of toxin. For the experiments illustrated in panels B, C, D, E, and F, respectively, this value averaged (-68 ± 5) , (-78 ± 5) , (-79 ± 6) , (-66 ± 5) , and (-58 ± 5) mV. Values are means \pm standard error of the mean calculated for the number of independent experiments indicated in parentheses for each toxin.

Figure VI.1



Chapitre VII

**Effects of Mutations within Surface-
exposed Loops in the Pore-Forming
Domain of the Cry9Ca Insecticidal Toxin
of *Bacillus thuringiensis***

Jean-Frédéric Brunet¹, Vincent Vachon¹, Mireille Marsolais¹, Greta Arnaut², Jeroen Van Rie², Lucie Marceau¹, Geneviève Larouche³, Charles Vincent³, Jean-Louis Schwartz¹ and Raynald Laprade^{1*}.

¹ *Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, P. O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada*

² *Bayer BioScience NV, Ghent, Belgium*

³ *Horticultural Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, Quebec, J3B 3E6, Canada.*

* Corresponding author: Mailing address: Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, P. O. Box 6128, Centre Ville Station, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada. E-mail: -----.

Résumé

Le Domaine I des toxines insecticides Cry du bacille de Thuringe, responsable de la formation des pores, est composé de sept hélices- α amphipatiques. Puisque l'on pense que la formation des pores implique des changements de conformation dans ce domaine, le rôle possible de ses boucles interhélicales lors de cette étape cruciale a été étudié avec une série de doubles mutants de la Cry9Ca lesquels partagent tous la mutation R164A, décrite précédemment, en utilisant une combinaison de modélisation par homologie, de bioessais et de mesures électrophysiologiques. Les mutations introduisaient, renversaient ou neutralisaient une charge électrique portée par un seul résidu de l'une des boucles du Domaine I. La capacité des vingt-huit doubles mutants de la Cry9Ca à dépolariser la membrane apicale d'intestins médians fraîchement isolés de larves de sphinx du tabac a été testée en présence soit de suc intestinal ou d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, sous des conditions qui, d'après une étude antérieure, stimulent grandement la formation de pores par la Cry9Ca et son mutant R164A. À l'exception des mutants F130D, L186D et V189D qui se sont révélés peu toxiques et pratiquement inactif *in vitro*, tous les mutants ont conservé une toxicité et, selon les mesures électrophysiologiques, une capacité à former des pores qui est comparable à celle de la toxine parentale. Ces résultats suggèrent que les conditions environnementales que l'on retrouve dans l'intestin médian des insectes et qui ont été partiellement reproduites dans les expériences *in vitro*, incluant la force ionique élevée, contribuent à minimiser l'influence des charges de surface portées par les résidus des boucles interhélicales du Domaine I sur la capacité de la Cry9Ca et probablement d'autres toxines du bacille de Thuringe à former des pores à travers leur membrane cible.

Abstract

The pore-forming Domain I of *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry toxins is formed of seven amphipathic α -helices. Because pore formation is thought to involve conformational changes within this domain, the possible role of its interhelical loops in this crucial step was investigated with Cry9Ca double mutants, which all share the previously characterized R164A mutation, using a combination of homology modeling, bioassays and electrophysiological measurements. The mutations either introduced, neutralized or reversed an electrical charge carried by a single residue of one of the Domain I loops. The ability of the twenty-eight Cry9Ca double mutants to depolarize the apical membrane of freshly isolated *Manduca sexta* larval midguts was tested in the presence of either midgut juice or a cocktail of protease inhibitors because these conditions had been shown earlier to greatly enhance pore formation by Cry9Ca and its R164A single-site mutant. Most mutants retained a toxicity towards neonate larvae and a pore-forming ability, in the electrophysiological assay, that were comparable to those of their parental toxin. In contrast, mutants F130D, L186D and V189D were very poorly toxic and practically inactive in vitro. On the other hand, mutant E129A depolarized the midgut membrane efficiently despite a considerably reduced toxicity, and mutant Q192E displayed a reduced depolarizing ability while conserving a near wild-type toxicity. These results suggest that the conditions found in the insect midgut and partially reproduced in the in vitro experiments, including high ionic strength, contribute to minimizing the influence of surface charges carried by Domain I interhelical loop residues on the ability of Cry9Ca and probably other *B. thuringiensis* toxins to form pores within their target membrane.

Running title: Mutations in Cry9Ca Domain I Loops

Keywords: Insecticidal toxin; Homology modeling; Pore formation; Membrane potential; Electrostatic interactions; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Introduction

Bacillus thuringiensis produces a variety of pore-forming toxins that accumulate in the form of crystalline parasporal inclusion bodies during sporulation. The most extensively studied of these are insecticidal (Schnepf et al. 1998; de Maagd et al. 2003; Bravo et al. 2007), but others, specifically toxic to other organisms, including in particular nematodes (Wei et al. 2003; Griffiths and Aroian 2005) and cancer cells (Ohba et al. 2009), have also attracted considerable attention in recent years.

Among the insecticidal members of this protein family, eight have so far had their crystal structure solved: Cry1Aa (Grochulski et al. 1995), Cry1Ac (Li et al. 2001), Cry2Aa (Morse et al. 2001), Cry3Aa (Li et al. 1991), Cry3Bb (Galitsky et al. 2001), Cry4Aa (Boonserm et al. 2006), Cry4Ba (Boonserm et al. 2005), and Cry8Ea (Guo et al. 2009). Despite a relatively low degree of homology between their amino acid sequences, these toxins all display a remarkably similar three-domain structure. Whereas Domain I, a bundle of seven amphipathic α -helices, is responsible for membrane insertion and pore formation (Li et al. 1991; Grochulski et al. 1995), Domains II, a region composed of three anti-parallel β -sheets with Greek key topology arranged in a β -prism, and III, two anti-parallel β -sheets forming a β -sandwich with a jelly-roll topology, are involved in receptor binding, prior to pore formation, and toxin specificity (Gómez et al. 2007; Pigott and Ellar 2007). Although the mechanism of pore formation is still the subject of intensive research, it probably involves conformation changes in the toxin molecule. These imply, in particular, rotations about the polypeptide backbone in Domain I interhelical loops. Yet, until recently, these loops have received only limited attention (Lebel et al. 2009; Girard et al. 2009).

Cry9Ca, a toxin which is active against a variety of Lepidopteran insects, is also known to be particularly sensitive to proteolysis (Lambert et al. 1996). Although its main proteolysis site has been removed by site-directed mutagenesis in its R164A mutant (Lambert et al. 1996), recent experiments have suggested that other proteolysis sites may affect its activity, at least during in vitro experiments performed in the presence of its target membrane, the brush border membrane located on the apical side of insect larval midgut epithelial columnar cells (Brunet et al., 2010b). Osmotic swelling experiments

with brush border membrane vesicles have also indicated that the pore-forming ability of Cry9Ca depends strongly on the pH of the solutions in which they are performed (Brunet et al. 2010a). This observation suggests that electrostatic interactions between surface-exposed residues on the toxin and its receptor protein could play a major role in pore formation.

In the present study, the three-dimensional structure of Cry9Ca was modeled by homology and its mode of action was further studied by examining the toxicity and pore-forming properties of a variety of double mutants, all derived from the single-site mutant R164A, in which an electrical charge was either neutralized, introduced or reversed in selected residues located within or very near surface-exposed interhelical loops of Domain I. The *in vitro* conditions used for these experiments were those that had previously been found to optimize the activity of wild-type Cry9Ca and its R164A mutant at physiological pH. With few exceptions, the toxicity and pore-forming ability of most of the mutants was comparable to that of their parental toxin.

Materials and Methods

Homology Model

The three-dimensional structure of Cry9Ca was modeled by homology with the Swiss Model software (<http://swissmodel.expasy.org>) (Peitsch 1995, 1996; Guex and Peitsch 1997), using the known structures of Cry1Aa (PDB file 1CIY), Cry2Aa (PDB file 1I5PA) and Cry3Aa (PDB file 1DLC) as templates. The resulting model was analyzed with Swiss PdbViewer (Version 3.7b2, Glaxo Wellcome Experimental Research).

Site-Directed Mutagenesis

The R164A mutant of Cry9Ca (Lambert et al. 1996) was the parental strain from which all double mutants reported in the present study were derived. Second mutations were introduced by individually altering selected Domain I loop residues by site-directed mutagenesis, using a polymerase chain reaction technique described by Ho et al. (1989). The double mutants are referred to by simply stating the second substitution which makes them unique. All mutants analyzed in the present study and the positions of their mutated residues within the toxin structure are listed in Table VII.I.

Toxin Activation and Purification

All Cry9Ca mutants were prepared from *Escherichia coli* W6K strains producing the appropriate single recombinant toxins as described previously (Lambert et al. 1996). Protoxins were trypsin-activated in vitro and the resulting toxins were purified by fast protein liquid chromatography using a mono-Q ion exchange column (Pharmacia Biotech, Montreal, Qc) as described elsewhere (Masson et al. 1990, 1994).

Bioassays

Fertilized *M. sexta* eggs were purchased from the insectary of the North Carolina State University Department of Entomology (Raleigh, NC). Larvae were reared on an artificial diet obtained from the same source. Toxicity was evaluated with neonate larvae that were fed on artificial diet contaminated with toxin as described earlier (Coux et al. 2001). Activated toxins were applied as 100- μ l samples that were layered onto 1.8-cm² wells and allowed to absorb into the medium. Each mutant was tested on 10 different occasions with 25 larvae for each toxin concentration. Mortality and, for surviving insects, weight gain were recorded after 7 days. Data were adjusted for the mortality of control larvae reared in the absence of toxin. Tests were first carried out with 10 μ g of toxin/ml, corresponding to 555 ng of toxin/cm², a value slightly above our experimental LC₉₀ for Cry9Ca R164A (460 ng/cm²) (Brunet et al. 2010a). When appreciable toxicity was observed at this first concentration, a second series of tests was carried out at 5 μ g of toxin/ml (278 ng/cm²), a value near our Cry9Ca R164A LC₅₀ value (250 ng/cm²) (Brunet et al. 2010a). Alternatively, when the mutants displayed poor toxicity at the first concentration, they were tested at 50 μ g/ml (2.78 μ g/cm²).

Midgut Isolation and Midgut Juice Preparation

For membrane potential measurements, whole midguts were isolated from third-instar larvae as described by Peyronnet et al. (1997) and bathed in the 122K solution consisting of 122 mM KCl, 5 mM CaCl₂ and 5 mM CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)-KOH (pH 10.5). Midgut juice was collected from whole midguts isolated from fifth-instar larvae as described by Fortier et al. (2007) and stored at -80°C in small aliquots.

Membrane Potential Measurements

Short segments of freshly isolated *M. sexta* midguts were aspirated into a glass pipette from one end until the other end curled around the pipette tip, thus exposing the apical surface of the epithelial cells (Peyronnet et al. 1997). The pipette was lowered near the bottom of a perfusion chamber containing the 122K solution and midgut cells were impaled with a glass microelectrode filled with 1 M KCl (Peyronnet et al. 1997). Electrode resistance was between 50 and 250 M Ω . The impalements were considered successful when they caused a sharp and sustained change in the measured potential (negative inside). The bath was perfused continuously with the 122K solution until the membrane potential was stable for 5 min. Perfusion was then stopped and the perfusion solution was replaced by 1.2 ml of the 122K solution containing 5 μ g/ml of the appropriate toxin with either 10% (v/v) midgut juice or 1% (v/v) of a protease inhibitor cocktail (described below). After 5 min, the preparation was rinsed with the 122K solution for an additional 10 min. The experiments were carried out at room temperature. When midgut juice was added, it was first diluted sufficiently in a solution composed of 5 mM CaCl₂ and 5 mM CAPS-KOH (pH 10.5) to reach a potassium concentration of 122 mM (Fortier et al. 2007). The final volume was then adjusted with the 122K solution. The protease inhibitor cocktail contained 50 mM 4-(aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), 1 mg/ml antipain, 0.015 mM aprotinin, 0.1 mM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64) and 0.1 mM leupeptin dissolved in water and used at a final 100-fold dilution. These compounds were all obtained from Sigma Aldrich (Oakville, Ont.).

Results

Overall Structure

The online Swiss Model software (Peitsch, 1995, 1996; Guex and Peitsch, 1997) returned a model of the three-dimensional structure of Cry9Ca a few hours after its sequence was submitted. The model covers the portion of the protein extending from residue 65 (Ser) to residue 658 (Asn). The familiar three-domain structure of Cry toxins is readily recognizable (Fig. VII.1A), with Domain I and its seven α -helices ranging from

residue 65 to residue 292 (except 84 to 87), Domain II in the form of a β -prism made up of three β -sheets ranging from residue 303 to residue 504, and Domain III, a β -sandwich, including residues 84 to 87, 293 to 302 and 505 to 658.

The presence of a short segment between Domains I and II in the linear sequence (residues 293 to 302 which include β 1a), but belonging to Domain III has been described for the corresponding portion of Cry1Aa (Grochulski et al. 1995). However, residues 84 to 87, belonging to the α 1- α 2a loop, are also predicted to form a short β -strand that is strongly connected to β 1a, and thus to form an integral part of the Domain III β -sandwich (Fig. VII.1B). To our knowledge, this is the first time a segment of the α 1- α 2a loop is suggested to constitute part of Domain III since this was not reported for the above-mentioned toxins for which the crystal structure has been elucidated nor for those toxins for which a structure has been proposed on the basis of homology modeling (Alcantara et al. 2001; Gutierrez et al. 2001; Angsuthanasombat et al. 2004; Fernández et al. 2005; Lin et al. 2007; Xia et al. 2008; Yamaguchi et al. 2008; Likitvivatanavong et al. 2009; Zhao et al. 2009).

Although the structure of Cry9Ca appears otherwise very similar to those of the toxins used as templates for the modeling, a few other noticeable differences were identified. In Domain I, the most obvious differences between Cry9Ca and Cry1Aa, Cry2Aa and Cry3Aa are its longer α 2a- α 2b loop and its α 3- α 4 loop that protrudes away from the domain core, making it more accessible than in any of the other three toxins (Fig. VII.2A). In Domain II, the three usual β -sheets are found, but Cry9Ca is predicted to form an unstructured coil in place of the β 9 strand which is present in the other three toxins (Fig. VII.2B). In Domain III, one major difference is found within the β 19- β 20 loop (Fig. VII.2C). Not only is it longer than in the other three toxins, but it is predicted to form a short α -helix which runs close to α 6 of Domain I.

Toxicity

The toxicity of most double mutants (Table VII.I) was comparable to that estimated for the parental strain (R164A) on the basis of dose-response curves that were used to evaluate, by probit analysis, previously reported values of LC_{50} and LC_{90} (Brunet

et al. 2010a). When tested at 10 μg toxin/ml, all mutants except E129A, F130D, L186D and V189D killed at least 80% of the larvae, a level which falls within the 95% confidence interval estimated for the parental strain. When tested at 5 μg toxin/ml, mutants T128D, E129K, N190C, Q192E, Q193E, T224R, D255K, R256D, R258D, T260D, T260R, N261D, N261R, and P295R killed between 36 and 79% of the larvae, within the 95% confidence interval estimated, at this toxin concentration, for the parental strain. Somewhat higher percent mortality values were recorded for the other mutants, E121A, E121K, N124D, N124R, Q126E, F187D, N190R, E263K, and T296R. Among the four mutants with reduced activity, three were practically inactive and displayed 30% mortality (V189D) or less (F130D and L186D) when tested at 50 μg toxin /ml (Table VII.I), a concentration which corresponds to more than 10 times the LC_{50} estimated for the parental toxin (Brunet et al. 2010a).

Except for mutant L186D, those mutants with a reduced ability to kill the larvae nevertheless retained some toxicity as evidenced from weight gain measurements. While control larvae, reared in the absence of toxin, gained 126 ± 10 mg during the time course of the experiments, larvae which survived treatment with 10 μg of mutants E129A, F130D and V189D per ml gained only 8 ± 1 , 81 ± 11 , and 71 ± 8 mg, respectively, during the same period. Surviving larvae exposed to 5 μg of mutant E129A per ml gained 64 ± 8 mg, and those exposed to 50 μg of mutants F130D and V189D gained 17 ± 5 , and 12 ± 2 mg, respectively. In contrast, at this higher dose, the larvae exposed to L186D gained 116 ± 10 mg, a value comparable to that measured in the absence of toxin.

Membrane Potential Assay

Wild-type Cry9Ca and its R164A mutant have recently been studied, under a variety of experimental conditions, using an osmotic swelling assay and membrane potential measurements (Brunet et al. 2010a, b). Both toxins were most effective when tested at pH 10.5, with the electrophysiological assay, in the presence of either 10% (v/v) midgut juice or a cocktail of protease inhibitors. For this reason, and because the midgut content of actively feeding Lepidopteran insect larvae is highly alkaline (Dow, 1984, 1992), these conditions were chosen to evaluate the pore-forming ability of the double mutants described in the present study. In this assay, the electrical potential difference

was monitored across the luminal membrane of the epithelial cells of freshly isolated midguts (Peyronnet et al. 1997). After 5 min during which the midguts were perfused with bathing solution, the tissue was exposed to toxin and either midgut juice (Fig. VII.3) or protease inhibitors (Fig. VII.4) for another 5 min during which perfusion was stopped. During this period, membrane potential decreased somewhat, but, in the absence of toxin, it rapidly rose to a value approaching that measured at the beginning of the experiment, as soon as the perfusion was resumed (Fig. VII.3A, VII.4A). However, membrane potential remained low in the presence of an active toxin such as the R164A mutant (Fig. VII.3A, VII.4A).

In agreement with the toxicity data, most mutants depolarized the midgut epithelial cell membrane efficiently, both in the presence of midgut juice (Fig. VII.3) and protease inhibitors (Fig. VII.4). In addition, the three non-lethal double mutants, F130D (Fig. VII.3H, VII.4H), L186D (Fig. VII.3I, VII.4I), and V189D (Fig. VII.3K, VII.4K) were, at best, very poorly active under both experimental conditions. However, mutant Q192E, which was only marginally less toxic than the parental strain (Table VII.I), was rather poorly active in the electrophysiological experiments under both sets of conditions (Figures VII.3M, VII.4M). Despite its lower toxicity (Table VII.I), mutant E129A (Fig. VII.3G, VII.4G) was only slightly less active than its parental toxin (Fig. VII.3A, VII.4A) and displayed a depolarization rate that was comparable to those measured for mutants E129K (Fig. VII.3G, VII.4G), Q193E (Fig. VII.3N, VII.4N), T260D (Fig. VII.3S, VII.4S), P295R (Fig. VII.3V, VII.4V), and P296R (Fig. VII.3W, VII.4W) under both experimental conditions. On the other hand, mutants R256D (Fig. VII.3Q) and R258D (Fig. VII.3R) were slightly less active than their parental toxin in the presence of midgut juice, but equally active in the presence of protease inhibitors (Fig. VII.4Q, VII.4R). In contrast, mutant N190C was slightly less active than its parental toxin in the presence of protease inhibitors (Fig. VII.4L), but equally active in the presence of midgut juice (Fig. VII.3L).

Discussion

The main objective of the present study was to evaluate the influence of charged residues, within surface-exposed loops of Domain I, on the pore-forming activity of

Cry9Ca. Most mutated residues were located in or very near the $\alpha 2$ - $\alpha 3$, $\alpha 4$ - $\alpha 5$ and $\alpha 6$ - $\alpha 7$ loops because these lie on the same side of the toxin molecule as the Domain II loops (Fig. VII.1A) which are thought to participate directly in the binding of *B. thuringiensis* toxins to their receptors (Gómez et al. 2007; Pigott and Ellar 2007). Moreover, because the pore-forming activity of Cry9Ca was recently found to be particularly sensitive to the environmental pH (Brunet et al. 2010a), electrostatic interactions with its target membrane could be expected to contribute significantly to its mechanism of action.

Most mutations analyzed in the present study, however, had rather little effect on the activity of the toxin as evaluated from bioassays performed with insect larvae (Table VII.I) or from their ability to depolarize the apical membrane of epithelial cells in freshly isolated larval midguts (Fig. VII.3, VII.4). Most Domain I interhelical loop mutants that were studied earlier also retained a good pore-forming ability (Lebel et al. 2009). However, many of these latter mutants, in which selected amino acid residues were replaced individually by a cysteine, had a reduced rate of pore formation at pH 10.5, at which the thiol group of this residue is largely ionized. It should nevertheless be pointed out that these experiments were carried out using an osmotic swelling assay protocol in which the brush border membrane vesicles are only exposed to the toxins in solutions of relatively low ionic strength (up to 75 mM KCl depending on the experiments). In contrast, the experiments described in the present communication were performed in the 122K solution, in which the ionic strength was sufficiently high to greatly attenuate the inhibitory effect of increasing pH to 10.5 on the activity of Cry1Ca (Fortier et al. 2005). As pointed out above, the conditions used in the present study were chosen because of the much poorer activity of Cry9Ca and its single-site mutant R164A in osmotic swelling experiments performed at pH 10.5. Similarly, about half of the mutants described herein were tested in osmotic swelling experiments. Most of them, like their parental toxin R164A (Brunet et al. 2010a), permeabilized the vesicles efficiently at pH 7.5, but displayed at most a very modest activity at pH 10.5 (data not shown). These considerations could therefore suggest, in agreement with our earlier conclusion (Fortier et al. 2005), that the influence of electrostatic interactions between the toxin and membrane surface in the process of pore formation diminishes as the ionic strength of the solutions is increased.

Some of the mutations analyzed in the present study did nevertheless affect greatly the activity of Cry9Ca. In particular, mutant F130D, altered near the N-terminal end of its $\alpha 3$ helix, and mutants L186D and V189D, altered within their $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loops, were almost completely inactive both in vivo and in vitro. The F91S mutation, slightly more conservative than F130D, but introduced at the equivalent location in Cry1Ac, also lead to a reduced toxicity (10-100-fold) (Wu and Aronson 1992). Thus, the presence of phenylalanine, or of another aromatic residue at this position, appears to be important for the function of both toxins. As for mutants L186D and V189D, the side chains of both mutated residues extend towards the $\alpha 3$ helix. The inactivity of these mutants could result from the formation of a salt bridge between the introduced negative charge and the positive charge of one the arginine residues of this latter helix (R132 and R138). The possibility of a salt bridge between R138 and D186 is especially well supported by our three-dimensional model of Cry9Ca which predicts that these two residues may be oriented correctly for such an interaction to occur (Fig. VII.5). Such a link between the $\alpha 3$ helix and the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop could prevent the hairpin formed by helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ to insert into the membrane as predicted, for example, by the umbrella model (Schwartz et al. 1997; Gazit et al. 1998; Gerber and Shai 2000; Aronson and Shai 2001). The formation of a similar salt bridge appears less likely in the case of the V189D mutant, however, since our model predicts that the side chains of R132 and D189 could not face each other unless the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop was rotated relative to helix $\alpha 3$ by approximately 90° (data not shown). In Cry1Aa, mutant V150C, altered at a location which is equivalent to V189 in Cry9Ca, was not active (Lebel et al. 2009). In contrast, however, the toxicity of a Cry1Ac mutant altered at this same position, V150D, was comparable to that of its wild-type toxin (Kumar and Aronson, 1999).

On the other hand, mutant F187D ($\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop) was quite active both in vivo (Table VII.I) and in vitro (Fig. VII.3J, VII.4J) as was the Cry1Ac F148I mutant, altered at the equivalent position (Kumar and Aronson, 1999). While the Cry9Ca mutant N190C, also altered within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop, retained a pore-forming activity that was comparable to that of its parental toxin, the Cry1Aa mutant Q151C, altered at the equivalent position, formed pores more slowly than wild-type Cry1Aa (Lebel et al. 2009). Although toxic to

the larvae (Table VII.I), the Cry9Ca mutant Q192E, altered within the same loop, was rather poorly active in vitro (Fig. VII.3M, VII.4M). Mutants of Cry1Aa and Cry1Ab with substitutions at the equivalent position have also been reported to have a reduced activity. Thus, mutant Y153C from Cry1Aa had a reduced rate of pore formation (Lebel et al. 2009) and mutants Y153A, Y153D and Y153R from Cry1Ab were less toxic than the wild-type toxin and had a reduced ability to inhibit short circuit currents (Chen et al. 1995). Interestingly, while this position is occupied by a glutamine residue (Q192) in Cry9Ca, many other toxins bear a tyrosine residue at the equivalent position. Moreover, on the basis of the functional properties of mutants Y153C from Cry1Aa (Girard et al. 2009) and Cry1Ab (Nuñez-Valdez et al. 2001), Y202A, Y202C and Y202F from Cry4Aa (Pornwiroon et al. 2004) and Y170D, Y170R and Y170L from Cry4Ba (Kanintrunkul et al. 2003), it has been concluded that the presence of an aromatic residue at this location is important, or even necessary, for the functioning of these toxins.

Overall, the results of the present study show a remarkably good agreement, with only a few minor exceptions, between the toxicity of the studied mutants and their ability to depolarize the plasma membrane of midgut epithelial cells in the presence of either midgut juice or a cocktail of protease inhibitors. Because Cry9Ca and its R164A mutant display only a rather modest activity at pH 10.5 in the absence of these additions (Brunet et al. 2010b), this correlation lends further support to our hypothesis that the functional properties of Cry9Ca, and probably other *B. thuringiensis* toxins, are strongly influenced by the combined effects of proteases and protease inhibitors present in larval insect midgut juice (Brunet et al. 2010b).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) and Valorisation-Recherche Québec. J.-F. Brunet received a graduate student scholarship from the FQRNT.

References

- Alcantara EP, Alzate O, Lee MK, Curtiss A, Dean DH (2001) Role of α -helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity. *Biochemistry* 40:2540-2547
- Angsuthanasombat C, Uawithya P, Leetachewa S, Pornwiroon W, Ounjai P, Kerdcharoen T, Katzenmeier G, Panyim S (2004) *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. *J Biochem Mol Biol* 37:304-313
- Aronson AI, Shai Y (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol Lett* 195:1-8
- Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li J (2005) Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol* 348:363-382
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J (2006) Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol* 188:3391-3401
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423-435
- Brunet J-F, Vachon V, Juteau M, Van Rie J, Larouche G, Vincent C, Schwartz J-L, Laprade R (2010a) Pore-forming properties of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry9Ca in *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1798:1111-1118 (Chapitre V de cette these)
- Brunet J-F, Vachon V, Marsolais M, Van Rie J, Schwartz J-L, Laprade R (2010b) Midgut juice components affect pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry9Ca. *J Invertebr Pathol* 104:203-208 (Chapitre VI de cette these)
- Chen XJ, Curtiss A, Alcantara E, Dean DH (1995) Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ab reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J Biol Chem* 270:6412-6419

- Coux F, Vachon V, Rang C, Moozar K, Masson L, Royer M, Bes M, Rivest S, Brousseau R, Schwartz, J-L, Laprade R., Frutos R (2001) Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins of Cry1Aa and Cry1Ac. *J Biol Chem* 276:35546-35551
- de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37:409-433
- Dow JAT (1984) Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am J Physiol* 246:R633-R635
- Dow JAT (1992) pH gradients in lepidopteran midgut. *J Exp Biol* 172:355-375
- Fernández LE, Pérez C, Segovia L, Rodríguez MH, Gill SS, Bravo A, Soberón M (2005) Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop α -8 of domain II. *FEBS Lett* 579:3508-3514
- Fortier M, Vachon V, Frutos R, Schwartz J-L, Laprade R (2007) Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl Environ Microbiol* 73:6208-6213
- Fortier M, Vachon V, Kirouac M, Schwartz J-L, Laprade R (2005) Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *J Membr Biol* 208:77-87
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L (2001) Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst D* 57:1101-1109
- Gazit E, La Rocca P, Sansom MSP, Shai Y (1998) The structure and organization within the membrane of the 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

- Gerber D, Shai Y (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
- Girard F, Vachon V, Lebel G, Préfontaine G, Schwartz J-L, Masson L, Laprade R (2009) Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim Biophys Acta* 1788:575-580
- Gómez I, Pardo-López L, Muños-Garay C, Fernandez LE, Pérez C, Sánchez J, Soberón M, Bravo A (2007) Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28:169-173
- Griffitts JS, Aroian RV (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* 27:614-624
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Puzsai-Carey M, Schwartz J-L, Brousseau R, Cygler M (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol* 254:447-464
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18:2714-2723
- Guo S, Ye S, Liu Y, Wei L, Xue J, Wu H, Song F, Zhang J, Wu X, Huang D, Rao Z (2009) Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: an insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J Struct Biol* DOI:10.1016/j.jsb.2009.07.004.
- Gutierrez P, Alzate O, Orduz S (2001) A theoretical model of the tridimensional structure of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* Cry11Bb toxin deduced by homology modelling. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:357-364
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease RL (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59

- Kanintronkul Y, Sramala I, Katzenmeir G, Panyim S, Angsuthanasombat C (2003) Specific mutations within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin reveal a crucial role for Asn-166 and Tyr-170. *Mol Biotech* 24:11-19
- Kumar ASM, Aronson AI (1999) Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J Bacteriol* 181:6103-6107
- Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, Seurinck J, Van Audenhove K, Van Rie J, Van Vliet A, Peferoen M. (1996) A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl Environ Microbiol* 62:80-86
- Lebel G, Vachon V, Préfontaine G, Girard F, Masson L, Juteau M, Bah A, Larouche G, Vincent C, Laprade R, Schwartz J-L (2009) Mutations in domain I interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in insect midgut brush border membrane vesicles. *Appl Environ Microbiol* 75:3842-3850
- Li J, Carroll J, Ellar DJ (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821
- Li J, Derbyshire DJ, Promdonkoy B, Ellar, DJ (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
- Likitvivatanavong S, Aimanova KG, Gill SS (2009) Loop residues of the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin are important for mosquitocidal activity. *FEBS Lett* 583:2021-2030
- Lin Y, Fang G, Cai F (2008) The insecticidal crystal protein Cry2Ab10 from *Bacillus thuringiensis*: cloning, expression, and structure simulation. *Biotechnol Lett* 30:513-519
- Masson L, Mazza A, Gringorten L, Baines D, Aneliunas V, Brousseau R. (1994) Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol Microbiol* 14:851-860

- Masson L, Préfontaine G, Péloquin L, Lau PCK, Brousseau R (1990) Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem J* 269:507-512
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected binding epitope. *Structure* 9:409-417
- Nuñez-Valdez M-E, Sánchez J, Lina L, Güereca L, Bravo A (2001) Structural and functional studies of α -helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1546:122-131
- Ohba M, Mizuki E, Uemori A (2009) Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res* 29:427-434
- Peitsch MC (1995) Protein modeling by e-mail. *Bio/Technology* 13:658-660
- Peitsch MC (1996) ProMod and Swiss-Model: internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* 24:274-279
- Peyronnet O, Vachon V, Brousseau R, Baines D, Schwartz J-L, Laprade R (1997) Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl Environ Microbiol* 63:1679-1684
- Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:255-281
- Pornwiroon W, Katzenmeier G, Panyim S, Angsuthanasombat C (2004) Aromaticity of Tyr-202 in the α 4- α 5 loop is essential for toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin. *J Biochem Mol Biol* 37:292-297
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775-806
- Schwartz J-L, Juteau M, Grochulski P, Cygler M, Préfontaine G, Brousseau R, Masson L (1997) Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett* 410:397-402

- Wei J-Z, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang S-C, Aroian RV (2003) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proc Natl Acad Sci USA 100:2760-2765
- Wu D, Aronson AI (1992) Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. J Biol Chem 267:2311-2317
- Xia L-Q, Zhao X-M, Ding X-Z, Wang F-X, Sun Y-J (2008) The theoretical 3D structure of *Bacillus thuringiensis* Cry5Ba. J Mol Model 14:843-848
- Yamaguchi T, Sahara K, Bando H, Asano S (2008) Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles. J Invertebr Pathol 99:257-262
- Zhao X-M, Xia L-Q, Ding X-Z, Wang F-X (2009) The theoretical three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* Cry5Aa and its biological implications. Protein J 28:104-110

Table VII.IToxicity of Cry9Ca mutants to *M. sexta* neonate larvae

Mutation	Mutation site	% Mortality ^a at:		
		5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
R164A ^b (parental strain)	α3-α4 loop	58 (28-79) ^c	95 (77-99) ^c	– ^d
E121A	α2b helix	97 ± 2	100 ± 0	–
E121K	α2b helix	95 ± 2	100 ± 0	–
N124D	α2-α3 loop	90 ± 2	99.4 ± 0.6	–
N124R	α2-α3 loop	92 ± 3	99 ± 1	–
Q125E	α2-α3 loop	79 ± 8	99.5 ± 0.5	–
Q126E	α2-α3 loop	90 ± 4	100 ± 0	–
T128D	α2-α3 loop	66 ± 6	92 ± 7	–
E129A	α3 helix	8 ± 2	46 ± 9	–
E129K	α3 helix	49 ± 5	88 ± 5	–
F130D	α3 helix	–	0 ± 3	18 ± 4
L186D	α4-α5 loop	–	2 ± 2	3 ± 2
F187D	α4-α5 loop	96 ± 2	100 ± 0	–
V189D	α4-α5 loop	–	5 ± 3	30 ± 7
N190C	α4-α5 loop	52 ± 10	97 ± 1	–
N190R	α4-α5 loop	97 ± 1	100 ± 0	–
Q192E	α4-α5 loop	36 ± 4	85 ± 3	–
Q193E	α5 helix	66 ± 8	90 ± 3	–
T224R	α5-α6 loop	70 ± 5	98.4 ± 0.8	–
D255K	α6 helix	77 ± 5	97 ± 2	–
R256D	α6 helix	51 ± 6	93 ± 2	–
R258D	α6-α7 loop	64 ± 7	98 ± 1	–
T260D	α6-α7 loop	54 ± 7	99.0 ± 0.7	–
T260R	α6-α7 loop	62 ± 7	97 ± 2	–
N261D	α6-α7 loop	63 ± 10	100 ± 0	–
N261R	α6-α7 loop	46 ± 10	97 ± 1	–
E263K	α7 helix	86 ± 4	99.2 ± 0.5	–
P295R	α7-β1 loop	62 ± 8	96 ± 3	–
T296R	β1 strand	81 ± 5	97 ± 1	–

^a Except for R164A, values are means ± standard errors of the means (SEM) of 10 independent experiments

^b This substitution is present in all mutants in addition to the indicated second mutation

^c Data for the single-site mutant R164A were evaluated from the dose-response curves used to estimate the LC₅₀ and LC₉₀ values reported by Brunet et al. (2010a). 95% confidence intervals are shown in parentheses

^d –, not tested

Figure legends

Fig. VII.1 **Homology model of Cry9Ca.** (A) This tentative three-dimensional structure of Cry9Ca was established by homology modeling using the SwissModel programs on the basis of the published structures of Cry1Aa, Cry2Aa and Cry3Aa. (B) The model predicts the existence in Cry9Ca of a novel structural pattern in which a small β -strand, located within the α 1- α 2 loop, contributes to the β -sheet structure of Domain III formed by the β 13, β 14, β 15, β 17, β 20, β 21, β 23 strands in addition to the β 1a strand which located between Domains I and II in the linear sequence of the toxin and interacts directly with the β 13 strand.

Fig. VII.2 **Main features of the Cry9Ca model.** (A) Domain I displayed after a 90° counter-clockwise rotation with respect to the orientation shown in Fig. VII.1A to emphasize its unusually long α 2a- α 2b loop and its α 3- α 4 loop which is predicted by the model to protrude away from the core of the protein. (B) Domain II shown in the same orientation as in Fig. VII.1A. The most remarkable prediction of the model, in this region of the toxin, is the absence of the β 9 strand which is found in the structure of the three toxins used as templates. (C) Structure of Domain III, also reproduced in the same orientation as in Fig. VII.1A, in which a novel α -helix (α 9) is predicted to lie within the β 19- β 20 loop of Cry9Ca.

Fig. VII.3 **Effect of Domain I interhelical loop mutants on the membrane potential of midgut epithelial cells from *M. sexta* in the presence of midgut juice.** Freshly isolated midguts from 3rd instar larvae were perfused for 5 min with the 122K solution. The perfusion was stopped and 1.2 ml of perfusion solution containing 5 μ g/ml of the indicated mutant and 10% midgut juice was added directly to the bath. After 5 minutes, the midguts were rinsed with the 122K solution by resuming the perfusion. V is the membrane potential measured at the indicated times and V_0 is the membrane potential measured immediately preceding the addition of toxin. For these experiments, V_0 was (-57.2 \pm 1.8) mV. Values are means \pm SEM (standard error about the mean) for the number of experiments indicated between parentheses.

Fig. VII.4 Effect of Domain I interhelical loop mutants on the membrane potential of midgut epithelial cells from *M. sexta* in the presence of protease inhibitors. Experiments were carried out as described in the legend of Fig. VII.3 except that midgut juice was replaced by a cocktail of protease inhibitors. The composition of this cocktail is given under Materials and Methods. For these experiments, V_0 was (-48.8 ± 1.7) mV.

Fig. VII.5 Possible salt bridge within Domain I of the L186D mutant. The orientation of R138 and D186 could allow the formation of a salt bridge which could prevent a conformational change in which helices α_3 and α_4 move away from each other, thus contributing to the inactivity of L186D. Only segments of α_3 , extending from residues 129 to 146, α_4 , from residues 176 to 185, and the α_4 - α_5 loop, from residues 186 to 191, are displayed.

Figure VII.1

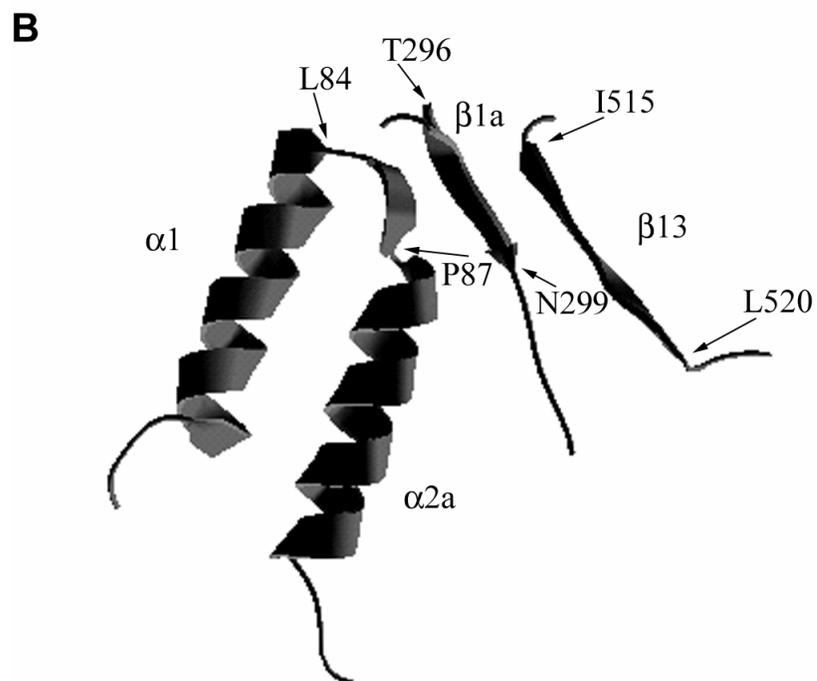
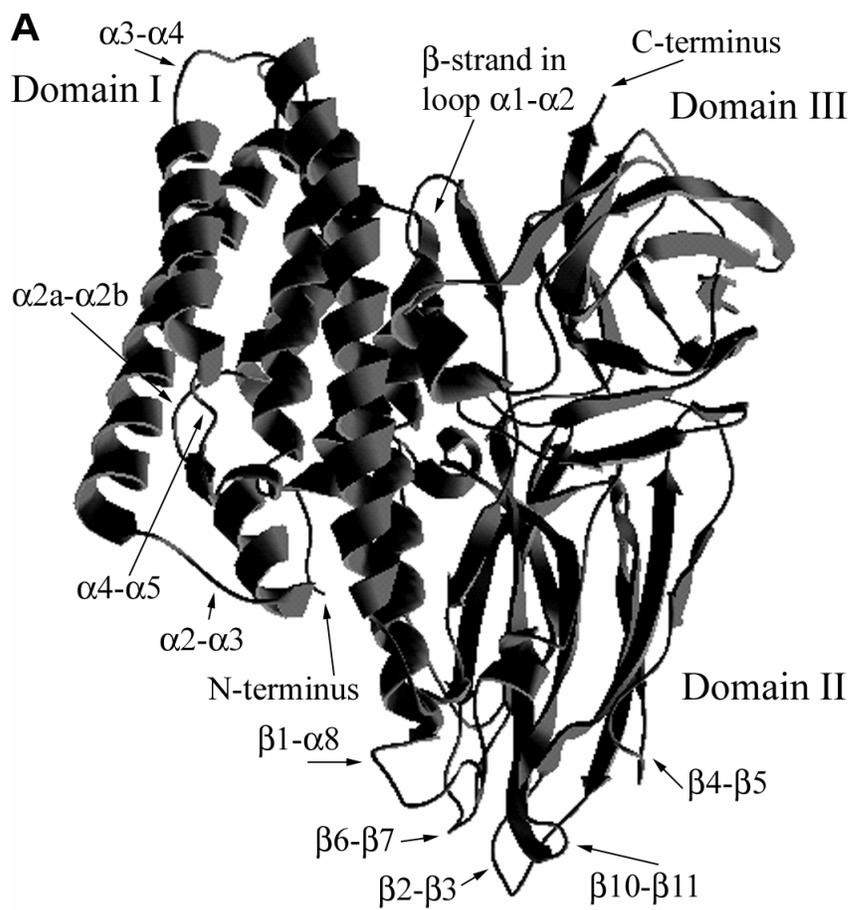


Figure VII.2

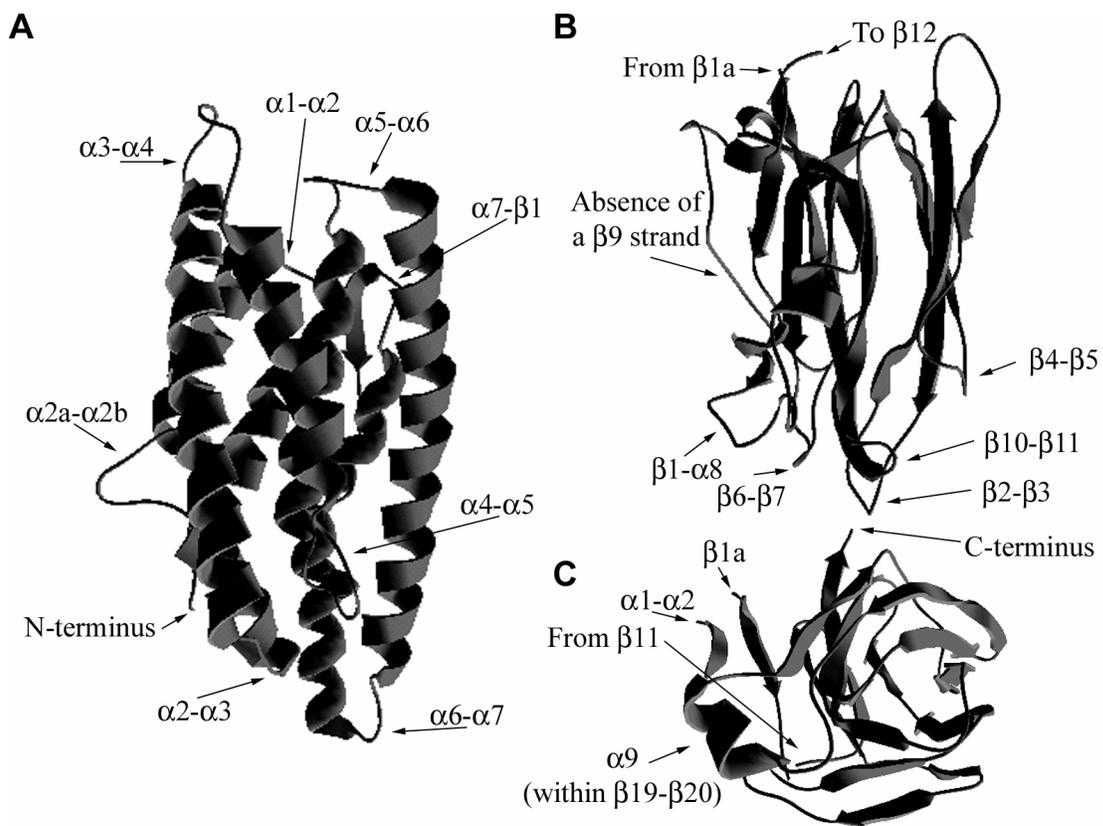


Figure VII.3

Figure 3

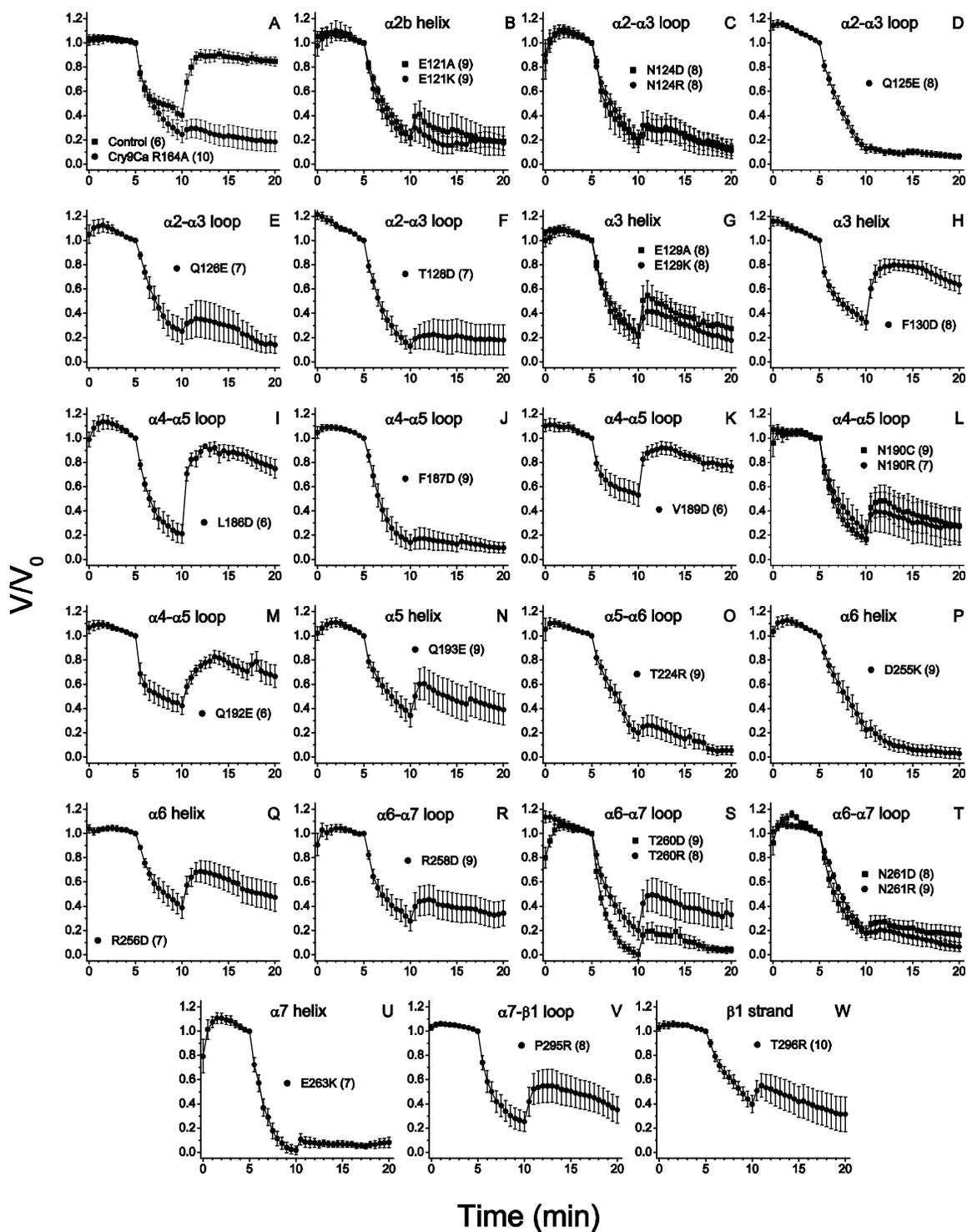


Figure VII.4

Figure 4

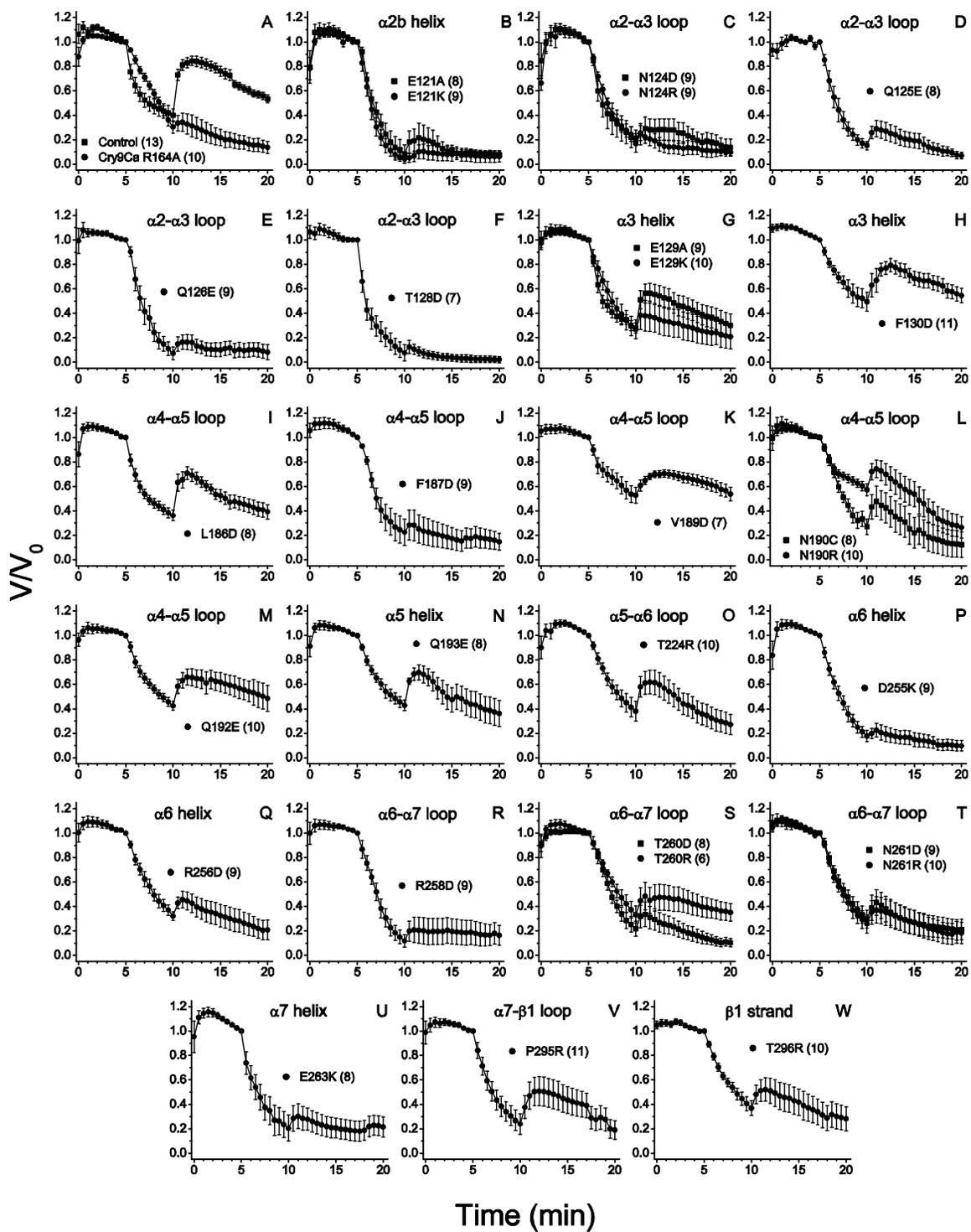
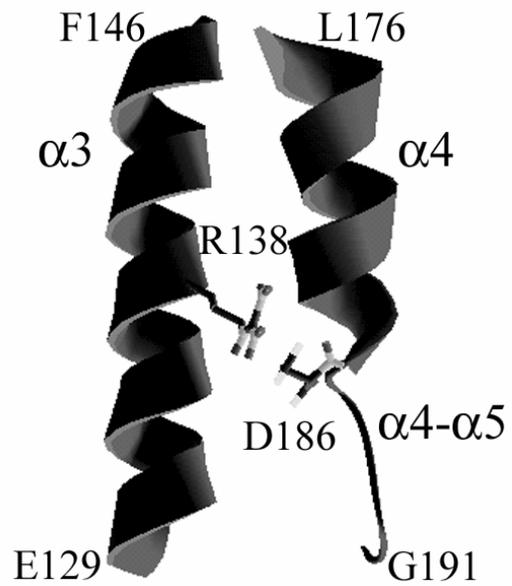


Figure VII.5



Chapitre VIII

Discussion générale

La Cry9Ca, une protéine insecticide de la famille des δ -endotoxines du bacille de Thuringe (Section I.1), a une gamme de toxicité relativement étendue parmi les lépidoptères et se fixe à un ou plusieurs récepteurs membranaires différant de ceux qui sont utilisés par les toxines les mieux caractérisées et les plus utilisées de cette famille d'insecticides (Sections I.1.4 et I.3.2). De telles propriétés font que la Cry9Ca est un choix très prometteur pour remplacer les toxines Cry contre lesquelles les insectes pourraient développer une résistance. Les travaux présentés dans cette thèse ont donc été entrepris dans le but de mieux comprendre le mode d'action de cette toxine, un sujet qui, auparavant, n'avait été que très peu abordé (Lambert *et al.*, 1996).

La structure tridimensionnelle de la Cry9Ca n'a pas encore été élucidée expérimentalement. Cependant, la structure cristalline connue de huit toxines Cry dites à trois domaines démontre qu'il existe, malgré une identité de séquence primaire relativement faible, une très grande similarité dans leurs repliements tridimensionnels. Un modèle de la structure de la toxine Cry9Ca a donc été développé par homologie, sur la base de la structure cristalline des toxines Cry1Aa, Cry2Aa et Cry3Aa (Chapitre IV). La structure ainsi obtenue s'est révélée remarquablement similaire à celle des toxines de référence, avec quelques différences intéressantes dont l'absence d'un brin β_9 , ou encore la présence d'un brin- β dans la boucle α_1 - α_2 , reliant celle-ci au Domaine III, d'une boucle α_{2a} - α_{2b} plus longue, et d'une hélice- α dans le Domaine III. Cette structure théorique, analysée conjointement avec les données fonctionnelles présentées par ailleurs dans cette thèse, a permis l'élaboration de la première étude détaillée des relations structure-fonction de la Cry9Ca et de contribuer ainsi à l'élucidation de son mode d'action.

Les expériences ont été réalisées avec des larves du sphinx du tabac, *M. sexta*, et avec des intestins entiers et des vésicules de membrane en bordure en brosse provenant de ces larves. Cet insecte, en raison de la taille de ses larves et de leur physiologie

intestinale particulièrement bien étudiée (Section I.2), se prête bien aux études biophysiques. D'ailleurs, il a déjà servi abondamment dans l'étude du mode d'action de toxines Cry actives contre les lépidoptères, notamment dans notre laboratoire (Section I.3). De plus, la toxicité de la Cry9Ca envers *M. sexta* avait déjà été démontrée dans les premiers travaux consacrés à cette toxine (Lambert *et al.*, 1996).

Nos travaux avaient pour but de mieux comprendre le mode d'action de la Cry9Ca, et plus particulièrement l'influence du milieu intestinal et des boucles inter-hélicales de son Domaine I (Chapitre II). La Cry9Ca, et ses mutants R164A et R164K, constituent un bon modèle expérimental pour l'étude du rôle de la protéolyse dans l'activité des toxines Cry (Section I.3.1 et Chapitres V et VI). De même, la disponibilité d'un grand nombre de mutants présentant des altérations au cœur des boucles du Domaine I de la Cry9Ca a permis d'approfondir les connaissances sur le rôle, auparavant peu étudié (Section I.3.4), de ces segments sur l'activité des protéines Cry (Chapitre VII). De plus, le fait que la plupart de ces mutations modifient la charge électrique d'un résidu de boucle a permis d'évaluer l'importance des interactions électrostatiques sur le mode de fonctionnement de ces toxines (Chapitre VII).

La toxicité de la Cry9Ca envers *M. sexta* n'ayant auparavant été évaluée que pour le type sauvage de cette toxine (Lambert *et al.*, 1996), nous avons entrepris une étude détaillée de la toxicité de chacune des toxines utilisées dans le présent travail. Les nouveaux résultats obtenus pour la toxine non mutée, les mutants R164A et R164K, de même que pour le fragment de 55 kDa résultant de la protéolyse au niveau du résidu R164, n'ont pas présenté de différences significatives d'un point de vue statistique (Chapitre V). Non seulement le fait d'empêcher la protéolyse en remplaçant l'arginine 164 par une alanine n'augmente-t-elle pas la toxicité de la protéine envers *M. sexta*, mais celui de la maximiser par une exposition prolongée à la trypsine ne la réduit pas non plus. Pourtant, cette protéolyse rend la Cry9Ca complètement inactive chez *Spodoptera exigua* (Lambert *et al.*, 1996). Outre le fait qu'il s'agit de deux espèces distinctes d'insectes, cette différence demeure mal comprise. D'autre part, si quelques mutants doubles se sont révélés légèrement plus (ou moins) toxiques que la souche sauvage, seulement trois d'entre eux se distinguent par une diminution radicale de toxicité (Chapitre VII). Cette

perte d'activité n'est cependant pas attribuable à l'introduction d'un site de protéolyse dans la structure de la protéine lors de la mutagenèse.

La question de l'importance de la protéolyse dans le mode d'action de la Cry9Ca a aussi été étudiée avec une technique électrophysiologique (Section III.3.2) qui s'est révélée particulièrement utile pour mettre en lumière les effets du micro-environnement sur l'activité de plusieurs toxines Cry (Fortier *et al.*, 2005, 2007a) (Chapitre VI). L'ajout de suc intestinal de *M. sexta* ou d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases stimule considérablement l'activité de la toxine contre un segment d'intestin de cet insecte. L'effet du suc intestinal ne semble pas pouvoir s'expliquer simplement par l'action des protéases, ou d'une autre activité enzymatique, puisque la capacité de la Cry9Ca à dépolariser la membrane intestinale demeure aussi forte en présence de suc préalablement chauffé. Par contre, l'augmentation de l'efficacité des toxines en présence du cocktail d'inhibiteurs démontre que les protéases liées à la membrane plasmique des cellules intestinales ont un effet délétère. L'effet stimulant du suc intestinal s'explique quant à lui plus facilement par son contenu lipidique, puisque l'activité de la toxine demeure aussi forte lorsque celui-ci est remplacé par un extrait de ses lipides totaux. Le suc intestinal contient donc probablement un composé ayant les propriétés d'un inhibiteur de protéases en plus d'être à la fois thermo-résistant et hydrophobe. Selon cette hypothèse, l'efficacité de la Cry9Ca, et vraisemblablement d'autres toxines Cry, dont la Cry1Ab (Fortier *et al.*, 2007a), dépend, dans l'intestin des insectes cibles, de l'importance relative de l'activité des protéases et de leurs inhibiteurs.

Même si la stimulation de la formation des pores par le suc intestinal ne s'explique pas par son contenu en protéases, celles-ci n'en jouent pas moins un rôle essentiel dans l'activation de la protoxine (Section I.3.1). L'effet stimulateur des inhibiteurs de protéases contenus dans ce même suc et dont l'existence est ici suggérée serait quant à lui dû à leur action contre des protéases qui dégradent la toxine au-delà de sa forme active, et ce probablement à une étape ultérieure du mode d'action, après un changement de conformation, consécutif à la fixation de la toxine, qui exposerait de nouveaux sites de protéolyse jusqu'alors inaccessibles. En effet, si nos expériences n'ont pu démontrer un tel effet protecteur pour la toxine qu'en présence des protéines membranaires d'un tissu intestinal fraîchement isolé, les protéases du suc intestinal devraient aussi être sensibles

aux inhibiteurs présents dans le milieu. Or, la toxicité s'étant révélée similaire quelque soit la forme de la toxine à laquelle les insectes ont été exposés (Chapitre V), l'activité protéolytique responsable de l'activation est tout à fait suffisante pour assurer cette étape essentielle du mode d'action. Il existe néanmoins une caractéristique du contenu luminal de l'intestin moyen des lépidoptères (Dow, 1984, 1986) qui s'est clairement révélée défavorable à l'action de la toxine Cry9Ca, le pH élevé (Chapitre V). Toutefois, la force ionique élevée qui caractérise aussi le suc intestinal (Fortier *et al.*, 2007a) a plutôt pour effet de masquer l'effet des charges présentes à la surface de la toxine, notamment au niveau des boucles inter-hélicales du Domaine I, et donc de minimiser les interactions électrostatiques potentiellement délétères, y compris celles dues au pH alcalin, entre la toxine et la membrane (Chapitre VII). Dans son ensemble la Cry9Ca est donc remarquablement bien adaptée au micro-environnement constitué par le suc intestinal de l'insecte.

Si l'effet de la présence d'acides aminés chargés dans les boucles du Domaine I semble atténué par une force ionique élevée, notre étude a tout de même révélé l'importance de certains résidus à proximité ou au sein de ces boucles (Chapitre VII). Ainsi, la substitution d'une phénylalanine en position 130 par un acide aspartique a grandement diminué l'activité tant *in vivo* qu'*in vitro* de la toxine. Le fait qu'un résultat similaire, obtenu avec la substitution d'une phénylalanine par une sérine en position équivalente, ait déjà été observé pour la toxine Cry1Ac (Wu et Aronson, 1992), et que d'autres toxines Cry, telles la Cry1Aa et la Cry3Aa ont elles aussi un résidu aromatique en position équivalente, peut suggérer que la présence d'un tel résidu à l'extrémité N-terminale de l'hélice α_3 joue un rôle important dans le mode d'action des toxines Cry. Comme le fragment de 55 kDa, duquel les hélices α_1 à α_3 sont absentes, est aussi actif que la forme complète de la toxine, ce rôle doit être local, au moins pour la Cry9Ca, et peut-être lié au redéploiement de l'hélice α_3 lors d'un changement de conformation. De tous les doubles mutants étudiés dans le cadre de ce travail, c'est celui dans lequel la leucine en position 186 a été substituée par un acide aspartique qui a présenté la baisse de toxicité la plus marquée. Dans la même boucle, la substitution de V189 par un acide aspartique a aussi entraîné une baisse très importante de l'activité *in vitro* et de la mortalité. Ces deux résidus font partie de la boucle α_4 - α_5 du Domaine I et, selon notre

modèle tridimensionnel, seraient tous deux orientés vers l'hélice $\alpha 3$. Entre eux, se situent deux résidus, F187 et A188, qui sont eux aussi non polaires. Selon le modèle en parapluie de l'insertion des toxines Cry (Section I.3.4), c'est cette boucle qui s'insère d'abord dans la membrane plasmique des cellules en colonne de l'insecte, après un changement de conformation comprenant le déplacement des hélices $\alpha 1$ à $\alpha 3$. Les résidus non polaires, couvrant toute la première moitié de la boucle, favorisent donc certainement son passage à travers la membrane, et l'introduction d'un résidu chargé à cet endroit interfère avec ce processus. La toxicité élevée observée pour le double mutant F187D, lui aussi chargé dans cette région, ne contredit pas nécessairement cette hypothèse puisque le modèle tridimensionnel prédit, du moins pour le résidu phénylalanine original, une orientation vers l'intérieur du motif en épingle à cheveux formé par les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$. L'Aspartate 187 est donc probablement au moins partiellement protégé du milieu hydrophobe de la membrane pendant l'étape de l'insertion. Enfin, cette structure tridimensionnelle propose aussi une seconde explication à l'inactivité du double mutant L186D : la charge négative ainsi introduite pourrait former un pont salin avec la charge positive d'un résidu arginine (R138) situé juste à côté, dans l'hélice $\alpha 3$ (Chapitre VII). Avec d'importants changements de conformation, la formation d'un tel pont pourrait aussi se produire entre le résidu en position 189 et une arginine de cette même hélice (R132 ou R138).

La formation du fragment de 55 kDa par protéolyse au niveau de l'Arginine 164 a entraîné des effets inattendus sur l'activité de la toxine. Si ce fragment se comporte essentiellement comme la toxine non tronquée et ses mutants R164A et R164K lorsque mis en présence de vésicules de membrane en bordure en brosse à pH 7,5, il conserve seul une activité substantielle à pH 10,5 (Chapitre V). De plus, le fragment de 55 kDa dépolarise la membrane plasmique des cellules de l'intestin isolé plus rapidement que ces trois autres formes de la toxine, à pH 10,5, et sans que l'ajout de suc intestinal ou d'inhibiteurs de protéases ne soit nécessaire (Chapitre VI). À pH 7,5, les pores formés par le fragment de 55 kDa ressemblent à ceux qui sont formés par la Cry9Ca et ses deux mutants. Ceux-ci sont moins sélectifs que les pores formés par la Cry1Ac (Chapitre V) et plusieurs autres toxines Cry (Kirouac *et al.*, 2002). Par contre, à pH 10,5, les pores formés par le fragment de 55 kDa ressemblent beaucoup plus à ceux de la Cry1Ac

(Chapitre V). Une telle variation des propriétés physiques des pores en fonction du pH n'a pas été observée auparavant pour d'autres toxines Cry. Dans le cas des autres toxines sensibles au pH, comme la Cry1Ca (Tran *et al.*, 2001) et la Cry9Ca intacte (Chapitre V), l'effet de ce facteur se fait surtout sentir au niveau du nombre de pores formés plutôt qu'à celui de leurs propriétés. La variation des propriétés physiques des pores formés par le fragment de 55 kDa de la Cry9Ca en fonction du pH pourrait s'expliquer par un changement conformationnel de la protéine favorisé par l'absence des hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Or, la structure développée par homologie pour la Cry9Ca prédit la présence, au sein de la boucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$, d'un court brin- β fortement lié au Domaine III par des ponts hydrogène (Section IV.1.1). Cette liaison entre les Domaines I et III ne pouvant exister dans la toxine tronquée, celle-ci pourrait être plus flexible que la forme complète de la toxine.

Les principales étapes de l'insertion de la Cry9Ca pourraient donc se résumer comme suit. Une fois ingérée par un insecte sensible, la protéine est activée par une première protéolyse et se fixe à son récepteur. Elle s'insère alors dans la membrane plasmique des cellules en colonne, aidée en cela par un micro-environnement dans lequel la force ionique est élevée (Chapitre VII) et peut-être aussi par l'existence d'un potentiel électrique transmembranaire (Chapitre VI). Tout semble ensuite dépendre de l'état de la toxine. Si la toxine, a déjà été tronquée en position 164, elle forme un pore dont les propriétés changent avec le pH (Chapitre V). Si la toxine est complète, c'est-à-dire qu'elle possède l'intégralité de ses trois domaines tels que décrits par notre modèle par homologie (Chapitre IV), c'est surtout le nombre de pores formés qui change en fonction du pH (Chapitre V), peut-être parce que les changements de conformation y sont plus limités que dans la forme tronquée. Possiblement en raison d'une flexibilité moindre, et du fait qu'elle s'insère moins rapidement dans la membrane, une telle toxine semble beaucoup plus sensible à l'action délétère des protéases, notamment celles de la membrane, que sa forme tronquée (Chapitre VI). La présence d'un inhibiteur de protéases, fortement hydrophobe et thermorésistant, dans le micro-environnement de l'intestin limite toutefois son inactivation (Chapitre V). La formation des pores entraîne finalement l'insecte vers la mort.

Chapitre IX

Perspectives

Le travail résumé dans cette thèse contribue de nouvelles connaissances sur le mode d'action d'une toxine du bacille de Thuringe, la Cry9Ca. La discussion précédente propose par ailleurs de nouvelles hypothèses et laisse envisager plusieurs avenues pour poursuivre la recherche. Par rapport à la structure tridimensionnelle, par exemple, on pourrait souhaiter la résolution d'une véritable structure cristalline de la Cry9Ca, laquelle permettrait, entre autres, de confirmer ou d'infirmer l'ensemble du modèle par homologie développé ici, mais surtout d'obtenir une compréhension encore plus fine de la relation entre la structure et la fonction de la protéine et d'envisager de toutes nouvelles avenues de recherche. On note d'ailleurs une certaine accélération dans la fréquence de publication de nouvelles structures cristallographiques de toxines Cry (Section I.1.2), ce qui laisse penser que l'obtention des cristaux, habituellement l'étape limitante dans le processus nécessaire à l'élucidation de ces structures, devient peu à peu plus accessible. Si un intérêt économique, très réduit depuis la controverse causée par le maïs transgénique StarlinkTM (Section I.1.4), se développait à nouveau autour de la Cry9Ca, l'obtention des fonds nécessaires à l'acquisition de sa structure cristallographique serait aussi plus aisée. Par contre, même en absence d'une telle structure, le degré de validité de notre modèle ainsi que l'efficacité du procédé de modélisation par homologie pour les toxines Cry à trois domaines pourraient être testés simplement grâce aux structures publiées récemment. On pourrait par exemple modéliser l'une d'elles à l'aide des trois structures de référence utilisées ici pour la Cry9Ca, puis comparer le résultat avec la structure obtenue par cristallographie.

Nos résultats ont mis en évidence plusieurs différences intéressantes entre la toxine Cry9Ca complète et son fragment de 55 kDa quant à leur dépendance aux facteurs physico-chimiques. Nos expériences ayant sondé le processus de formation des pores dans son ensemble, et non l'une de ses étapes en particulier, il n'est pas possible de préciser dans quelle mesure ces différences s'exercent au niveau de la fixation, de l'oligomérisation ou de l'insertion de la toxine. Une conformation différente de la toxine,

comme il est suggéré dans la discussion, pourrait, entre autres, avoir un impact sur la fixation de la toxine à son récepteur. L'affinité du fragment de 55 kDa pour celui-ci pourrait, par exemple, différer de celle de la Cry9Ca non tronquée. Une telle hypothèse pourrait être vérifiée par des tests de fixation de Cry9Ca tronquée ou non, marquée à l'iode 125, en suivant les protocoles d'abord établis par Hofmann *et al.* (1988, 1989) et Van Rie *et al.* (1989, 1990) et couramment utilisés par la suite (Gómez *et al.*, 2007; Pigott et Ellar, 2007). Afin de s'assurer de la spécificité de la fixation, les toxines marquées sont mises en présence de membrane en bordure en brosse et d'une quantité variable de toxines non marquées. Des tests supplémentaires où les deux formes de la toxine seraient mises en compétition complèteraient naturellement cette exploration. Les tests de compétition devraient aussi être étendus pour inclure nos doubles mutants faiblement actifs (F130D, L186D et V189D). Il serait alors possible d'établir si leur activité réduite est due à la perte de leur capacité à se fixer correctement au récepteur. De tels tests de fixation sont généralement effectués dans des conditions standard (pH 7,4 et 150 mM NaCl) passablement éloignées de celles du micro-environnement intestinal d'un insecte qui se nourrit activement (Section I.2). Il serait particulièrement intéressant de faire varier le pH et la force ionique dans ces tests. Une telle exploration a déjà été tentée, il y a longtemps déjà (Van Rie *et al.*, 1989), mais avec la Cry1Ab, une toxine très similaire à la Cry1Aa et à la Cry1Ac, qui, contrairement à la Cry9Ca, se sont depuis révélées peu sensibles à ces facteurs (Tran *et al.*, 2001; Coux *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2005). De plus, à plus long terme, un tout autre projet relié à la fixation de la toxine Cry9Ca serait d'identifier et de purifier ses récepteurs.

S'il ne fait aucun doute que les toxines Cry à trois domaines forment des pores, certains chercheurs ont proposé que cette étape était inutile et que la fixation au récepteur était en soi suffisante pour entraîner la mort cellulaire, comme il est mentionné dans l'introduction de cette thèse (Section I.3.2). Les résultats de l'étude sur l'affinité de la toxine proposée ci-dessus pourraient toutefois démontrer que la fixation de la toxine n'est pas suffisante pour tuer la cellule. En effet, si la perte d'activité de l'un ou l'autre de nos doubles mutants ne se révélait pas reliée à une difficulté pour la toxine de se fixer à son récepteur, on aurait un exemple de toxines capables de se fixer à leur récepteur sans être

actives. De tels mutants ont d'ailleurs déjà été identifiés pour la toxine Cry1Aa (Girard *et al.*, 2009b).

Une différence majeure entre les expériences de gonflement osmotique (Section III.3.1) et celles d'électrophysiologie (Section III.3.2) est la présence, au début de ces dernières, d'un potentiel électrique transmembranaire. Un tel potentiel pourrait stimuler la formation des pores par la toxine et atténuer l'inhibition de cette activité observée à pH 10,5 (Chapitre VI). Toutefois, mettre directement en évidence un tel effet du potentiel sur la formation des pores dans la membrane cellulaire ne peut pas se faire aisément avec les techniques biophysiques utilisées dans nos travaux. Dans les expériences de gonflement osmotique, il est nécessairement absent, alors que dans celles d'électrophysiologie, il est précisément ce que l'on mesure pour évaluer la formation des pores. Il faudrait donc une méthode expérimentale dans laquelle cette formation est mesurée indépendamment de la variable étudiée. Cette méthode doit de plus maintenir constants l'osmolarité et les gradients de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane, tout en faisant varier le potentiel électrique. Ceci pourrait être réalisé avec une technique de bicouches lipidiques planes. Dans cette approche, le potentiel est fixé par le circuit électronique, et la composition du milieu, de part et d'autre de la membrane, peut être variée à volonté. L'efficacité avec laquelle les toxines Cry s'insèrent dans de telles membranes est cependant très faible (Schwartz *et al.*, 1993; Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001), mais peut être augmentée de façon appréciable en utilisant des membranes planes dans lesquelles des fragments de membrane en bordure en brosse sont insérés (Peyronnet *et al.*, 2001). Pour étudier la cinétique de formation des pores en fonction du potentiel électrique imposé, il serait cependant préférable de mesurer des courants macroscopiques plutôt que des courants unitaires, habituellement retrouvés dans la plupart des travaux effectués avec les toxines Cry en utilisant cette approche.

À l'aide de notre technique électrophysiologique, nous avons pu démontrer que le contenu intestinal joue un rôle important dans l'efficacité de la Cry9Ca (Chapitre VI). Comme ce contenu est probablement en partie déterminé par l'alimentation de l'insecte, il serait certainement intéressant de pousser l'analyse plus loin et d'étudier directement l'influence de ce facteur. Il faudrait, pour se faire, élever des insectes sur des milieux

différents, par exemple des feuilles d'arbres d'espèces différentes. Une telle expérience ne peut être réalisée qu'avec un insecte comme la livrée des forêts, *Malacosoma disstria*, qui, contrairement au sphinx du tabac, est capable de s'alimenter avec les feuilles d'une variété de plantes. D'ailleurs, la toxicité d'une préparation commerciale contenant la variété kurstaki HD-1 du bacille de Thuringe envers cet insecte est 100 fois plus importante lorsqu'il est nourri de feuilles d'érable à sucre plutôt que de feuilles de peuplier faux-tremble (Kouassi *et al.*, 2001). Cet insecte et une toxine purifiée de cette souche de la bactérie, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac ou Cry2Aa (Höfte et Whiteley, 1989), offriraient donc un modèle idéal pour l'étude proposée ici. Afin de déterminer si les différences observées découlent de la formation des pores plutôt que de l'activation de la toxine, on pourrait reprendre les bioessais avec deux essences d'arbres, en comparant l'effet de la protoxine et celle de la toxine. Puis, si l'activation n'explique pas les différences observées entre les deux populations d'insectes, on pourrait utiliser à nouveau la technique électrophysiologique, en absence et en présence de suc intestinal prélevé sur des insectes ayant été nourris de la même façon que celui duquel provient le segment d'intestin. Si des différences intéressantes étaient observées entre les insectes soumis à des régimes différents, on pourrait même utiliser des intestins d'insectes nourris d'une essence d'arbres en présence de suc intestinal recueilli d'insectes nourris de l'autre essence. Ces expériences pourraient permettre de départager une influence directe de composants issus de la nourriture et baignant dans le suc d'une action indirecte impliquant des modifications physiologiques des cellules intestinales.

Le rôle des lipides du suc intestinal de sphinx du tabac dans le mode d'action de la Cry9Ca devrait lui aussi être approfondi. L'hypothèse la plus originale émise dans cette thèse est qu'il existerait, dans le suc intestinal, un composé qui, tout en étant à la fois thermo-résistant et hydrophobe, se comporte comme un inhibiteur de protéases. Il serait donc souhaitable de vérifier cette hypothèse en dosant l'activité protéasique dans le suc intestinal et l'effet de l'extrait lipidique sur celle-ci. Pour identifier ce composé, on pourrait utiliser des techniques chromatographiques d'usage courant en lipidologie (Kates, 1972) afin de fractionner l'extrait de lipides totaux du suc intestinal. Lors d'une première étape, on pourrait par exemple séparer les lipides selon leur polarité. Si l'extrait lipidique agissait effectivement comme un inhibiteur de protéases, l'effet de chacune des

fractions sur l'activité enzymatique devrait être dosé à chaque étape de la purification. Autrement, elles devraient être testées à l'aide de notre méthode électrophysiologique afin d'identifier les composés responsables de la stimulation de l'activité de la Cry9Ca. Quoi qu'il en soit, la vérification de cette hypothèse et l'identification d'un tel composé présente un grand intérêt scientifique, et même économique pour la lutte contre les ravageurs, non seulement pour l'étude de la Cry9Ca, mais aussi de toutes les toxines Cry.

Bibliographie

- Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., Katayama, H., Akao, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ohba, M., Kanai, R., et Harata, K.** (2009), Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J. Mol. Biol.* **386**:121-133.
- Akiba, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ekino, K., Shin, T., Ohba, M., Kanai, R., et Haratam K.** (2006), Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to β -pore-forming toxins. *Proteins* **63**:243-248.
- Alcantara, E. P., Aguda, R. M., Curtiss, A., Dean, D. H., et Cohen, M. B.** (2004), *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **55**:169-177.
- Alzate, O., You, T., Claybon, M., Osorio, C., Curtiss, A., et Dean, D. H.** (2006), Effects of disulfide bridges in domain I of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa δ -endotoxin on ion-channel formation in biological membranes. *Biochemistry* **45**:13597-13605.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore, N. et Ellar, D. J.** (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. I. et Shai, Y.** (2001), Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:1-8.
- Audtho, M., Valaitis, A. P., Alzate, O., et Dean, D. H.** (1999), Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -endotoxin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4601-4605.
- Avilla, C., Osuna-Vargas, E., González-Cabrera, J., Ferré, J., et González-Zamora, J. E.** (2005), Toxicity of several δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *J. Invertebr. Pathol.* **90**:51-54.
- Ayra-Pardo, C., Davis, P. et Ellar, D. J.** (2007), The mutation R₄₂₃S in the *Bacillus thuringiensis* hybrid toxin CryAAC slightly increases toxicity for *Mamestra brassicae* L. *J. Invertebr. Pathol.* **95**:41-47.
- Azuma, M., Harvey, W. R. et Wieczorek, H.** (1995), Stoichiometry of K⁺/H⁺ antiport helps to explain extracellular pH 11 in a model epithelium. *FEBS Lett.* **361**:153-156.
- Baum, J. A., Chu, C.-R., Donovan, W. P., Gilmer, A. J., et Rugar, M. J.** (2003), Lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin compositions and methods of use. **US Patent** 6593293.
- Beegle, C. C. et Yamamoto, T.** (1992), History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* **124**:587-616.

- Ben-Dov, E., Wang, Q., Zaritsky, A., Manasherob, R., Barak, Z., Schneider, B., Khamraev, A., Baizhanov, M., Glupov, V., et Margalith, Y.** (1999), Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3714-3716.
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Pauli, S., Rodgers, P., et Burges, H. D.** (1997), Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* **70**:59-68.
- Bernstein, J. A., Bernstein, I. L., Bucchini, L., Goldman, L. R., Hamilton, R. G., Lehrer, S., Rubin, C., et Sampson, H. A.** (2003), Clinical and laboratory investigation of allergy to genetically modified food. *Environ. Health Perspect.* **111**:1114-1121.
- Biggin, P. C. et Sansom, M. S. P.** (1996), Simulation of voltage-dependent interactions of α -helical peptides with lipid bilayers. *Biophys. Chem.* **60**:99-110.
- Binning, R. R. et Rice, M. E.** (2002), Effects of transgenic Bt corn on growth and development of the stalk borer *Papaipema nebris* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **95**:622-627.
- Bligh, E. G. et Dyer, W. J.** (1959), A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., et Li, J.** (2005), Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**:363-382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., et Lescar, J.** (2006), Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**:3391-3401.
- Boonserm, P., Pornwiroon, W., Katzenmeier, G., Panyim, S., et Angsuthanasombat, C.** (2004), Optimised expression in *Escherichia coli* and purification of the functional form of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa δ -endotoxin. *Prot. Expr. Purif.* **35**:397-403.
- Bravo, A., Gill, S. S. et Soberón, M.** (2007), Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**:423-435.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S., et Soberón, M.** (2004), Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**:38-46.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., et Peferoen, M.** (1992a), Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to Lepidopteran and Coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:247-253.

- Bravo, A., Jansens, S. et Peferoen, M.** (1992b), Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:237-246.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Peña, G., Nuñez-Valdez, M.-E., Soberón, M., et Quintero, R.** (1998), Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4965-4972.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F. et Handelsman, J.** (2006), Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15196-15199.
- Bucchini, L. et Goldman, L. R.** (2002), Starlink corn: a risk analysis, *Environ. Health Perspect.* **110**:5-13.
- Butko, P.** (2003), Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2415-2422.
- Buzdin, A. A., Revina, L. P., Kostina, L. I., Zalunin, I. A., et Chestukhina, G. G.** (2002), Interaction of 65- and 62-kDa proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry (Moscow)* **67**:648-655.
- Carroll, J., Convents, D., Van Damme, J., Boets, A., Van Rie, J., et Ellar, D. J.** (1997), Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* **70**:41-49.
- Carroll, J. et Ellar, D. J.** (1993), An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771-778.
- Carroll, J., Li, J. et Ellar, D. J.** (1989), Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* **261**:99-105.
- Chaufaux, J., Marchal, M., Gilois, N., Jehanno, I., et Buisson, C.** (1997), Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotypes, à travers le monde. *Can. J. Microbiol.* **43**:337-343.
- Chen, H., Zhang, G., Zhang, Q., et Lin, Y.** (2008), Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice lines on mortality and feeding behavior of rice stem borers (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **101**:182-189.
- Choma, C. T., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Pozsgay, M., Raynor, T., et Kaplan, H.** (1990), Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**:523-527.
- Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A. F., Harsa, S., et Gunes, H.** (2008), Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. *J. Appl. Microbiol.* **104**:515-525.
- 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. et Harvey, W. R.** (1981), Comparison of potassium transport in three structurally distinct regions of the insect midgut. *J. Exp. Biol.* **91**:103-116.
- Clairmont, F. R., Milne, R. E., Pham, V. T., Carrière M. B., et Kaplan, H.** (1998), Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **273**:9292-9296.
- Coux, F., Vachon, V., Rang, C., Moozar, K., Masson, L., Royer, M., Bes, M., Rivest, S., Brousseau, R., Schwartz, J.-L., Laprade, R., et Frutos, R.** (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 Harvey, W. R.** (1988), Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **137**:277-286.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., et Dean, D. H.** (1998), Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., et Dean, D. H.** (2009), *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Dai, S.-M. et Gill, S. S.** (1993), *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**:273-283.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., et Schnepf, H. E.** (2003a), Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **37**:409-433.
- de Maagd, R. A., Weeman-Hendricks, M., Molthoff, J. W., et Naimov, S.** (2003b), Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Arch. Microbiol.* **179**:363-367.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., et Van Rie, J.** (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-R636.
- Dow, J. A. T.** (1986), Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**:187-328.
- Dow, J. A. T. et Harvey, W. R.** (1988), Role of midgut electrogenic K⁺ pump potential in regulating lumen K⁺ and pH in larval lepidoptera. *J. Exp. Biol.* **140**:455-463.
- Ebersold, H. R., Luethy, P. et Mueller, M.** (1977), Changes in the fine structure of the gut epithelium of *Pieris brassicae* induced by the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Bull. Soc. Entomol. Suisse.* **50**:269-276.

- Endo, Y. et Nishiitsutsuji-Uwo, J.** (1980), Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. *J. Invertebr. Pathol.* **36**:90-103.
- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J.-Z., Shelton, A. M., Cheng, J., Feng, M.-G., et Shen, Z.** (2007), Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:956-961.
- Federici, B. A.** (2005), Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.* **89**:30-38.
- Feitelson J. S., Payne, J. et Kim, L.** (1992), *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technol.* **10**:271-275.
- Finney, D. J.** (1971), Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 20-49.
- Fortier, M., Vachon, V., Frutos, R., Schwartz, J.-L., et R. Laprade** (2007a), Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6208-6213.
- Fortier, M., Vachon, V., Kirouac, M., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2005), Differential effects of ionic strength, divalent cations and pH on the pore-forming activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *J. Membr. Biol.* **208**:77-87.
- Fortier, M., Vachon, V., Marceau, L., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2007b), Kinetics of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:1291-1298.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W., et English, L.** (2001), Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst.* **D57**:1101-1109.
- Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S. P., et Shai, Y.** (1998), The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an “umbrella-like” structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12289-12294.
- Gerber, D. et Shai, Y.** (2000), Insertion and organization within membranes of the 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.
- Giles, K. L., Hellmich, R. L., Iverson, C. T., et Lewis, L. C.** (2000), Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **93**:1011-1016.
- Giordana, B., Sacchi, V. F., Parenti, P., et Hanozet, G. M.** (1989), Amino acid transport systems in intestinal brush-border membranes from lepidopteran larvae. *Am. J. Physiol.* **257**:R494-R500.
- Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Schwartz, J.-L., Masson, L., et Laprade, R.** (2009a), Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**:575-580.

- Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Scharz, J.-L., Masson, L., et Laprade, R.** (2009b), Helix $\alpha 4$ of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin plays a critical role in the postbinding steps of pore formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:359-365.
- Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Su, Y., Larouche, G., Vincent, C., Schwartz, J.-L., Masson, L., et Laprade, R.** (2008), Cysteine scanning mutagenesis of $\alpha 4$, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2565-2572.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., et Soberón, M.** (2002), Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**:242-246.
- González-Cabrera, J., Eseriche, B., Tabashnik, B. E., et Ferré, J.** (2003), Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**:929-935.
- Gräf, R., Novak, F. J. S., Harvey, W. R., et Wieczorek, H.** (1992), Cloning and sequencing of cDNA encoding the putative insect plasma membrane V-ATPase subunit A. *FEBS Lett.* **300**:119-122.
- Griego, V. M., Fancher, L. J. et Spence, K. D.** (1980), Scanning electron microscopy of the disruption of tobacco hornworm, *Manduca sexta*, midgut by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Invertebr. Pathol.* **35**:186-189.
- Griffitts, J. S. et Aroian, R. V.** (2005), Many roads to resistance: How invertebrates adapts to Bt toxins. *BioEssays* **27**:614-624.
- Griko, N., Zhang, X., Ibrahim, M., Midboe, E. G., et Bulla, L. A., Jr.** (2008), Susceptibility of *Manduca sexta* to Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* correlates directly to developmental expression of the cadherin receptor BT-R₁. *Comp. Biochem. Physiol.* **151B**:59-63.
- Gringorten, J. L.** (2001), Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In Ishaaya, I. (ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 167-207.
- Gringorten, J. L., Crawford, D. N. et Harvey, W. R.** (1993), High pH in the ectoperitrophic space of the larval lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **183**:353-359.
- Gringorten, J. L., Milne, R. E., Fast, P. G., Sohi, S. S., et van Frankenhuyzen, K.** (1992), Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:47-52.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R., et Cygler, M.** (1995), *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447-464.

- Guex, N. et Peitsch, M. C.** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-2723.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D., et Rao, Z.** (2009), Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: an insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* **168**:259-266.
- Harvey, W. R., Cioffi, M. et Wolfersberger, M. G.** (1983), Chemiosmotic Potassium Ion Pump of Insect Epithelia. *Am. J. Physiol.* **244**:R163-R175.
- Harvey, W. R., Haskell, J. A. et Nedergaard, S.** (1968), Active transport by the *Cecropia* midgut: III. Midgut potential generated directly by active K^+ -transport. *J. Exp. Biol.* **48**:1-12.
- Harvey, W. R. et Wolfersberger, M. G.** (1979), Mechanism of inhibition of active potassium transport in isolated midgut of *Manduca sexta* by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Exp. Biol.* **83**:293-304.
- Heimpel, A. M. et Angus, T. A.** (1959), The site of action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.* **1**:152-170.
- Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., Spencer, T., Bidne, K. G., et Lewis, L. C.** (2001), Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:11925-11930.
- Hernández, C. S., Andrew, R., Bel, Y., et Ferré, J.** (2005), Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J. Invertebr. Pathol.* **88**:8-16.
- Herrero, S., Borja, M. et Ferré, J.** (2002), Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the geranium bronze, *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4090-4094.
- Hodgman, T. C. et Ellar, D. J.** (1990), Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq.* **1**:97-106.
- Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R., et Pliska, V.** (1988), Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**:85-91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., et Van Mellaert, H.** (1988), 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 Whiteley, H. R.** (1989), Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242-255.
- Hoopgarner, R. et Materu, M. E. A.** (1964), The toxicology and histopathology of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Galleria mellonella* (Linnaeus). *J. Insect Pathol.* **6**:26-30.

- Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J. L., Schwab, G., et Adang, M. J.** (2001), Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:872-879.
- Ibargutxi, M. A., Estela, A., Ferré, J., et Caballero, P.** (2006), Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:437-442.
- Ito, T., Bando, H. et Asano, S.-I.** (2006), Activation process of the mosquitocidal δ -endotoxin Cry39A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* BUN1-14 and binding property to *Anopheles stephensi* BBMV. *J. Invertebr. Pathol.* **93**:29-35.
- Jansens, S., Van Vliet, A., Dickburt, C., Buysse, L., Piens, C., Saey, B., de Wulf, A., Gosselé, V., Paez, A., Göbel, E., et Peferoen, M.** (1997), Transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. *Crop Sci.* **37**:1616-1624.
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Gill, S. S., Soberón, M., et Bravo, A.** (2008), The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides* **29**:318-323.
- Jouzani, G. S., Abad, A. P., Seifinejade, A., Marzban, R., Kariman, K., et Maleki, B.** (2008), Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**:83-94.
- Jurat-Fuentes, J. L. et Adang, M. J.** (2006), Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. invertebr. Pathol.* **92**:166-171.
- Kates, M.** (1972), Techniques in Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 347-353.
- Kirouac, M., Vachon, V., Fortier, M., Trudel, M.-C., Berteloot, A., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2006a), A mechanical force contributes to the “osmotic swelling” of brush-border vesicles. *Biophys. J.* **91**:3301-3312.
- Kirouac, M., Vachon, V., Noël, J.-F., Girard, F., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2002), Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171-179.
- Kirouac, M., Vachon, V., Quievy, D., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2006b), Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:506-515.
- Kirouac, M., Vachon, V., Rivest, S., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2003), Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* **196**:51-59.
- Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M., et Ito,**

- A. (2006), Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **281**:26350-26360.
- Klein, U., Löffelmann, G. et Wieczorek, H.** (1991), The midgut as a model system for insect K⁺-transporting epithelia: immunocytochemical localisation of a vacuolar-type H⁺ pump. *J. Exp. Biol.* **161**:61-75.
- Knowles, B. H.** (1994), Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**:275-308.
- Knowles, B. H. et Dow, J. A. T.** (1993), The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect midgut. *BioEssays* **15**:469-476.
- Konecka, E., Kanowski, A., Ziemnicka, J., Ziemnicki, K., et Paetz, H.** (2007), Analysis of *cry* gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Curr. Microbiol.* **55**:217-222.
- Kouassi, K. C., Lorenzetti, F., Guertin, C., Cabana, J., et Mauffette, Y.** (2001), Variation in the susceptibility of the forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) to *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* HD-1: effect of the host plant. *J. Econ. Entomol.* **94**:1135-1141.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C., Jansens, S., Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., Van Rie, J., Van Vliet, A., et Peferoen, M.** (1996), A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:80-86.
- Lane, N. J., Harrison, J. B. et Lee, W. M.** (1989), Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial δ -endotoxin. *J. Cell Sci.* **93**:337-347.
- Lebel, G., Vachon, V., Préfontaine, G., Girard, F., Masson, L., Juteau, M., Bah, A., Larouche, G., Vincent, C., Laprade, R., et Schwartz, J.-L.** (2009), Mutations in domain I interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in insect midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3842-3850.
- Lee, H.-K. et Gill, S. S.** (1997), Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4664-4670.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., et Chen, J.-S.** (2003), The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4648-4657.
- Lemeshko, V. V., Arias, M. et Orduz, S.** (2005), Mitochondria permeabilization by a novel polycation peptide BTM-P1. *J. Biol. Chem.* **280**:15579-15586.
- Li, J., Carroll, J. et Ellar, D. J.** (1991), Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815-821.
- Li, J., Derbyshire, D. J., Promdonkoy, B., et Ellar, D. J.** (2001), Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins

- from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571-577.
- Li, J., Koni, P. A. et Ellar, D. J.** (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.
- Lightwood, D. J., Ellar, D. J. et Jarrett, P.** (2000), Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5174-5181.
- Liu, Y.-B., Tabashnik, B. E., Meyer, S. K., et Crickmore, N.** (2001), Cross-resistance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3216-3219.
- Lorence, A., Darszon, A., Díaz, C., Liévano, A., Quintero, R., et Bravo, A.** (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., Tiktopulo, E. I., Vasiliev, V. D., Nikulin, A. D., Dobritsa, A. P., et Potekhin, S. A.** (2001), Structure of Cry3A δ -endotoxin within phospholipid membranes. *Biochemistry* **40**:14143-14151.
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R., et Adang, M. J.** (1997), 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.
- Makkar, H. S. P. et Becker, K.** (1996), Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *J. Agric. Food Chem.* **44**:1291-1295.
- Mandel, L. J., Moffett, D. F., Riddle, T. G., et Grafton, M. M.** (1980), Coupling between oxidative metabolism and active transport in the midgut of tobacco hornworm. *Am. J. Physiol.* **238**:C1-C9.
- Martin, F. G. et Harvey, W. R.** (1994), Ionic circuit analysis of K^+/H^+ antiport and amino acid/ K^+ symport energized by a proton-motive force in *Manduca sexta* larval midgut vesicles. *J. Exp. Biol.* **196**:77-92.
- Martin, M. M., Rockholm, D. C. et Martin, J. S.** (1985), Effects of surfactants, pH, and certain cations on precipitation of proteins by tannins. *J. Chem. Ecol.* **11**:485-494.
- Martin, P. A. W. et Travers, R. S.** (1989), Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2437-2442.
- Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V., et Brousseau, R.** (1994), Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851-860.
- Masson, L., Préfontaine, G., Péloquin, L., Lau, P. C. K., et Brousseau, R.** (1990) Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1, *Biochem. J.* **269**:507-512.

- Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R., et Schwartz, J.-L. (1999), Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996-32000.
- Meunier, L., Préfontaine, G., van Munster, M., Brousseau, R., et Masson, L. (2006), Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Mol. Biol.* **15**:475-483.
- Miranda, R., Zamudio, F. Z. et Bravo, A. (2001), Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:1155-1163.
- Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., Bosh, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K., et Adang, M. J. (1995), Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2086-2092.
- Morse, R. J., Yamamoto, T. et Stroud, R. M. (2001), Structure of Cry2Aa suggests an unexpected binding epitope. *Structure* **9**:409-417.
- Nair, M. S. et Dean, D. H. (2008), All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *J. Biol. Chem.* **283**:26324-26331.
- Nazarian, A., Jahangiri, R., Jouzani, G. S., Seifinejad, A., Soheilvand, S., Bagheri, O., Keshavarzi, M., et Alamisaied, K. (2009), Coleopteran-specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. *J. Invertebr. Pathol.* **102**:101-109.
- Nair, M. S., Liu, X. S. et Dean, D. H. (2008), Membrane insertion of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin: single mutation in domain II block partitioning of the toxin into the brush border membrane. *Biochemistry* **47**:5814-5822.
- Nicholls, C. N., Ahmad, W. et Ellar, D. J. (1989), Evidence for two different types of insecticidal P2 toxins with dual specificity in *Bacillus thuringiensis* subspecies. *J. Bacteriol.* **171**:5141-5147.
- Ogiwara, K., Indrasith, L. S., Asano, S., et Hori, H. (1992), Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:121-126.
- Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K., et Shin, T. (2009a), Parasporin nomenclature. <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>.
- Ohba, M., Mizuki, E. et Uemori, A. (2009b), Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* **29**:427-434.
- Oppert, B. (1999), Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**:1-12.
- Orlandi, P. A., Lampel, K. A., South, P. K., Assar, S. K., Carter, L., et Levy, D. D. (2002), Analysis of flour and food samples for Cry9C from bioengineered corn. *J. Food Prot.* **65**:426-431.

- Pang, A. S. D., Gringorten, J. L. et Bai, C.** (1999), Activation and fragmentation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by high concentrations of proteolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.* **45**:816-825.
- Pang, A. S. D., Gringorten, J. L. et van Frankenhuyzen, K.** (2002), Interactions between Cry9Ca and two Cry1A δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* in larval toxicity and binding to brush border membrane vesicles of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**:109-114.
- Pendleton, R. I.** (1970), Sodium and potassium fluxes in *Philosamia ricini* during *Bacillus thuringiensis* protein crystal intoxication. *J. Invertebr. Pathol.* **16**:313-314.
- Peitsch, M. C.** (1995), Protein modeling by e-mail. *Bio/Technology* **13**:658-660.
- Peitsch, M. C.** (1996), ProMod and Swiss-Model: internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:274-279.
- Percy, J. et Fast, P. G.** (1983), *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* **41**:86-98.
- Peyronnet, O., Nieman, B., Génèreux, F., Vachon, V., Laprade, R., et Schwartz, J.-L.** (2002), Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**:113-122.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Brousseau, R., Baines, D., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (1997), Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1679-1684.
- Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2001), Ion channel induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* **184**:45-54.
- Pigott, C. R. et Ellar, D. J.** (2007), Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:255-281.
- Pinto, L. M. N., Azambuja, A. O., Diehl, E., et Fiuza, L. M.** (2003), Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae). *Braz. J. Biol.* **63**:301-306.
- Promdonkoy, B. et Ellar, D. J.** (2003), Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **374**:255-259.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., et Bhatnagar, R. K.** (2002), Silencing the midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**:46849-46851.
- Raybourne, R. B., Williams, K. M., Vogt, R., Reissman, D. B., Winterton, B. S., et Rubin, C.** (2003), Development and use of an ELISA test to detect IgE antibody to Cry9C following possible exposure to bioengineered corn. *Int. Arch. Allergies Immunol.* **132**:322-328.

- Reed, J. P. et Halliday, W. R.** (2001), Establishment of Cry9C susceptibility baselines for European corn borer and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **94**:397-402.
- Revina, L. P., Kostina, L. I., Ganushkina, L. A., Mikhailova, A. L., Zalunin, I. A., et G. G. Chestukhina** (2004), Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11A endotoxin from fragments corresponding to its N- and C-moieties restores its original biological activity. *Biochemistry (Moscow)* **69**:181-187.
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., et Je, Y. H.** (2007), *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:547-559.
- Rosas-Garcia, N. M., Mireles-Martinez, M., Hernández-Mendoza, J. L., et Ibarra, J. E.** (2008), Screening of *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from avocado orchards in Mexico, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *J. Appl. Microbiol.* **104**:224-230.
- Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Escriche, B., et Caballero, P.** (2007), Potential of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:337-340.
- Rukmini, V., Reddy, C. Y. et Venkateswerlu, G.** (2000), *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**:109-116.
- Sacchi, V. F. et Wolfersberger, M. G.** (1996), Amino acid absorption. In: *Biology of the Insect Midgut* (Lehane, M. J. and Billingsley, P. F., eds.), Chapman & Hall, London, pp. 265-292.
- Sauka, D. H., Sánchez, J., Bravo, A., et Benintende, G. B.** (2007), Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. *J. Invertebr. Pathol.* **94**:125-129.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., et Dean, D. H.** (1998), *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Schultz, J. C. et Lechowicz, M. J.** (1986), Host plant, larval age, and feeding behavior influence midgut pH in the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Oecologia* **71**:133-137.
- Schwartz, J.-L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., et Rousseau, E.** (1993), Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**:53-62.
- Schwartz, J.-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Préfontaine, G., Brousseau, R., et Masson, L.** (1997a), Restriction of intramolecular movements within the

- Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**:397-402.
- Schwartz, J.-L., Lu, Y.-J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., et Adang, M. J.** (1997b), Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxin in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**:270-276.
- Schwarzenbach, G. et Flaschka, H.** (1969), Complexometric Titrations. 2^e édition anglaise, distribué aux États-Unis par Barnes et Noble, Inc.
- Schweikl, H., Klein, U., Schindlbeck, M., et Wieczorek, H.** (1989), A vacuolar-type ATPase, partially purified from potassium transporting plasma membranes of tobacco hornworm midgut. *J. Biol. Chem.* **264**:11136-11142.
- Segura, C., Guzman, F., Patarroyo, M. E., et Orduz, S.** (2000), Activation pattern and toxicity of the Cry11Bb1 toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**:52-62.
- Sekar, V., Held, B., Tippett, J., Amirhusin, B., Robeff, P., Wang, K., et Wilson, H. M.** (1997), Biochemical and molecular characterization of the insecticidal fragment of CryV. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2798-2801.
- Shao, Z., Cui, Y., Liu, X., Yi, H., Ji, J., et Yu, Z.** (1998), Processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.* **72**:73-81.
- Shelton, A. M., Zhao, J.-Z. et Roush, R. T.** (2002), Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* **47**:845-881.
- Shevelev, A. B., Lewitin, E., Novikova, S. I., Wojciechowska, Ya. A., Usacheva, E. A., Chestukhina, G. G., et Stepanov, V. M.** (1998), A new PCR-based approach to a fast search of a wide spectrum of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**:1265-1271.
- Shinkawa, A., Yaoi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H., et Sato, R.** (1999), Binding of phylogenetically distant *Bacillus thuringiensis* Cry toxins to a *Bombyx mori* aminopeptidase N suggests importance of Cry toxin's conserved structure in receptor binding. *Curr. Microbiol.* **39**:14-20.
- Siqueira, H. A. A., Moellenbeck, D., Spencer, T., et Siegfried, B. D.** (2004), Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *J. Econ. Entomol.* **97**:1049-1057.
- Skibbe, U., Christfeller, J. T., Callaghan, P. T., Eccles, C. D., et Laing, W. A.** (1996), Visualization of pH gradients in the larval midgut of *Spodoptera litura* using ³¹P-NMR microscopy. *J. Insect. Physiol.* **42**:777-790.
- Slatin, S. L., Abrams, C. K. et English, L.** (1990), Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:765-772.
- Spiegel, J. P.** (2001), The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**:13-21.

- Sugimura, M., Sato, R. et Iwahana, H.** (1997), Unusual proteolytic processing of a δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* strain Buibui by larval midgut-juice of *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Entomol. Zool.* **32**:533-540.
- Sutter, G. R. et Raun, E. S.** (1967), Histopathology of European-corn-borer larvae treated with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **9**:90-103.
- Święcicka, I. et Mahillon, J.** (2005), The clonal structure of *Bacillus thuringiensis* isolates from north-east Poland does not correlate with their *cry* gene diversity. *Environ. Microbiol.* **7**:34-39.
- Tabashnik, B. E., Johnson, K. W., Engleman, J. T., et Baum, J. A.** (2000a), Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ja in a strain of diamondback moth adapted to artificial diet. *J. Invertebr. Pathol.* **76**:81-83.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y.-B., de Maagd, R. A., et Dennehy, T. J.** (2000b), Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4582-4584.
- Takagi, K., Teshima, R., Nakajima, O., Okunuki, H., et Sawadfa, J.-I.** (2006), Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **44**:182-188.
- Thammasittirong, A. et Attathom, T.** (2008), PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. *J. Invertebr. Pathol.* **98**:121-126.
- Tomimoto, K., Hayakawa, T. et Hori, H.** (2006), Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa shows that almost the whole activated Cry1Aa molecule penetrates into the membrane. *Comp. Biochem. Physiol.* **144B**:413-422.
- Tran, L. B., Vachon, V., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (2001), Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488-4494.
- Vachon, V., Paradis, M.-J., Marsolais, M., Schwartz, J.-L., et Laprade, R.** (1995), Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **148**:57-63.
- Vachon, V., Schwartz, J.-L. et Laprade, R.** (2006), Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins. *J. Invertebr. Pathol.* **92**:160-165.
- Valaitis, A. P.** (2008), *Bacillus thuringiensis* pore-forming toxins trigger massive shedding of GPI-anchored aminopeptidase-N from gypsy moth midgut epithelial cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**:611-618.
- van Frankenhuyzen, K.** (2009), Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* **101**:1-16.
- van Frankenhuyzen, K., Gringorten, L. et Gauthier, D.** (1997), Cry9Ca1 toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against the

- spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4132-4134.
- van Frankenhuyzen, K. et Nystrom, C.** (2009), The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. <http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>.
- Vanhercke, T., Ampe, C., Tirry, L., et Denolf, P.** (2005), Reducing mutational bias in random protein libraries. *Anal. Biochem.* **339**:9-14.
- van Munster, M., Préfontaine, G., Meunier, L., Elias, M., Mazza, A., Brousseau, R., et Masson, L.** (2007), Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Mol. Biol.* **16**:25-35.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., et Van Mellaert, H.** (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., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., et Van Mellaert, H.** (1990), Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378-1385.
- Walker, K. A., Hellmich, R. L. et Lewis, L. C.** (2000), Late-instar European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) tunneling and survival in transgenic corn hybrids. *J. Econ. Entomol.* **93**:1276-1285.
- Wang, J., Boets, A., Van Rie, J., et Ren, G.** (2003), Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J. Invertebr. Pathol.* **82**:63-71.
- Wieczorek, H., Putzenlechner, M., Zeiske, W., et Klein, U.** (1991), A vacuolar-type proton pump energizes K^+/H^+ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **266**:15340-15347.
- Wieczorek, H., Weerth, S., Schindlbeck, M., et Klein, U.** (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.
- Wieczorek, H., Wolfersberger, M. G., Cioffi, M., et Harvey, W. R.** (1986), Cation-stimulated ATPase activity in purified plasma membranes from tobacco hornworm midgut. *Biochim. Biophys. Acta* **857**:271-281.
- Wolfersberger, M. G.** (1992), V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. *J. Exp. Biol.* **172**:377-386.
- Wolfersberger, M. G.** (2000), Amino acid transport in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **45**:111-120.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., Giordana, B., et Hanozet, G. M.** (1987), Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:301-308.

- Wood, J. L., Farrand, P. S. et Harvey, W. R.** (1969), Active transport by the *Cecropia* midgut: VI. Microelectrode potential profile. *J. Exp. Biol.* **50**:169-178.
- Wu, D. et Aronson, A. I.** (1992), Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J Biol Chem* **267**:2311-2317.
- Yamagiwa, M., Esaki, M., Otake, K., Inagaki, M., Komano, T., Amachi, T., et Sakai, H.** (1999), Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3464-3469.
- Zalunin, I. A., Revina, L. P., Kostina, L. I., Chestukhina, G. G., et Stepanov, V. M.** (1998), Limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIG and CryIVB δ -endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains. *J. Prot. Chem.* **17**:463-471.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Rose-Young, L., et Bulla, L. A., Jr.** (2005), Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R₁ expressed in insect cells. *Cell Death Diff.* **12**:1407-1416.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. et Bulla, L. A., Jr.** (2006), A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:9897-9902.
- Zhang, X., Griko, N. B., Corona, S. K., et Bulla, L. A., Jr.** (2008), Enhanced exocytosis of the receptor BT-R₁ induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol.* **149B**:581-588.
- Zhao, J.-Z., Li, Y.-X., Collins, H. L., Cao, J., Earle, E. D., et Shelton, A. M.** (2001), Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C. *J. Econ. Entomol.* **94**:1547-1552.