

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal

Importance de l'hélice $\alpha 4$ et des boucles inter-hélicales du domaine I dans le mécanisme
de formation de pores par la toxine Cry1Aa du bacille de Thuringe

par

Frédéric Girard

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 moléculaires

juin 2008

© Frédéric Girard 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Importance de l'hélice $\alpha 4$ et des boucles inter-hélicales du domaine I dans le mécanisme
de formation de pores par la toxine Cry1Aa du bacille de Thuringe

présentée par :
Frédéric Girard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur :	Professeur Jean-Yves Lapointe
Directeur de recherche :	Professeur Raynald Laprade
Membre du jury :	Professeur Rémy Sauvé
Examineur externe :	Docteur Jean-Charles Côté
Représentant du doyen :	Professeur Jacques Brodeur

Thèse acceptée le 23 septembre 2008

Résumé

Le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*) est caractérisé par l'apparition de cristaux parasporaux durant sa sporulation. Ceux-ci sont composés en partie par des protéines Cry qui possèdent des propriétés insecticides. Ces dernières sont d'ailleurs utilisées dans divers produits commerciaux en agriculture et en foresterie. Les toxines Cry agissent au niveau de l'intestin moyen de l'insecte ciblé. Elles se fixent sur des récepteurs spécifiques, forment des oligomères et s'insèrent dans la membrane plasmique pour finalement former des pores. L'équilibre osmotique des cellules intestinales est ainsi aboli, ce qui entraîne la lyse des cellules et la mort de l'insecte.

Les mécanismes moléculaires responsables de la formation des pores n'ont pas complètement été élucidés. Les travaux présentés dans cette thèse examinent le rôle du domaine I de la Cry1Aa dans la formation des pores. Dans ce but, plusieurs mutations cystéine ponctuelles, portant sur des résidus situés dans l'hélice $\alpha 4$, dans les boucles reliant les hélices du domaine I et la boucle reliant les domaines I et II, ont été effectuées. Les mutations cystéine portant sur les résidus situés du côté hydrophile de l'hélice $\alpha 4$ entraînent une diminution du nombre de pores formés dans la membrane sans modifier de façon majeure la sélectivité ionique ou la taille des pores. Si la structure des mutants est similaire à celle de la Cry1Aa, certains d'entre eux forment cependant des ponts disulfure intermoléculaires avec d'autres monomères ou polypeptides, ce qui explique partiellement leur perte d'activité. Tous les mutants testés, à l'exception de L147C, conservent leur capacité de se fixer sur les récepteurs. Ces résultats indiquent que l'hélice $\alpha 4$ joue un rôle important dans les étapes qui suivent la fixation sur les récepteurs. La modification chimique par un composé méthaneethiosulfonate comportant un groupement biotine et l'ajout subséquent de streptavidine inhibe de façon marquée l'activité des mutants cystéine des résidus des boucles situées près des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$. De plus, la modification chimique de la cystéine qui a remplacé la tyrosine à la position 153 (située dans la boucle reliant les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$) par des composés méthaneethiosulfonate qui possèdent une charge négative ou positive, ou un groupement aromatique similaire à la chaîne latérale de la

tyrosine stimule sa capacité de former des pores. L'ensemble de ces résultats appuie le modèle en parapluie, dans lequel les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ s'insèrent dans la membrane lors de la formation des pores.

Mots clés : *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*, gonflement osmotique, formation de pores, toxine insecticide, vésicules de membrane à bordure en brosse, modification chimique, mutagenèse dirigée.

Summary

Bacillus thuringiensis is characterized by its ability to form parasporal crystal inclusions during sporulation. These are composed in major part of Cry proteins that possess insecticidal properties which are widely used in many commercial products in agriculture and forestry. Cry toxins act in the midgut of susceptible insects by binding to specific receptors, forming oligomers that insert into the plasma membrane and form large pores. The osmotic equilibrium of intestinal cells is thus abolished, and this leads to the lysis of the cells and eventually to the death of the insect.

The molecular mechanisms involved in pore formation are not fully understood. In this thesis, the role of domain I of Cry1Aa in pore formation was investigated. To achieve this goal, several single-site cysteine mutations directed at amino acids located in helix $\alpha 4$, or in the loops linking the helices of domain I or linking domains I and II have been created. Mutations that modify amino acids located on the hydrophilic side of helix $\alpha 4$ cause a strong reduction in the number of pores formed without major effects on their ionic selectivity or size. Although the structure of these mutants is similar to that of Cry1Aa, some of them formed intermolecular disulfide bridges with other monomers or polypeptides, an observation which partially explains their loss of activity. All mutants tested, with the exception of L147C, retained the ability to bind to their receptors. These results indicate that helix $\alpha 4$ plays an important role in the post-binding steps of pore formation. Chemical modification using a methanethiosulfonate compound bearing a biotin group and the subsequent addition of streptavidin strongly inhibited the formation of pores by cysteine mutants when the altered loop residues were located near helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$. In addition, chemical modification of the cysteine that replaced the tyrosine at position 153 (located in the loop linking helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$) with methanethiosulfonate agents that possess a negative or a positive charge, or an aromatic group similar to the side chain of tyrosine stimulated its pore-forming activity. Altogether, these results support the umbrella model in which helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ insert into the membrane to form pores.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Manduca sexta*, Osmotic swelling, Pore formation, Insecticidal toxin, Brush border membrane vesicles, Chemical modification, Site-directed mutagenesis.

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xv
1. Introduction.....	1
1.1. Mode d'action.....	2
1.1.1. Sporulation de <i>Bacillus thuringiensis</i> et production de toxine	2
1.1.2. Structure des toxines Cry	3
1.1.3. Physiologie intestinale de <i>Manduca sexta</i>	11
1.1.4. Solubilisation et activation des toxines Cry.....	12
1.1.5. Fixation des toxines Cry sur les récepteurs.....	13
1.1.6. Formation de pores	16
1.2. Rôle des domaines II et III	19
1.2.1. Interaction des toxines Cry avec les récepteurs	21
1.2.1.1. Boucle $\alpha 8$ du domaine II.....	21
1.2.1.2. Boucle 1 du domaine II	22
1.2.1.3. Boucle 2 du domaine II	24
1.2.1.4. Boucle 3 du domaine II	26
1.2.1.5. Domaine III	28
1.2.2. Fonction des autres éléments des domaines II et III	30
1.3. Rôle du domaine I	31
1.3.1. Rôle des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$	31
1.3.2. Rôle des boucles inter-hélices.....	35
1.3.3. Fonction des autres éléments du domaine I.....	36
1.4. Présentation des travaux	39
1.4.1. Contribution des coauteurs	43

2. Matériel et méthodes	45
2.1. Mutagenèse	45
2.2. Production et préparation des toxines Cry.....	45
2.2.1. Conditions oxydantes.....	45
2.2.2. Conditions réductrices.....	46
2.3. Modification chimique	47
2.4. Électrophorèse	47
2.5. Transfert des protéines sur membrane.....	48
2.6. Digestion des toxines.....	48
2.7. Dichroïsme circulaire	49
2.8. Bioessais	49
2.9. Préparation des vésicules.....	50
2.10. Gonflement osmotique	50
2.10.1. Expériences de préincubation	50
2.10.2. Cinétique de gonflement osmotique	51
2.10.3. Compétition entre les mutants et la Cry1Aa.....	52
3. Cysteine Scanning Mutagenesis of $\alpha 4$, a Putative Pore-Lining Helix of the <i>Bacillus thuringiensis</i> Insecticidal Toxin Cry1Aa	53
Résumé	53
Summary.....	55
Introduction	56
Materials and methods.....	57
Mutagenesis and toxin preparation	57
Bioassays.....	58
Preparation of brush border membrane vesicles	58
Light-scattering assay	59
Results	60
Toxicity	60
Pore-forming ability.....	60
Pore properties	61
Kinetics of pore formation	63

Discussion.....	64
Acknowledgments	67
References	67
Figure legends	73
Accord des coauteurs.....	81
Permission de l'éditeur	82
4. Helix $\alpha 4$ of the <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1Aa toxin plays a critical role in the post-binding steps of pore formation	83
Résumé	83
Summary.....	86
Introduction	87
Materials and methods.....	88
Toxin preparation.....	88
Circular dichroism	88
Electrophoresis and protein digestion.....	88
Preparation of brush border membrane vesicles	89
Osmotic swelling assay.....	89
Results	90
Protease digestion	90
Circular dichroism	90
Homo-dimer formation	90
Competition assay.....	91
Discussion.....	92
Acknowlegments	95
References	95
Figure legends	101
Accord des coauteurs.....	108
5. Chemical modification of <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation	109
Résumé	109

Abstract.....	111
1. Introduction	112
2. Materials and methods.....	113
2.1. Mutagenesis and toxin preparation	113
2.2. Chemical modification.....	114
2.3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.....	114
2.4. Western blot	115
2.5. Preparation of brush border membrane vesicles.....	115
2.6. Osmotic swelling assay.....	116
3. Results and discussion	116
Acknowledgements	121
References	122
Figure legends	126
Accord des coauteurs.....	133
6. Discussion générale.....	134
6.1. Formation de pores par les mutants de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa	135
6.2. Rôle de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa dans la formation des pores	144
6.3. Modification chimique des mutants cystéine du domaine I.....	147
7. Perspectives.....	151
8. Conclusions.....	155
Références.....	157
Curriculum vitae.....	xvi

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. Ponts salins intramoléculaires dans la Cry1Aa.....	10
---	----

Chapitre 3

Table 1. Toxicity of Cry1Aa α 4 mutants toward <i>M. sexta</i> larvae.....	71
---	----

Table 2. Kinetic parameters of pore formation by Cry1Aa mutant toxins.....	72
--	----

Chapitre 4

Table 1. Summary of results.....	99
----------------------------------	----

Chapitre 6

Tableau 1. Résumé des résultats.....	139
--------------------------------------	-----

Tableau 2. Tableau comparatif des différents solutés.....	142
---	-----

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Structure cristalline de diverses protéines Cry.....	5
Figure 2. Position de chacun des domaines de la Cry1Aa selon sa structure cristallographique	6
Figure 3. Structure cristalline du domaine I de la Cry1Aa.....	7
Figure 4. Structure cristalline du domaine II de la Cry1Aa	8
Figure 5. Structure cristalline du domaine III de la Cry1Aa	9
Figure 6. Ponts salins reliant le domaine I et les domaines II et III	9
Figure 7. Modèles d'insertion des toxines Cry.....	18
Figure 8. Résidus clés du domaine II de la Cry1Aa	25
Figure 9. Résidus clés du domaine III de la Cry1Aa.....	29
Figure 10. Structure de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa vue de face	40
Figure 11. Représentation schématique du domaine I de la Cry1Aa	41

Chapitre 3

Figure 1. Effects of the Cry1Aa mutant toxins A149C and S139C on the osmotic swelling of brush border membrane vesicles isolated from fifth-instar <i>M. sexta</i> larvae	75
Figure 2. Dose-response curves for Cry1Aa mutant toxins.....	76
Figure 3. Effects of mutant toxins on the permeability of brush border membrane vesicles to different salts	77
Figure 4. Effects of mutant toxins on the permeability of brush border membrane vesicles to oligosaccharides	78
Figure 5. Kinetics of pore formation by Cry1Aa and the mutant toxins I145C and A149C at pH 7.5	79
Figure 6. Summary of mutant pore-forming properties	80

Chapitre 4

Figure 1. Protease sensitivity of Cry1Aa and its inactive mutants	103
---	-----

Figure 2. Circular dichroism spectra of wild-type and mutant toxins	104
Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of Cry1Aa and its mutants in the absence and presence of dithiothreitol	105
Figure 4. Effect of dithiothreitol on pore formation by Cry1Aa and its mutants	106
Figure 5. Competitive binding assay between Cry1Aa and its inactive mutants	107

Chapitre 5

Figure 1. Chemical reactivity of Cry1Aa domain I cysteine mutants	128
Figure 2. Effect of chemical modification on the pore-forming activity of domain I cysteine mutants	129
Figure 3. Effect of dithiothreitol on the formation of pores by mutant Q151C	130
Figure 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of Cry1Aa domain I cysteine mutants in the absence or presence of dithiothreitol	131
Figure 5. Chemical modification of mutant Y153C	132

Liste des abréviations

Caps	3-cyclohexylamino-1-propanesulfonate
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène-diamine-tétraacétate
EGTA	éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N, N', N'-tetraacétate
Hepes	N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonate)
KCl	chlorure de potassium
KGlu	gluconate de potassium
MTSEA-biotine	N-biotinylaminoéthyl méthanethiosulfonate
MTSEA	2-aminoéthyl méthanethiosulfonate
MTSES	(2-sulfonatoéthyl) méthanethiosulfonate
MTSHMB	4-(hydroxyméthyl)benzyl méthanethiosulfonate
NMDGCl	hydrochlorure de N-méthyle-D-glucamine
Raf	raffinose
Suc	sucrose
Tris	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

Remerciements

Je voudrais exprimer ma gratitude au professeur Raynald Laprade d'avoir accepté de me diriger tout au long de mes études supérieures, et tous les membres de son laboratoire de m'avoir accueilli. J'ai grandement apprécié l'ambiance chaleureuse qui règne au sein de cette équipe de recherche. L'amitié que j'ai développée avec chacun de ses membres m'est très précieuse. Je remercie particulièrement le docteur Vincent Vachon pour toute l'aide qu'il m'a accordée au cours de ces années. Je remercie aussi le professeur Jean-Louis Schwartz pour sa collaboration.

Je remercie tous mes collaborateurs : Gabrielle Préfontaine, Lucie Marceau, Yanhui Su, Geneviève Larouche, Geneviève Lebel, Charles Vincent et Luke Masson. Je voudrais également remercier Marc Juteau pour la production des toxines Cry, Mireille Marsolais pour l'entretien des larves de *Manduca sexta*, Michel Brunet pour le soutien technique et la professeure Andreea Schmitzer pour son aide dans les expériences de dichroïsme circulaire.

Je remercie mes collègues Jean-Frédéric Brunet, Mélanie Fortier et Martin Kirouac pour leur soutien tout au long de mes études. Je remercie aussi tous les professeurs du Groupe d'étude des protéines membranaires pour leur disponibilité, leur aide et leur contribution à ma formation académique.

Je remercie mes parents, Louise Moreau et Charles Girard, ma sœur, Nadia Girard, et ma conjointe, Isabelle Aubouy, pour leur encouragement continu.

Les fonds de recherche des professeurs Laprade et Schwartz utilisés pour la réalisation de cette thèse proviennent des organismes suivants : le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies, Valorisation-Recherche Québec, le Groupe d'étude des protéines membranaires, le Réseau biocontrôle et le Réseau québécois de recherche en phytoprotection. La bourse que j'ai obtenue tout au long de mes études m'a généreusement été donnée à partir de ces mêmes fonds de recherche. J'ai également reçu une bourse de la Faculté des études supérieures et postdoctorales. Les professeurs Laprade et Schwartz m'ont aussi permis d'assister à plusieurs congrès internationaux.

1. Introduction

Le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*) est une bactérie à Gram positif qui produit, lors de sa sporulation, une variété de protéines possédant des propriétés insecticides. Ces toxines sont produites sous forme de cristaux protéiques parasporaux hautement toxiques pour plusieurs espèces d'insectes incluant principalement certains lépidoptères, diptères et coléoptères (Beegle et Yamamoto, 1992). Leur spectre de toxicité comprend aussi des insectes appartenant à d'autres ordres (hyménoptères, homoptères, orthoptères et mallophages), des nématodes, des mites et des protozoaires (Feitelson *et al.*, 1992). Les politiques actuelles concernant la réduction de l'utilisation des pesticides chimiques et le développement grandissant des phénomènes de résistance chez plusieurs types d'insectes à ces mêmes pesticides ont stimulé la mise au point de techniques de lutte biologique contre les insectes ravageurs. L'emploi de *B. thuringiensis* et de ses protéines insecticides est présentement le moyen de contrôle biologique le plus répandu dans le monde. Puisque ces protéines possèdent une toxicité spécifique, elles permettent de cibler une espèce d'insectes précise sans nuire à d'autres qui sont bénéfiques. De plus, elles ne sont pas toxiques pour les mammifères (Siegel, 2001). La possibilité de modifier les gènes codant pour les protéines de *B. thuringiensis* permettra de produire des toxines de plus en plus efficaces contre les insectes et de contrecarrer l'apparition de résistance chez les insectes par génie moléculaire. Plusieurs plantes transgéniques contenant un gène de diverses protéines du bacille de Thuringe ont d'ailleurs été créées et sont déjà commercialisées à grande échelle. L'utilisation accrue des insecticides biologiques produits par le bacille de Thuringe a créé un vif intérêt pour l'étude du fonctionnement des différentes toxines. Le présent chapitre résume l'ensemble des études effectuées sur la structure et la fonction des différents domaines constituant le principal groupe de ces toxines, les δ -endotoxines Cry.

1.1. Mode d'action

Le mécanisme d'action des protéines insecticides Cry, qui a été amplement étudié (Knowles et Dow, 1993; Knowles, 1994; Dean *et al.*, 1996; Li, 1996; Rajamohan *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998; Aronson et Shai, 2001; Li *et al.*, 2001), est composé de plusieurs étapes. La protéine, qui est d'abord produite par la bactérie sous forme de protoxine, est ingérée par les larves d'insectes sensibles et solubilisée dans le milieu intestinal de l'insecte qui, chez les lépidoptères, est fortement alcalin. Dans le cas de plusieurs protéines Cry, la protoxine doit être digérée pour former le fragment actif de la toxine. La toxine active va ensuite se fixer sur différents récepteurs situés à la surface de la membrane apicale des cellules en colonne de l'intestin moyen. La fixation de la toxine sur les récepteurs entraîne un changement de conformation de la protéine qui permet son insertion dans la membrane plasmique. Différentes molécules de toxine doivent former un oligomère pour qu'il y ait formation de pores. L'oligomérisation pourrait avoir lieu avant ou après l'insertion de la toxine. Les pores formés par la toxine abolissent plusieurs gradients transmembranaires, ce qui entraîne un déséquilibre osmotique qui conduit à la lyse de la cellule et à la mort de l'insecte.

1.1.1. Sporulation de *Bacillus thuringiensis* et production de toxine

Le cycle de vie de *B. thuringiensis* est composé de deux phases : la division cellulaire végétative et le développement de la spore. Sous sa forme végétative, *B. thuringiensis* a l'apparence d'un bâtonnet de 2 à 5 μm de long et de 1 μm de large. Il évolue sous forme végétative lorsque les conditions environnantes lui sont favorables. Cependant, lorsque ces conditions lui sont défavorables, il entre dans sa phase de sporulation (Bulla *et al.*, 1980).

B. thuringiensis est caractérisé par l'apparition de cristaux parasporaux durant sa sporulation. Ces derniers sont composés de protéines : les δ -endotoxines (Bulla *et al.*, 1980). Il existe deux groupes de δ -endotoxines : les protéines Cry et Cyt. Les toxines Cry sont fortement toxiques pour certains insectes appartenant à plusieurs ordres

(lépidoptères, diptères, coléoptères, etc.) et sont responsables en grande partie de la toxicité attribuée au bacille de Thuringe. Bien que cytolytiques *in vitro* pour une variété de cellules, les toxines Cyt agissent spécifiquement contre certains diptères *in vivo*.

B. thuringiensis sécrète aussi d'autres protéines qui peuvent contribuer à sa virulence. Ces protéines incluent des phospholipases, des toxines sensibles (α -exotoxine) et tolérantes (β -exotoxine) à la chaleur, des protéases, des chitinases et des protéines insecticides végétatives (Vip). Ces dernières sont produites durant la phase végétative de croissance de la bactérie (Schnepf *et al.*, 1998).

1.1.2. Structure des toxines Cry

À partir de 1989, les toxines Cry étaient regroupées en quatre classes principales divisées en sous-classes selon leur spectre de toxicité et le degré d'homologie de leur séquence d'acides aminés. Les classes étaient identifiées par un chiffre romain : I, spécifique aux lépidoptères; II, spécifique aux lépidoptères et aux diptères; III, spécifique aux coléoptères; IV, spécifique aux diptères. Les sous-classes étaient identifiées par une lettre majuscule qui au besoin était suivie d'une lettre minuscule pour distinguer des protéines apparentées (Höfte et Whiteley, 1989). Certaines divergences entre le spectre de toxicité et le degré d'homologie apparurent avec l'étude de nouvelles toxines ce qui entraîna, en 1998, une révision de la nomenclature (Crickmore *et al.*, 1998). Dans la nouvelle classification à quatre rangs, les protéines Cry partageant moins de 45% d'identité entre leurs séquences d'acides aminés doivent posséder un premier rang différent (ex. Cry1Aa1 et Cry4Aa1); entre 45 et 78 %, elles doivent avoir un deuxième rang différent (ex. Cry1Aa1 et Cry1Ca1); entre 78 et 95%, elles doivent posséder un troisième rang différent (ex. Cry1Aa1 et Cry1Ac1) et un quatrième rang fut instauré afin d'identifier les protéines ayant de faibles différences (> 95% d'identité). Dans la plupart des cas, ces différences sont causées par quelques mutations ponctuelles ou par des erreurs de séquençage. L'utilisation des troisième et quatrième rangs de la classification est optionnelle. La majorité des protéines Cry ont conservé leur appellation sous cette nouvelle nomenclature (en considérant le passage des chiffres

romains vers les chiffres arabes). Aujourd'hui, plus d'une centaine de gènes différents codant pour des toxines Cry ont été identifiés.

La structure de six toxines Cry sous forme active a été déterminée par cristallographie à rayon-X. Il s'agit des protéines Cry3A (Li *et al.*, 1991), Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001) et Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001) dont les structures sont présentées dans la Figure 1, et des protéines Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) et Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006). Remarquablement, chacune de ces protéines possède une structure générale très semblable. Elles sont composées de trois domaines distincts suivant à une exception près la séquence d'acides aminés. Les r.m.s.d. (*root mean square deviation*) entre les atomes du squelette de la structure de Cry1Aa versus celles de Cry2Aa, Cry3A et Cry3Bb sont de 1,65, 1,20 et 1,25 Å respectivement. Le domaine I de la Cry1Aa s'étend des acides aminés 29 à 253; le domaine II inclut les positions 265 à 462, et le domaine III comprend les résidus 254 à 264 et 463 à 621 (Fig. 2).

Le domaine I est composé de sept hélices α antiparallèles (Fig. 3). L'hélice α_5 , qui est majoritairement composée de résidus hydrophobes, est entourée de six hélices α amphiphiles qui sont légèrement penchées relativement à l'hélice centrale. Les hélices α_4 et α_5 forment avec la boucle qui les relie le segment le plus hydrophobe du domaine I. L'hélice α_2 est en fait composée de deux hélices distinctes reliées par une petite boucle. Les hélices α_3 à α_7 comprennent de cinq à neuf tours et ont des longueurs allant de 30 à 45 Å. La structure publiée du domaine I de la toxine Cry2Aa possède une hélice supplémentaire, α_0 (identifiée en jaune), qui est normalement digérée lors de l'activation de la toxine (Fig. 1B).

Le domaine II est composé de trois feuillets β agencés de manière à former un prisme triangulaire (prisme- β) (Fig. 4). Ces feuillets sont unis selon une topologie en clé grecque. Pour chacun des feuillets, les brins du milieu forment de longues épingles. Leurs extrémités forment la pointe du domaine II et sont souvent appelées boucles 1, 2 et 3. La boucle qui inclut les petites hélices α_{8a} et α_{8b} est souvent aussi appelée boucle α_8 .

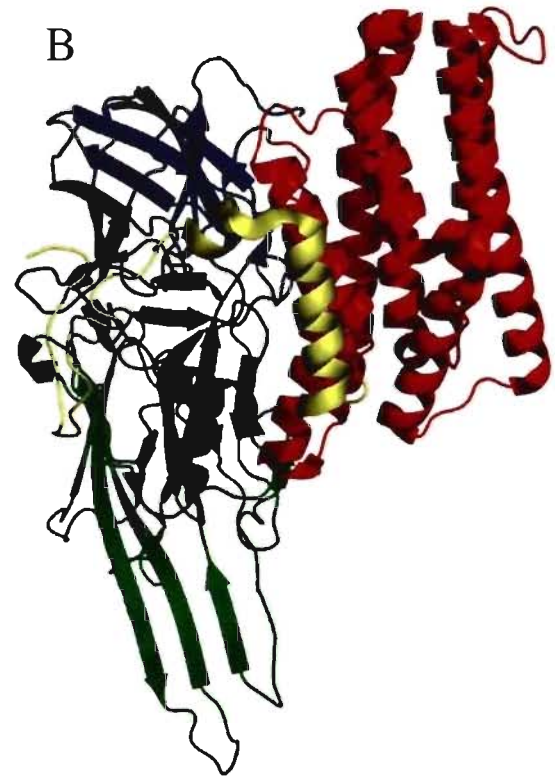
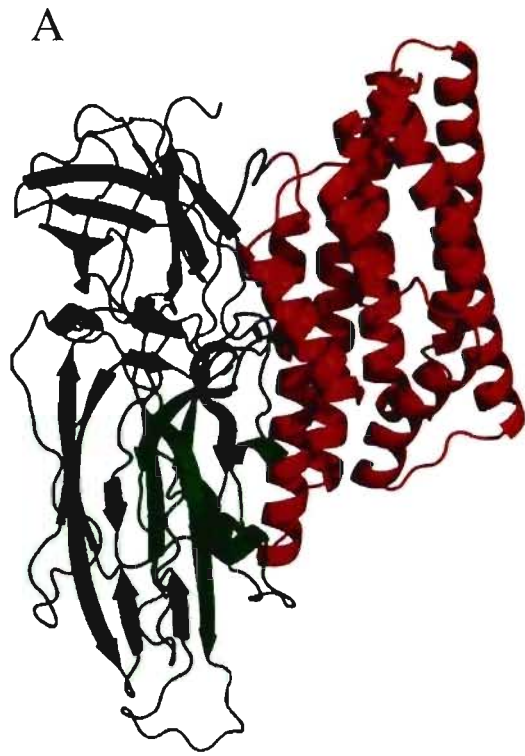


Figure 1. Structure cristalline de diverses protéines Cry.

Les structures de la Cry1Aa (A), de la Cry2Aa (B), de la Cry3A (C) et de la Cry3Bb (D) sont présentées (vue de face). Les domaines I, II et III sont respectivement colorés en rouge, vert et bleu. Un fragment supplémentaire identifié dans la structure de la Cry2Aa, l'hélice $\alpha 0$ est colorée en jaune. Les images ont été produites à l'aide du logiciel PyMOL et des séquences publiées pour la Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), la Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), la Cry3A (Li *et al.*, 1991) et la Cry3Bb (Galitsky *et al.*, 2001). Les numéros PDB de chaque structure sont 1ciy, 1i5p, 1dlc et 1ji6, respectivement (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Le domaine III est composé de deux feuillets antiparallèles qui forment un sandwich β légèrement tordu (Fig. 5). Deux longues boucles qui s'étendent des résidus 489 à 497 et 554 à 565 interagissent avec le domaine I.

Tous les domaines sont étroitement associés, en particulier les domaines I et II. Il existe plusieurs interactions de type Van der Waals et des ponts hydrogène et salins (Fig. 6) entre ces éléments. Deux ponts hydrogène sont présents et cinq molécules d'eau font le pont entre les deux domaines via plusieurs ponts hydrogène. Quatre ponts salins sont aussi présents entre ces domaines (Tableau 1).

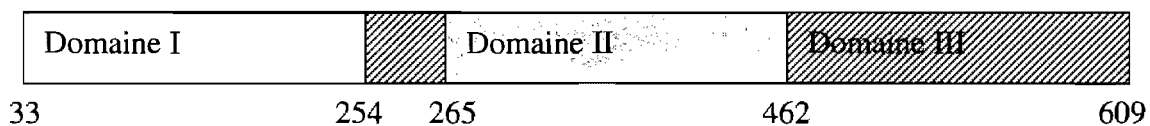


Figure 2. Position de chacun des domaines de la Cry1Aa selon sa structure cristallographique.

Les données proviennent de l'article de Grochulski *et al.* (1995).

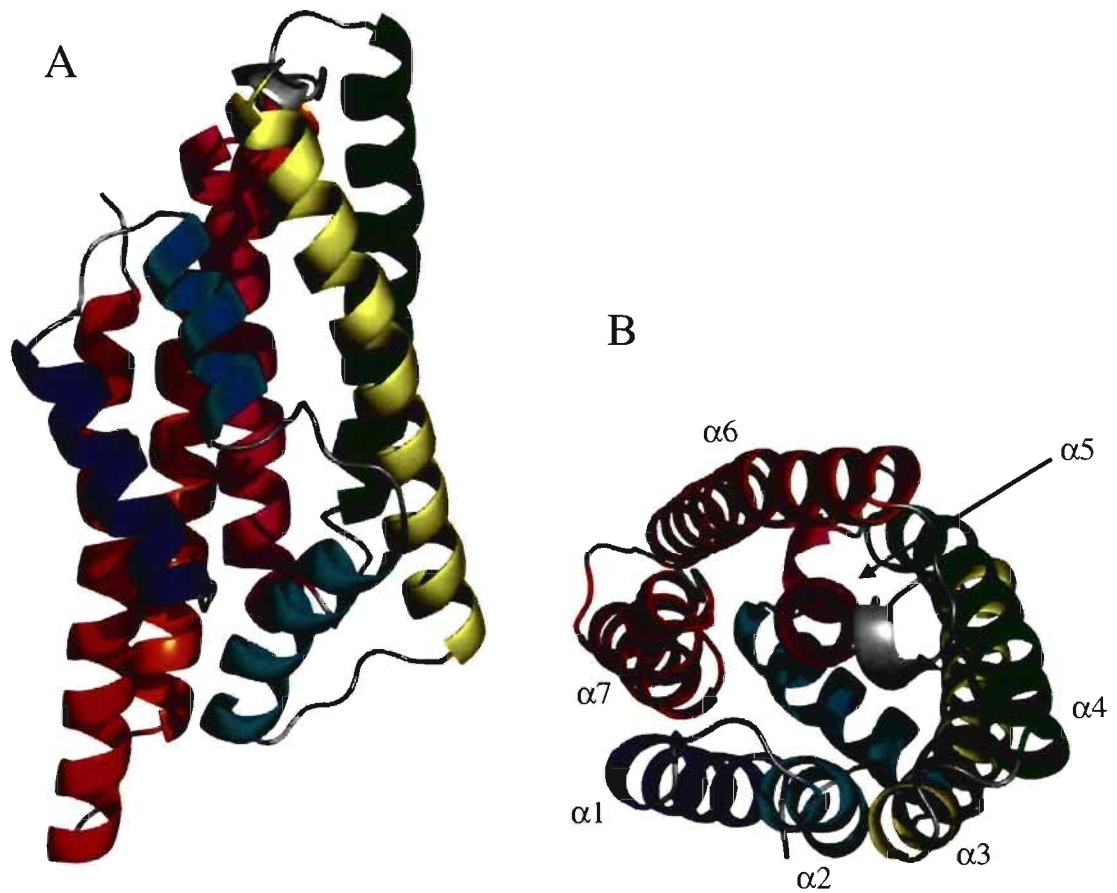


Figure 3. Structure cristalline du domaine I de la Cry1Aa.

Les images, représentant le domaine I vu de face (A) et du dessus (B), ont été obtenues de la même façon que celles de la Figure 1. Les hélices α 1 à 7 sont respectivement colorées en bleu, cyan, jaune, vert, magenta, orange et rouge. Position de chaque hélice : α 1 = 35-47; α 2a = 54-63; α 2b = 71-84; α 3 = 90-119; α 4 = 124-149; α 5 = 157-179; α 6 = 186-218; α 7 = 223-250.

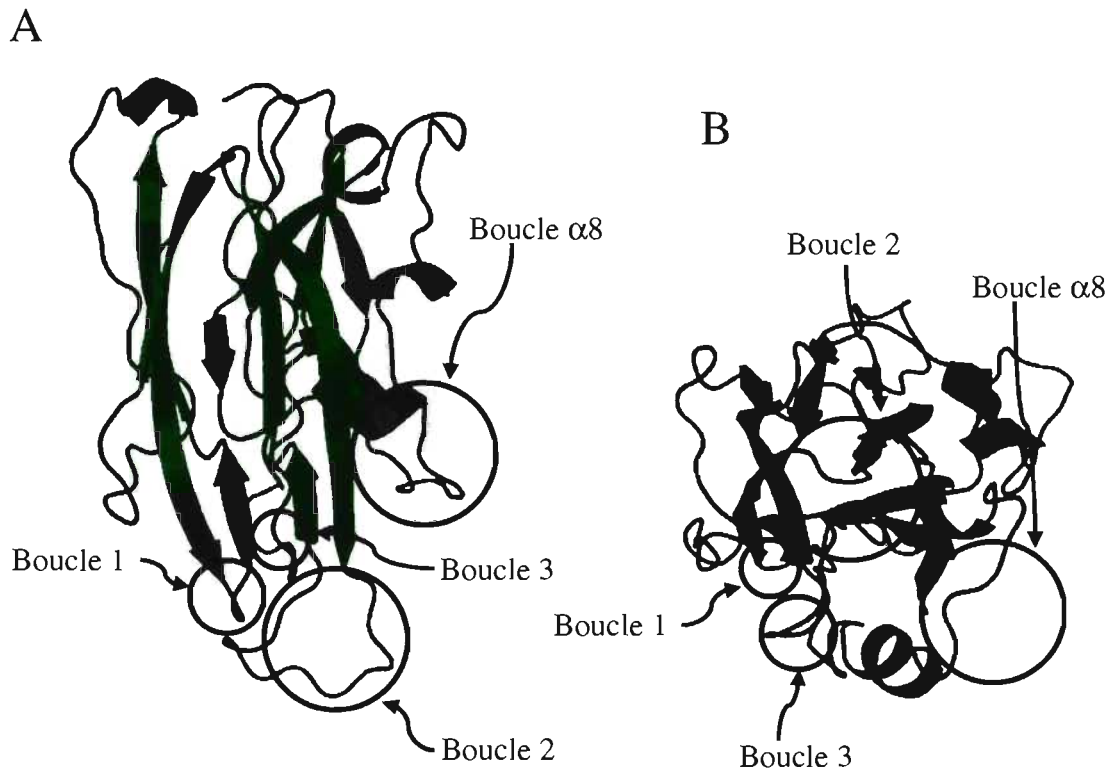


Figure 4. Structure cristalline du domaine II de la Cry1Aa.

Les images, représentant le domaine II vu de face (A) et du dessous (B), ont été obtenues de la même façon que celles de la Figure 1. Les différentes boucles y sont identifiées.

Il existe seulement trois ponts hydrogène et une molécule d'eau pontée qui relie les domaines I et III. Ces interactions se font via les hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$ du domaine I et les deux longues boucles du domaine III mentionnées précédemment. Les principales forces reliant le domaine I et III sont de nature hydrophobe.

Les interactions entre les domaines II et III sont aussi majoritairement de nature hydrophobe. En plus, il existe cinq ponts hydrogène et une molécule d'eau qui lient ces domaines.

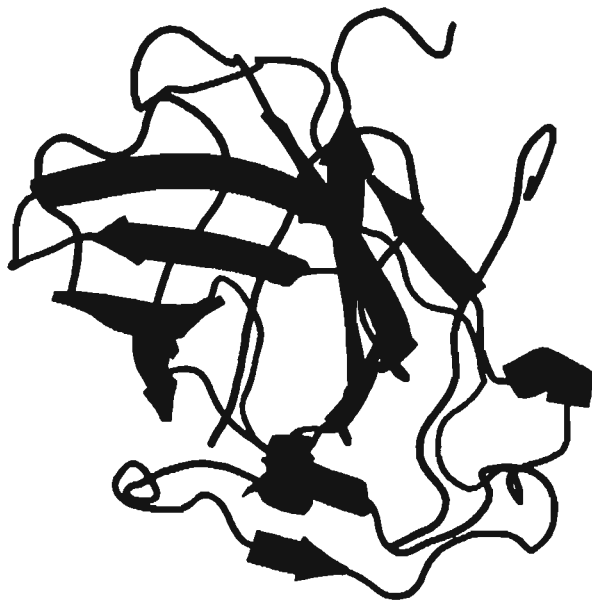


Figure 5. Structure cristalline du domaine III de la Cry1Aa.

L'image, représentant le domaine III vu de face, a été obtenue de la même façon que celles de la Figure 1.

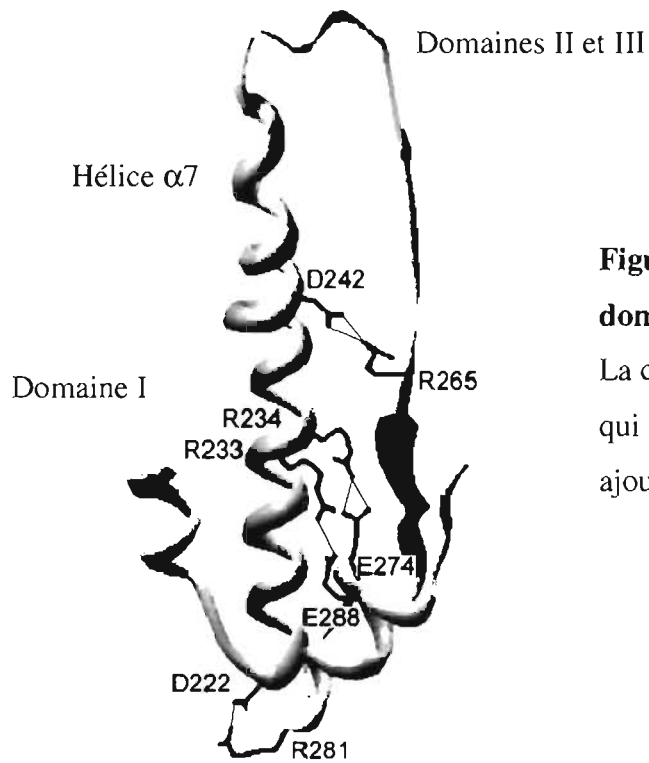


Figure 6. Ponts salins reliant le domaine I et les domaines II et III.

La chaîne latérale des acides aminés qui participent aux ponts salins est ajoutée. Tiré de Coux *et al.* (2001).

Au total, la Cry1Aa possède 16 ponts salins dont 4, mentionnés précédemment, relient les domaines I et II. Tous les autres ponts sont situés à l'intérieur des domaines I et III. Une liste complète des ponts salins est donnée dans le Tableau 1.

Tableau 1. Ponts salins intramoléculaires dans la Cry1Aa

Résidu basique		Résidu acide	
Boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$	Arg87	Glu90	Hélice $\alpha 3$
Hélice $\alpha 3$	Arg93	Asp74	Hélice $\alpha 2b$
		Glu81	Hélice $\alpha 2b$
Hélice $\alpha 3$	Arg115	Glu112	Hélice $\alpha 3$
Hélice $\alpha 6$	Arg192	Asp195	Hélice $\alpha 6$
Hélice $\alpha 6$	Arg198		
Hélice $\alpha 7$	Arg233	Glu288	Hélice $\alpha 8b$
Hélice $\alpha 7$	Arg234	Glu274	Hélice $\alpha 8a$
Boucle $\beta 1a$ - $\beta 1b$	Arg265	Asp242	Hélice $\alpha 7$
Boucle $\alpha 8a$ - $\alpha 8b$	Arg281	Asp222	Boucle $\alpha 6$ - $\alpha 7$
Boucle $\alpha 8b$ - $\beta 2$	Arg292	Asp298	Feuillet $\beta 2$
Feuillet $\beta 6$	Arg359	Asp409	Feuillet $\beta 9$
Boucle $\beta 6$ - $\beta 7r$	Arg368	Glu379	Feuillet $\beta 7r$
Feuillet $\beta 17$	Arg525	Glu602	Feuillet $\beta 23$
Feuillet $\beta 23$	Arg600		
Feuillet $\beta 17$	Arg527	Asp599	Feuillet $\beta 23$

(Grochulski *et al.*, 1995)

Les structures des toxines Cry établies à ce jour sont très semblables. Il existe cependant certaines différences, mais elles sont souvent mineures dans le cas des domaines I et III. Les divergences majeures sont observées dans le domaine II et principalement dans les boucles situées à la base de ce domaine. La position et la

longueur des boucles $\alpha 8$, 1, 2 et 3 varient considérablement en fonction des toxines. Puisque ces boucles sont responsables de la fixation sur les récepteurs (voir section 1.2.1.), ces variations structurelles entre les toxines peuvent expliquer les différences de toxicité observées.

Parmi toutes les toxines Cry, il existe 5 blocs dans la séquence des acides aminés qui sont fortement conservés (Höfte et Whiteley, 1989). La présence de tels blocs d'acides aminés conservés dans une protéine indique généralement que ces résidus sont importants pour son fonctionnement. Le premier de ces blocs englobe l'hélice $\alpha 5$ (acides aminés 153 à 183). Or, cette hélice joue un rôle important dans la formation des pores (voir section 1.3.1.). La deuxième région inclut la portion C-terminale de l'hélice $\alpha 6$, toute l'hélice $\alpha 7$ et le brin $\beta 1$ (203 à 270) qui comme il a été mentionné auparavant contribuent aux interactions entre les domaines I et II. Trois des quatre ponts salins entre les domaines I et II sont situés dans cette région. La troisième région conservée comprend le dernier brin du domaine II ($\beta 11$) et le segment N-terminal du domaine III (452 à 500). Ce dernier segment fait partie de l'interface entre les domaines I et III. Le quatrième bloc correspond au brin $\beta 17$ (521 à 531) qui est composé de plusieurs arginines dont deux font partie de ponts salins. Le dernier bloc (596 à 608) correspond au segment C-terminal du domaine III de la protéine (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995).

1.1.3. Physiologie intestinale de *Manduca sexta*

Manduca sexta, un lépidoptère, est l'un des insectes dont l'intestin a le plus été étudié. Il est largement utilisé pour l'étude du fonctionnement de toxines Cry. Son intestin est divisé en trois segments distincts : antérieur, moyen et postérieur (Cioffi, 1979). La cible des toxines Cry, telle qu'identifiée par localisation immunocytochimique (Bravo *et al.*, 1992a, b; Chen *et al.*, 2005), est la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen. La paroi de l'intestin moyen est composée de deux groupes de cellules : les cellules en gobelet et les cellules en colonne (Cioffi, 1979). Les cellules en gobelet contiennent une cavité qui communique avec la lumière

de l'intestin moyen par une valve. Les cellules en colonne possèdent une forme allongée semblable à celle des cellules intestinales des mammifères. Comme dans celles-ci, leur membrane apicale est repliée de façon à former des microvillosités. L'intestin moyen, tout comme les cellules qui le composent, ont une morphologie qui varie d'une région à l'autre.

L'intestin des larves de lépidoptères est un tissu très actif dans le transport membranaire. Il possède une pompe à potassium électrogène qui est fortement active et responsable d'une bonne partie du transport effectué au niveau de la membrane apicale de l'intestin moyen. Ce tissu génère un potentiel élevé atteignant des valeurs supérieures à 150 mV et un courant de l'ordre de 1 mAcm^{-2} (Dow, 1992).

Les larves de ces insectes possèdent un système de transport remarquable qui alcalinise le milieu intestinal (Gringorten, 2001). Le pH intestinal des insectes peut atteindre des valeurs allant de 10 à 12 (Dow, 1984; Gringorten *et al.*, 1993) selon les espèces contrairement à des valeurs d'environ 5 à 7 pour le petit intestin de l'être humain. La présence d'un milieu alcalin chez l'insecte est d'ailleurs nécessaire à la solubilisation de la plupart des toxines Cry.

1.1.4. Solubilisation et activation des toxines Cry

Après avoir été ingérées par des larves d'insectes sensibles, la plupart des protéines Cry doivent être solubilisées dans l'intestin. La solubilisation des cristaux protéiques est importante pour l'action des toxines Cry, et la faible solubilité de cristaux provenant de certaines souches de *B. thuringiensis* est responsable de leur faible toxicité (Aronson *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1994). Après avoir été solubilisées, la plupart des protoxines doivent être digérées par des protéases intestinales pour former des toxines actives (Tojo et Aizawa, 1983). Une modification de l'activation des toxines est d'ailleurs un mécanisme documenté de résistance des insectes (McGaughey et Whalon, 1992; Oppert *et al.*, 1994). La majorité des protéases intestinales des lépidoptères ont une activité qui est similaire à celle de la trypsine ou de la chymotrypsine (Terra et Ferreira, 1994). Les protoxines des protéines Cry ont des tailles différentes. Les protoxines des Cry1A ont

une taille de 130 à 135 kDa. Les protéases intestinales digèrent la partie C-terminale de la protéine, jusqu'à l'acide aminé K623 dans le cas de la Cry1Ac (Bietlot *et al.*, 1989). Elle est coupée par segments d'environ 10 kDa (Choma *et al.*, 1991). Le segment C-terminal de la protoxine n'est donc pas nécessaire pour l'activité de la toxine, mais joue un rôle dans sa cristallisation. Une petite partie du segment N-terminal (jusqu'à l'acide aminé R28 pour les Cry1A) est aussi digérée par les protéases (Nagamatsu *et al.*, 1984). Le produit de cette digestion est une toxine de 55 à 65 kDa qui est résistante à la digestion (Chestukhina *et al.*, 1982; Choma *et al.*, 1990). Une digestion subséquente du segment N-terminal, suite à la fixation de la toxine sur un récepteur, pourrait cependant être nécessaire à l'action de la toxine (Gómez *et al.*, 2002b).

1.1.5. Fixation des toxines Cry sur les récepteurs

La toxine active se fixe spécifiquement sur des récepteurs situés à la surface de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen des larves d'insectes (Bravo *et al.*, 1992b; Denolf *et al.*, 1993; Estada et Ferré, 1994). La fixation de la toxine se fait en deux étapes incluant une fixation réversible (Hofmann *et al.*, 1988a, b) et une fixation irréversible (Ihara *et al.*, 1993; Rajamohan *et al.*, 1995). Il est en général accepté que la fixation irréversible correspond à l'insertion de la toxine dans la membrane (Ihara *et al.*, 1993; Rajamohan *et al.*, 1995), mais elle pourrait aussi être en partie due à une fixation accrue de la toxine sur son récepteur (Masson *et al.*, 1995). Les domaines II et III participent à la fixation (de Maagd *et al.*, 1996b; Flores *et al.*, 1997). Plus particulièrement, les boucles situées à l'extrémité du domaine II semblent jouer un rôle primordial (voir section 1.2.1.).

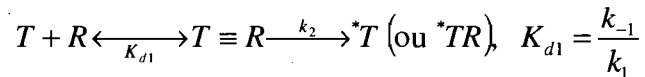
Plusieurs récepteurs ont été identifiés chez une variété d'insectes (Pigott et Ellar, 2007). Les principaux récepteurs font partie de deux familles de protéines : les aminopeptidases N et les cadhérines. Plusieurs isoformes de l'aminopeptidase N pourraient agir comme récepteurs chez une variété d'insectes : *M. sexta* (Knight *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996; Denolf *et al.*, 1997), *Bombyx mori* (Yaoi *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998a, b, c), *Spodoptera littoralis* (Sanchis et Ellar, 1993), *Plutella xylostella* (Denolf *et*

al., 1997; Luo *et al.*, 1997b; Chang *et al.*, 1999), *Heliothis virescens* (Gill *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997a; Oltean *et al.*, 1999), *Lymantria dispar* (Valaitis *et al.*, 1995; Garner *et al.*, 1999), et *Anopheles quadrimaculatus* (Abdullah *et al.*, 2006). Plusieurs récepteurs potentiels de type cadhérine ont aussi été identifiés chez *M. sexta*, *H. virescens*, *Ostrinia nubilalis* et *B. mori* (Vadlamudi *et al.*, 1993, 1995; Ihara *et al.*, 1998; Nagamatsu *et al.*, 1998; Gahan *et al.*, 2001; Flannagan *et al.*, 2005). L'expression du gène codant pour l'aminopeptidase N de 120 kDa de *M. sexta* chez la drosophile confère à la Cry1Ac une toxicité contre cet insecte et démontre que cette enzyme agit comme récepteur de cette toxine (Gill et Ellar, 2002). L'introduction du gène codant pour la cadhérine dans des cellules Sf9 ou des cellules COS-7 rend ces cellules sensibles à l'action de la Cry1Aa (Nagamatsu *et al.*, 1999; Dorsch *et al.*, 2002). D'autres expériences réalisées avec différentes cultures cellulaires transgéniques démontrent que les toxines Cry1A se fixent sur un récepteur de type cadhérine de *M. sexta* (Keeton et Bulla, 1997). Chez les lépidoptères, les protéines de type cadhérine sont surtout situées sur la membrane apicale des cellules en colonne de l'intestin moyen tandis que, chez les mammifères, les cadhérines jouent un rôle important dans les jonctions cellulaires et sont donc situées dans les régions de contacts intercellulaires. La fixation des toxines Cry sur les récepteurs de type cadhérine introduits dans les cellules embryonnaires rénales humaines pourrait donc nuire à la jonction cellulaire en empêchant ces récepteurs de réaliser cette jonction (Aimanova *et al.*, 2006).

D'autres récepteurs ont aussi été identifiés. Récemment, la fixation de la Cry1Ac sur une phosphatase alcaline a été mise en évidence chez *H. virescens* (Jurat-Fuentes et Adang, 2004). Certains glycolipides agissent comme récepteurs des protéines Cry. La fixation sur les glycolipides semble s'effectuer via le groupement tétrasaccharidique N-acétylgalactosamine β 1-4 N-acétylglucosamine β 1-3 mannose β 1-4 glucose qui se retrouve uniquement dans certains glycolipides caractéristiques des insectes et des nématodes (Griffitts *et al.*, 2005).

D'autres toxines produites par *B. thuringiensis* pourraient aussi agir comme récepteurs des protéines Cry. C'est ainsi que Pérez *et al.* (2005) ont émis l'hypothèse que la toxine Cyt1Aa agirait comme récepteur de la Cry11Aa. Ils ont d'ailleurs mis en évidence une interaction entre ces deux protéines.

L'utilisation de vésicules de la membrane à bordure en brosse provenant de l'intestin moyen de divers insectes et de toxines marquées radioactivement ou chimiquement permet une étude approfondie des propriétés de fixation des toxines Cry. Entre autres, elle permet de déterminer les constantes d'affinité et de dissociation des toxines Cry pour les récepteurs (Liang *et al.*, 1995). Le mécanisme de fixation des toxines Cry est décrit par l'équation suivante :



où T est une toxine Cry, R , un récepteur, $T \equiv R$, un complexe récepteur-toxine fixé de manière réversible, *T , une toxine fixée de manière irréversible sur la membrane sans être fixée sur le récepteur, *TR , une toxine fixée de manière irréversible, mais qui est toujours associée au récepteur, K_{d1} , la constante de dissociation, k_1 , la constante de vitesse d'association et k_{-1} , la constante de vitesse de dissociation (Liang *et al.*, 1995). D'autres mécanismes plus complexes tenant compte de la partition de la protéine dans la membrane et de l'oligomérisation de la toxine ont aussi été suggérés (Schwartz et Laprade, 2000). Puisque ce système possède une composante irréversible, un état stationnaire ne peut être atteint. Ainsi, les expériences de fixation ou de compétition ne peuvent pas donner des valeurs réelles de K_{d1} (Liang *et al.*, 1995). Les valeurs obtenues peuvent aussi varier selon la technique utilisée (Herrero et Ferré, 2001). Les conditions utilisées dans certaines techniques peuvent cependant empêcher la fixation irréversible de la toxine. L'une de ces techniques mesure la fixation en temps réel de la toxine à une aminopeptidase N liée de façon covalente à une surface d'or recouverte d'une couche de dextran carboxy-méthylé, par l'analyse de la résonance des plasmons de surface (Masson *et al.*, 1995). Les résultats obtenus avec cette technique montrent que la Cry1Ac a une affinité pour l'aminopeptidase N de 120 kDa de *M. sexta* qui est deux fois plus importante que celle de la Cry1Aa et de la Cry1Ab (Masson *et al.*, 1995). La Cry1Ac est aussi la seule toxine dont la fixation est inhibée par l'ajout de N-acétylgalactosamine, d'acide sialique, de concanavaline A ou de l'agglutinine de soya (Estela *et al.*, 2004). Le galactose inhibe la fixation de la Cry5B sur les glycolipides (Griffitts *et al.*, 2005). Jenkins *et al.* (2000) ont proposé un modèle bivalent de fixation séquentielle sur l'aminopeptidase N pour la Cry1Ac dans lequel le domaine III de la

toxine se fixe en premier. Cette étape est suivie par la fixation du domaine II. La fixation du domaine III serait inhibée par le N-acétylgalactosamine. Plusieurs études démontrent que ce composé interagit avec le domaine III de la Cry1Ac et plus spécifiquement avec les résidus 509 à 513, 545 et 546 (Burton *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000; Derbyshire *et al.*, 2001). La fixation de la Cry1Ac sur l'aminopeptidase N se ferait d'ailleurs via le N-acétylgalactosamine présent sur le récepteur (Knight *et al.*, 2004). Bien que la fixation soit importante pour l'activité des toxines, elle ne semble pas être toujours directement reliée à leur toxicité (Garczynski *et al.*, 1991; Sanchis et Ellar, 1993; Jenkins *et al.*, 1999).

1.1.6. Formation de pores

La fixation de la toxine sur les récepteurs déclenche une série d'événements qui mènent à la formation de pores. Les protéines Cry subissent un changement de conformation qui leur permet de s'insérer dans la membrane et de former des oligomères. L'ordre dans lequel les étapes d'insertion et d'oligomérisation se succèdent n'est toujours pas connu, mais certaines études suggèrent que l'oligomère se forme avant l'insertion de la protéine (Guihard *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2002b). L'oligomérisation est aussi la première étape dans l'insertion de plusieurs autres toxines bactériennes formatrices de pores (Lacy et Stevens, 1998).

Il existe deux principaux modèles décrivant l'insertion de la toxine dans la membrane : le modèle en parapluie et le modèle en canif (Knowles, 1994) (Fig. 7). Dans le modèle en canif, après la fixation de la toxine sur le récepteur, les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ se déploient telle la lame d'un canif et s'insèrent dans la membrane (Fig. 7B). Puisque l'hélice $\alpha 6$ est plus hydrophile que l'hélice $\alpha 5$, elle serait celle qui tapisse la lumière du pore. Dans le cas du modèle en parapluie, ce sont les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ qui s'insèrent dans la membrane et le reste des hélices se déploient sur la surface de la membrane de façon similaire à la toile d'un parapluie (Fig. 7A). Dans ce modèle, c'est l'hélice $\alpha 4$ qui tapisse la lumière du pore. Un autre modèle a été proposé, dans lequel ce sont les domaines II et III qui forment la structure interne du pore (Loseva *et al.*, 2001).

Les données actuelles obtenues avec des peptides synthétiques favorisent fortement le modèle en parapluie (Gazit et Shai, 1993, 1995; Cummings *et al.*, 1994; Gazit *et al.*, 1994, 1998; Gerber et Shai, 2000). De plus, les mutations des résidus de l'hélice $\alpha 4$ et $\alpha 5$ sont celles qui ont le plus d'effet sur l'insertion et l'oligomérisation de la toxine, et sur les propriétés des pores (voir section 1.3.1.). Une fois insérée dans la membrane, la toxine demeure insensible aux protéases (Wolfersberger *et al.*, 1986; Aronson, 2000; Tomimoto *et al.*, 2006).

La lyse des cellules intestinales des insectes par les toxines Cry est généralement considérée comme étant le produit de la formation de grands pores peu sélectifs, laissant passer une variété d'ions et de molécules de taille relativement importante (Knowles et Ellar, 1987; Carroll et Ellar, 1993, 1997; Villalon *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2001; Kirouac *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002, 2004). Selon une estimation obtenue à partir de résultats d'expériences réalisées avec des bicouches lipidiques, le rayon des pores se situe entre 1,0 et 1,3 nm (Peyronnet *et al.*, 2002). En général, les pores sont considérés comme étant plutôt sélectifs pour les cations (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Lorence *et al.*, 1995; Kirouac *et al.*, 2002).

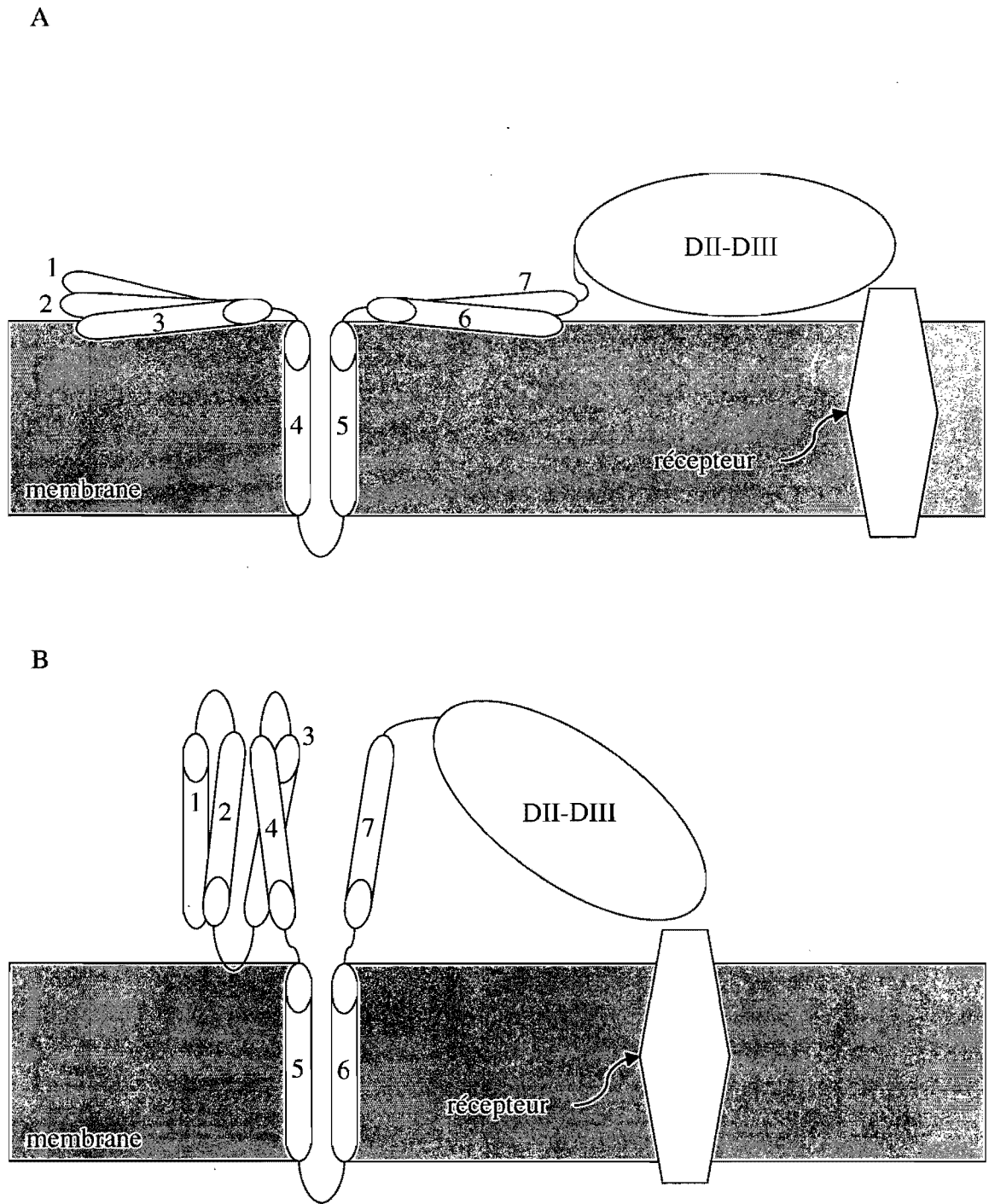


Figure 7. Modèles d'insertion des toxines Cry.

Les modèles d'insertion en parapluie (A) et en canif (B). Chacune des hélices du domaine I est identifiée par son numéro. Les domaines II et III sont identifiés par DII-DIII.

1.2. Rôle des domaines II et III

La spécificité et la fixation des toxines Cry sur les récepteurs sont principalement attribuées aux domaines II et III. Un polypeptide comprenant uniquement les domaines II et III de la Cry1Ab peut se fixer sur les récepteurs (Flores *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2001). Des études effectuées avec des protéines hybrides démontrent l'importance des domaines II et III dans la spécificité et la fixation des toxines de *B. thuringiensis* (Nakamura *et al.*, 1990; Widner et Whiteley, 1990; Lee *et al.*, 1995; de Maagd *et al.*, 1999b, 2003; Avisar *et al.*, 2004; Karlova *et al.*, 2005). La construction de protéines chimériques composées des domaines de différentes toxines Cry permet aussi de mettre en évidence le rôle des domaines II et III.

Plusieurs toxines très apparentées génétiquement possèdent des spectres de toxicité très différents. C'est le cas des toxines Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac, et des toxines Cry2Aa et Cry2Ab. Des chimères ont donc été construites avec les toxines Cry1Aa et Cry1Ab (Nakamura *et al.*, 1990; Schnepf *et al.*, 1990; Masson *et al.*, 1994), Cry1Aa et Cry1Ac (Ge *et al.*, 1989, 1991; Schnepf *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992; Masson *et al.*, 1994), et Cry2Aa et Cry2Ab (Widner et Whiteley, 1990) afin d'identifier les régions de ces toxines qui leur confèrent leur spécificité. Des essais de toxicité avec des protéines chimériques sur des cellules de *Choristoneura fumiferana* (CF-1), pour lesquelles la Cry1Ac est toxique contrairement à la Cry1Aa, démontrent que la région de spécificité pour ces cellules est située entre les acides aminés 258 à 358 du domaine II et 450 à 510 du domaine III (Masson *et al.*, 1994). Un examen attentif des séquences des toxines Cry1Aa et Cry1Ac permet de redélimiter la première région aux acides aminés 283 à 358 puisqu'il s'agit de la région la plus divergente de ces molécules. Cette région du domaine II inclut les boucles 1 et 2 mais pas les boucles 3 et $\alpha 8$. La deuxième région, incluant les résidues 450 à 510, englobe le troisième bloc d'acides aminés conservés (voir section 1.1.2.). Une autre étude effectuée avec des chimères de ces deux mêmes protéines indique que la région de spécificité de la Cry1Ac pour *H. virescens* (la Cry1Aa est 30 fois moins toxique que la Cry1Ac pour cette insecte) est située dans la région comprenant les acides aminés 335 à 612 (Schnepf *et al.*, 1990; Ge *et al.*, 1991). La région 332 à 450 est cependant suffisante pour assurer la spécificité de la Cry1Aa envers

les larves de *B. mori* (Ge *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992). Cette région semble aussi être responsable de la spécificité de la Cry1Ac pour *Trichoplusia ni* (Ge *et al.*, 1991).

La Cry1C est très toxique pour les larves de *S. exigua*, *Mamestra brassicae*, *P. xylostella* et pour les cultures cellulaires de *S. frugiperda* (Sf9), mais la Cry1E est totalement inactive contre chacun de ces insectes. La protéine chimérique EEC (nommée en fonction des domaines dont elle est constituée) possédant les domaines I et II de la Cry1E et le domaine III de la Cry1C est aussi toxique que la Cry1C pour *S. exigua* et *M. brassicae* (Bosch *et al.*, 1994) mais inactive contre *P. xylostella* (Ballester *et al.*, 1999) et les cellules Sf9 (Rang *et al.*, 1999). La CCE, la chimère inverse de la EEC, est toxique pour *P. xylostella* (Ballester *et al.*, 1999) et les cellules Sf9 (Rang *et al.*, 1999) et non toxique pour *S. exigua* et *M. brassicae* (Bosch *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que la spécificité de la Cry1C pour *S. exigua* et *M. brassicae* est attribuable au domaine III de la Cry1C et la spécificité pour *P. xylostella* et les cellules Sf9 est attribuable au domaine II (puisque le domaine I ne semble pas influencer la fixation). Pourtant, dans tous les cas, le domaine II semble être responsable de la fixation de la toxine. En effet, la fixation de la Cry1C, marquée avec la biotine, sur des vésicules de la membrane à bordure en brosse de *S. exigua* peut être inhibée par l'addition de la chimère CCE, mais pas par la Cry1E ou la EEC, tandis que la fixation de la chimère EEC marquée peut être inhibée par l'addition de Cry1E (Bosch *et al.*, 1994). De manière similaire, la fixation de la Cry1C, marquée avec de l'iode radioactif, sur des vésicules de *P. xylostella* peut être inhibée par l'addition de CCE (Ballester *et al.*, 1999). La chimère AbAbC est toxique pour *S. exigua* (de Maagd *et al.*, 1996a) et *P. xylostella* (Ballester *et al.*, 1999). Ses propriétés de fixation (de Maagd *et al.*, 1996a; Ballester *et al.*, 1999) sont similaires à celles de la EEC. Les propriétés de la chimère CCAb sont aussi similaires à celles de la CCE (de Maagd *et al.*, 1999a, 2000; Rang *et al.*, 1999). Des expériences de fixation sur des vésicules de *S. exigua* et de *M. sexta* démontrent que la Cry1Ab se fixe sur une protéine de 205 kDa mais plus faiblement sur une protéine de 140 kDa chez *S. exigua*, et sur une protéine de 210 kDa mais plus faiblement sur une protéine d'environ 250 kDa chez *M. sexta* (de Maagd *et al.*, 1996b). La Cry1Ac se fixe fortement à une protéine de 120 kDa et plus faiblement à deux autres protéines (140 et 250 kDa) chez *S. exigua* et fortement sur une protéine de 120 kDa mais faiblement sur la

même protéine de 210 kDa que la Cry1Ab chez *M. sexta*. Aucune fixation n'est observable pour la Cry1C chez ces deux insectes. Plusieurs chimères construites à partir de différents domaines des toxines Cry1Ab, Cry1Ac et Cry1C présentent des capacités de fixation qui varient en fonction des domaines qui les composent. Ces résultats confirment que les domaines II et III sont importants pour la fixation sur les récepteurs et suggèrent que ces deux domaines doivent être présents pour que la toxine se fixe sur certains récepteurs. La chimère CCAb peut se fixer sur la protéine de 205 kDa de *S. exigua* mais ne se fixe que faiblement sur celle de 140 kDa, alors que la AbAbC ne semble pas se fixer sur ni l'une ou l'autre de ces protéines (de Maagd *et al.*, 1996b). La présence des domaines II et III de la Cry1Ab pourrait être nécessaire pour la fixation sur la protéine de 140 kDa. La CCAb se fixe aussi uniquement sur la protéine de 250 kDa de *M. sexta* alors que la AbAbC se fixe uniquement sur la protéine de 210 kDa. La présence des domaines II et III de la Cry1Ab dans la CAbAb permet à la toxine de se fixer sur ces deux récepteurs. La fixation des chimères CCAb et CAbAb sur la protéine de 250 kDa de *M. sexta* est beaucoup plus forte que celle de la Cry1Ab. Il est donc possible que le domaine I puisse influencer l'interaction de la toxine avec les récepteurs. Certaines constructions chimériques peuvent aussi avoir une influence sur la stabilité et la production de la toxine en plus de modifier la forme des cristaux parasporaux (Rang *et al.*, 2001).

1.2.1. Interaction des toxines Cry avec les récepteurs

1.2.1.1. Boucle $\alpha 8$ du domaine II

Peu d'études ont été effectuées sur la boucle $\alpha 8$ qui contribue à plusieurs interactions entre les domaines I et II. L'un des deux acides aminés formant chacun des quatre ponts salins entre les domaines I et II est situé dans ou près de la boucle $\alpha 8$ (Tableau 1). En général, les mutations modifiant la boucle $\alpha 8$ de la Cry1Ac n'ont pas d'effet sur l'activité de cette toxine à l'exception des mutations R281A et R289A (Jenkins *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). La mutation de l'une ou l'autre de ces arginines entraîne une perte substantielle de toxicité pour *L. dispar* et *M. sexta* (Lee *et al.*, 2001). Cette perte

de toxicité est causée par une baisse dans la capacité de la Cry1Ac de se fixer sur la membrane intestinale de ces insectes (Jenkins *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001).

Deux acides aminés (A282 et L283) de la Cry1Ab9-033 ont été remplacés respectivement par une glycine et une sérine, les acides aminés correspondants à ces positions de la Cry1Ab2 (qui est 10 fois plus toxique que la Cry1Ab9-033 pour *L. dispar*), ce qui donne à ce mutant une toxicité similaire à celle de la Cry1Ab2. La fixation de ce mutant sur des vésicules de *L. dispar* est aussi semblable à celle de la Cry1Ab2. Ces deux acides aminés pourraient donc contribuer à la fixation de la toxine sur les récepteurs et à sa spécificité (Lee *et al.*, 1996). De plus, un peptide synthétique correspondant à la boucle $\alpha 8$ de la Cry1Ab peut se fixer faiblement sur des vésicules de *M. sexta* et sur des récepteurs de type cadhérine (Gómez *et al.*, 2003), et un peptide correspondant à la boucle $\alpha 8$ de la Cry11Aa inhibe la fixation de celle-ci sur des vésicules de *Aedes aegypti* (Fernandez *et al.*, 2005). Ces résultats démontrent que cette boucle joue un rôle dans la fixation de certaines toxines sur les récepteurs.

1.2.1.2. Boucle 1 du domaine II

La boucle 1 du domaine II est très semblable dans les protéines Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac. Cette boucle ne semble cependant pas être très importante pour leur fixation. La mutation d'acides aminés dans cette région a peu d'effet sur leur activité (Kwak *et al.*, 1995; Smedley et Ellar, 1996). De plus, des peptides synthétiques correspondant à la boucle 1 des protéines Cry1Aa et Cry1Ab ne se fixent pas sur les récepteurs connus de ces toxines (Gómez *et al.*, 2002a).

La Cry1C est normalement très active contre les cellules Sf9 et contre les larves de *A. aegypti*, un diptère, ce qui est surprenant puisque les toxines Cry de classe 1 sont généralement uniquement toxiques pour les lépidoptères (Smith et Ellar, 1994). La mutation aléatoire de quatre acides aminés de la boucle 1 entraîne une diminution de la toxicité de plusieurs mutants pour les cellules Sf9 et pour *A. aegypti*. Certains mutants demeurent efficaces contre les larves de *A. aegypti*, mais ne le sont plus contre les cellules Sf9 ou vice versa, ce qui démontre que cette région est responsable de la spécificité de la toxine pour ces insectes.

Dans la Cry3A, la boucle 1 est beaucoup plus longue que dans la Cry1Aa. Elle semble jouer un rôle beaucoup plus important dans l'activité de la Cry3A que dans celle des autres toxines mentionnées précédemment. L'un des mutants de cette boucle (N353A/D354A) est totalement inactif contre les larves de *Tenebrio molitor* et substantiellement moins efficace que la protéine mère contre les larves de *Leptinotarsa decemlineata* (Wu et Dean, 1996; Wu *et al.*, 2000). La perte de toxicité pour *T. molitor* s'accompagne d'une perte de la capacité de la toxine à se fixer sur la membrane intestinale de cet insecte (Wu et Dean, 1996). La mutation ponctuelle de l'un ou l'autre de ces deux acides aminés n'a cependant aucun effet sur la toxicité (Wu *et al.*, 2000). Les mutants A1 (R345A/Y350F/Y351F) et A2 (R345A/ Δ Y350/ Δ Y351) sont légèrement plus toxiques pour *L. decemlineata* que la Cry3A non modifiée, mais significativement plus toxiques pour *T. molitor* (Wu *et al.*, 2000). Les mutations aux positions Y350 et Y351, incluant la substitution des deux résidus par une phénylalanine et la délétion de ces deux acides aminés, génèrent des protéines qui sont sensibles à la protéolyse. Ces mutations semblent avoir pour effet d'exposer un site de protéolyse à la position R345 qui n'est normalement pas accessible dans la protéine mère. La substitution du résidu R345 par une alanine dans les mutants A1 et A2 élimine ce site de protéolyse. L'activité de la protéine est plus élevée lorsque les deux tyrosines sont remplacées par des phénylalanines (A1) que lorsqu'elles sont retirées de la protéine (A2). Il est fort probable que la présence de résidus aromatiques à ces positions facilite l'action de la toxine. Plusieurs études démontrent l'importance des résidus aromatiques dans l'interaction des protéines avec la membrane plasmique et ces résidus sont souvent situés à l'interface entre le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique et le milieu aqueux (White et Wimley, 1999). Les mutants A1 et A2 se fixent sur les récepteurs avec la même affinité que la toxine mère, mais la fixation irréversible du mutant A1 est beaucoup plus élevée (Wu *et al.*, 2000), possiblement à cause d'une interaction plus forte entre les phénylalanines du mutant A1 et la membrane comparativement à celle des tyrosines normalement présentes.

Des mutations dans la boucle 1 de la Cry4Ba abolissent la toxicité de cette protéine pour les larves de *Anopheles quadrimaculatus* et de *A. aegypti* (Abdullah *et al.*, 2003). De plus, la substitution de plusieurs acides aminés des boucles 1 et 2 de la Cry19Aa par

leur équivalent de la Cry4Ba augmente considérablement sa toxicité pour *A. aegypti* (Abdullah et Dean, 2004).

1.2.1.3. Boucle 2 du domaine II

La boucle 2 est la plus longue des boucles du domaine II dans les toxines Cry1A. Elle est aussi plus longue que son équivalent dans la Cry3A. La mutation de tous les acides aminés entre les positions 365 et 371 (Fig. 8) de la Cry1Aa en alanine ou la délétion de ces acides aminés produisent des toxines qui sont complètement inactives contre *B. mori* et qui ne peuvent plus se fixer sur des vésicules provenant de cet insecte (Lu *et al.*, 1994). De plus, le retrait ou la mutation en alanine de plusieurs blocs d'acides aminés (contenant 4 à 6 acides aminés) précédant ou suivant la boucle 2 produisent des protéines qui sont instables (Lu *et al.*, 1994). Les mutations F371A et R368A/R369A dans la Cry1Aa abolissent aussi la toxicité de cette protéine pour *M. sexta* (Daniel *et al.*, 2001). Celles-ci causent une forte diminution de la capacité de la Cry1Aa à perméabiliser des vésicules provenant de l'intestin moyen de *M. sexta*. Plusieurs autres mutations remplaçant les acides aminés R368 et R369 de la Cry1Ab et de la Cry1Ac réduisent considérablement la toxicité de ces protéines pour *L. dispar* et *M. sexta* (Lee *et al.*, 2000), *S. litura* (Nakamura *et al.*, 1992), et pour *Pectinophora gossypiella* et *Helicoverpa zea* (Karim et Dean, 2000). Ces mutants sont aussi moins efficaces dans la formation de pores (Karim et Dean, 2000). Cette baisse d'activité s'accompagne souvent d'une diminution de la capacité de la toxine à se fixer sur son récepteur (Karim et Dean, 2000; Lee *et al.*, 2000). Le seul mutant qui conserve la même activité que la Cry1Ab est celui dans lequel on a introduit la mutation conservatrice des arginines aux positions 368 et 369 en lysines (Karim et Dean, 2000; Lee *et al.*, 2000). La mutation de la phénylalanine à la position 371 de la Cry1Ab en divers acides aminés réduit la toxicité de la Cry1Ab pour *M. sexta* et sa capacité à former des pores (Rajamohan *et al.*, 1996a). La diminution de l'activité de ces mutants n'est cependant pas due à une réduction du niveau de fixation réversible mais plutôt à une réduction du niveau de fixation irréversible. La seule mutation qui n'influence pas la fixation irréversible est celle qui remplace la phénylalanine par un autre résidu aromatique, le tryptophane. La substitution de la phénylalanine par un autre acide aminé aromatique, la tyrosine,

entraîne une légère perte d'activité (Rajamohan *et al.*, 1996a). Comme il a été mentionné précédemment, les résidus aromatiques influencent souvent l'interaction des protéines avec la membrane, ce qui pourrait expliquer l'effet des mutations de cet acide aminé sur le niveau de toxine fixée de manière irréversible (White et Wimley, 1999). Les résultats obtenus à l'aide de plusieurs mutants suggèrent que la boucle 2 est celle qui a le plus d'influence sur la fixation des toxines de type Cry1A. De plus, des peptides synthétiques correspondant à la boucle 2 de la Cry1Aa et de la Cry1Ab ont, comparativement à ceux qui correspondent aux autres boucles, l'affinité la plus élevée pour le récepteur de type cadhérine (Gómez *et al.*, 2002a, 2003).

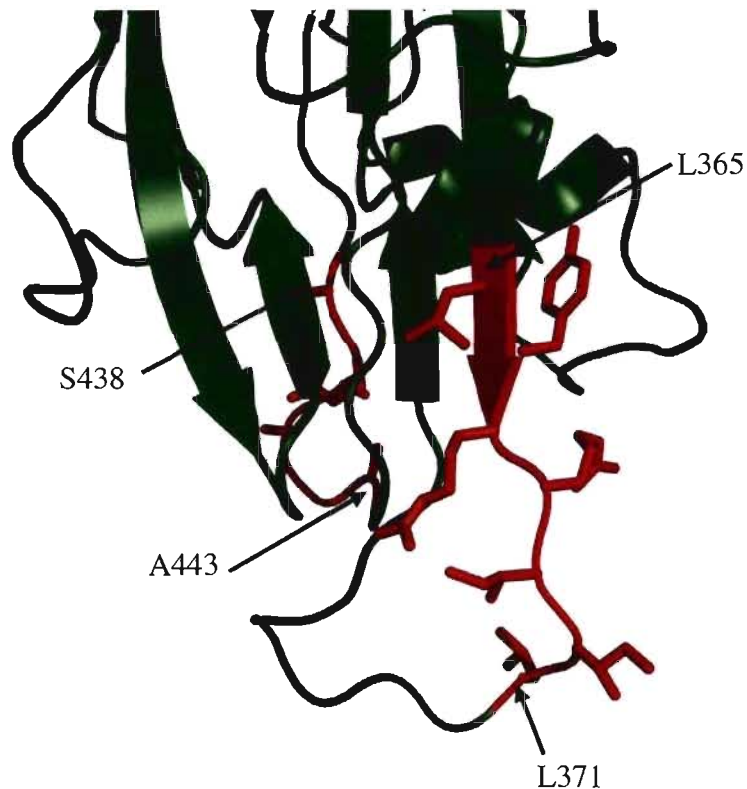


Figure 8. Résidus clés du domaine II de la Cry1Aa.

Tous les résidus du domaine II (vu de face) jouant un rôle dans la fixation de la toxine sont colorés en rouge et leur chaîne latérale est affichée.

La mutation aléatoire de quatre acides aminés dans la boucle 2 de la Cry1C entraîne des pertes substantielles d'activité contre les cellules Sf9 et les larves de *A. aegypti* (Smith et Ellar, 1994). Des 32 mutants créés, seulement trois conservent la même activité que la Cry1C et la plupart des autres sont totalement inactifs. Certaines mutations produisent des protéines qui demeurent efficaces uniquement contre les cellules Sf9. Pour tous les mutants testés, la perte de toxicité est attribuable à une baisse de la capacité de la toxine à se fixer sur des vésicules de *A. aegypti* ou de *S. littoralis* (Abdul-Rauf et Ellar, 1999). La boucle 2 de la Cry1C semble donc aussi importante que celle des Cry1A pour son activité.

1.2.1.4. Boucle 3 du domaine II

La troisième boucle du domaine II des toxines Cry1A est celle qui est la plus différente entre la Cry1Aa et la Cry1Ab (la boucle de la Cry1Ac est identique à celle de la Cry1Ab). Plusieurs mutations ponctuelles remplaçant l'un ou l'autre des acides aminés 438 à 443 (Fig. 8) de la boucle 3 de la Cry1Ab par une alanine entraînent une perte significative de la toxicité pour les larves de *M. sexta* et de *H. virescens* (Rajamohan *et al.*, 1996b). Cet effet est plus marqué pour les mutants G439A et F440A qui sont les seuls de ce groupe à posséder une capacité réduite à former des pores dans les intestins de *M. sexta* et *H. virescens*. L'activité réduite de ces mutants s'explique par leur capacité réduite à se fixer de manière irréversible (Rajamohan *et al.*, 1996b). Comme il a déjà été mentionné, pour les protéines membranaires, les résidus aromatiques sont présents en grand nombre au niveau de la frontière entre le cœur hydrophobe de la membrane et le milieu aqueux et aident ainsi à les ancrer dans la membrane. Il est donc fort probable que la phénylalanine à la position 440 participe à la fixation irréversible de la protéine. La substitution de la glycine par une alanine à la position 439 pourrait influencer indirectement la phénylalanine adjacente en modifiant la flexibilité de la chaîne polypeptidique. D'autres mutations portant sur la même série d'acides aminés de la boucle 3 dans la Cry1Ac ont en général plus d'effet sur la toxicité pour *M. sexta* et *L. dispar* et sur la fixation sur les récepteurs que celles qui modifient la boucle 3 de la Cry1Ab, mais aucune donnée n'est disponible sur la fixation irréversible (Smedley et Ellar, 1996; Jenkins *et al.*, 2000). G439A et F440A, comme les mutations

équivalentes dans la Cry1Ab, sont celles qui ont le plus d'effet sur l'activité de la Cry1Ac. Le remplacement de la phénylalanine par un autre résidu aromatique, la tyrosine, n'a cependant aucun effet, ce qui appuie l'hypothèse de l'importance des résidus aromatiques dans la fixation irréversible. Les peptides correspondant à la boucle 3 de la Cry1Aa et de la Cry1Ab possèdent des propriétés différentes. Celui de la Cry1Aa se fixe sur un récepteur de type cadhérine de *M. sexta*, mais celui de la Cry1Ab ne s'y fixe pas (Gómez *et al.*, 2002a). La séquence des acides aminés dans ces deux boucles est très différente, ce qui pourrait expliquer cette différence. Il est aussi possible que les conditions dénaturantes utilisées pour étudier la fixation de ces peptides influencent les résultats. La dénaturation des toxines peut en effet exposer des sites de fixation qui sont normalement cachés (Daniel *et al.*, 2002).

Les acides aminés de la boucle 3 de la Cry1C étudiés par mutagenèse sont importants pour la fixation et la spécificité de cette toxine. Les mutants Q436E, Q436K, R437I, R437K et S438Y conservent la même activité que la Cry1C contre *A. aegypti*, mais sont moins toxiques pour les larves de *S. littoralis* (Abdul-Rauf et Ellar, 1999). En corrélation avec cette baisse de toxicité, ces mutants se fixent sur des vésicules provenant de *S. littoralis* avec une affinité réduite. Les mutants S438F et G439A sont cependant totalement inactifs contre ces deux insectes.

La boucle 3 de la Cry3A ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'action de la toxine. La mutation simultanée de tous les acides aminés situés entre les positions 481 et 486 en alanine réduit seulement faiblement la toxicité pour *L. decemlineata*, mais augmente légèrement la toxicité pour *T. molitor* (Wu et Dean, 1996). Les autres mutations portant sur les acides aminés de cette boucle n'ont pas d'effet sur l'activité de cette toxine (Wu et Dean, 1996).

La boucle 3 des toxines Cry4 semble être très importante pour la spécificité de ce groupe de toxines. La Cry4Ba est très efficace contre les larves de *A. quadrimaculatus* et de *A. aegypti*, mais totalement inactive contre celles de *Culex quinquefasciatus* et de *Culex pipiens*. La Cry4Aa est par contre légèrement efficace contre *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* et *C. pipiens* (aucune donnée n'est disponible pour *A. quadrimaculatus*). L'introduction de certains acides aminés, normalement présents dans la boucle 3 de la Cry4Aa à leurs positions équivalentes dans la Cry4Ba confère à celle-ci

une toxicité appréciable contre les larves de *C. pipiens* et de *C. quinquefasciatus* (Abdullah *et al.*, 2003). De plus, la mutation de certains acides aminés de la boucle 3 de la Cry4Ba par une alanine diminue sa toxicité pour *A. aegypti* (Tuntitippawan *et al.*, 2005).

1.2.1.5. Domaine III

Plusieurs mutations introduites dans le domaine III de la Cry1Ac n'ont en général aucun effet sur la fixation des protéines sur des vésicules de la membrane à bordure en brosse de *M. sexta* (Burton *et al.*, 1999). Cependant, les mutants simples N506D, Q509E, Q509S et Y513A, le mutant double N506D/Q509E, et le mutant triple N506D/Q509E/Y513A se fixent beaucoup moins efficacement que la Cry1Ac sur les vésicules ou sur l'aminopeptidase N. Les mutants double et triple sont ceux dont l'affinité pour les récepteurs est la plus réduite. Il est possible que le mutant triple ne soit plus en mesure de se fixer sur l'aminopeptidase N, mais il pourrait toujours se fixer sur le récepteur de type cadhérine. Tous ces mutants peuvent perméabiliser les vésicules de *M. sexta* dans les expériences de gonflement osmotique, mais ils sont moins efficaces que la protéine mère (Burton *et al.*, 1999). De plus, la N-acétylgalactosamine et le mutant triple entraînent une réduction similaire de la fixation de la Cry1Ac. L'ajout de N-acétylgalactosamine avec le mutant triple dans les expériences de gonflement osmotique n'a aucun effet sur l'activité de ce mutant (Burton *et al.*, 1999). Il est donc fort probable que les acides aminés 506, 509 et 513 contribuent à la fixation de la toxine sur l'aminopeptidase N. D'autres mutations aux positions 509 et 511 influencent aussi la fixation de la toxine sur les récepteurs (Jenkins *et al.*, 1999, 2000; Lee *et al.*, 1999) en plus de réduire la toxicité de la protéine pour *L. dispar* (Lee *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000), et pour *M. sexta* et *H. virescens* (Lee *et al.*, 1999). Certaines mutations des résidus S503 et S504 réduisent aussi la toxicité de la protéine pour *M. sexta* et *H. virescens* et la fixation de la toxine sur les vésicules de *M. sexta* (Aronson *et al.*, 1995).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux contre la Cry1Aa qui inhibent la fixation de cette toxine sur l'aminopeptidase N démontre que le domaine III interagit avec l'aminopeptidase N. Ces résultats suggèrent que ce site d'interaction est composé des acides aminés ⁵⁰⁸STLRVN⁵¹³ et ⁵⁸²VFTLSAH⁵⁸⁹ (Atsumi *et al.*, 2005) (Fig. 9). Le

premier de ces blocs d'acides aminés correspond à une région de la Cry1Ac qui contribue possiblement elle aussi à la fixation de la toxine sur l'aminopeptidase N, tel que mentionné précédemment.

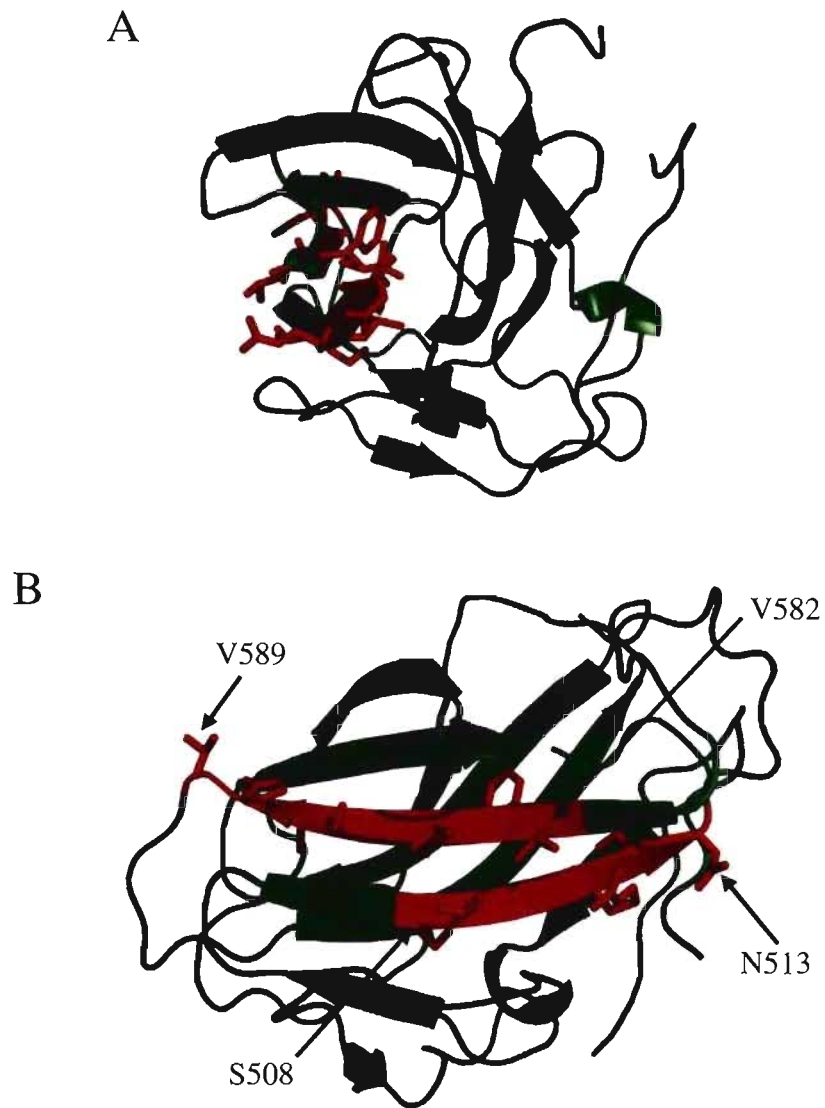


Figure 9. Résidus clés du domaine III de la Cry1Aa.

Tous les résidus du domaine III (vu de face (A) et de côté (B)) jouant un rôle dans la fixation de la toxine sur l'aminopeptidase N sont colorés en rouge et leur chaîne latérale est affichée.

1.2.2. Fonction des autres éléments des domaines II et III

Le quatrième bloc d'acides aminés hautement conservés, situé dans le domaine III, possède quatre arginines dont deux participent à des ponts salins. Dans la Cry1Aa, plusieurs mutations différentes des acides aminés R523, R525 et R527 produisent des protéines qui ne peuvent pas être synthétisées ou qui sont sensibles à la trypsine ou aux protéases intestinales (Chen *et al.*, 1993). D'autres mutations portant sur ces arginines ne semblent pas avoir d'effet sur la fixation, mais plutôt sur la formation des pores ou sur leurs propriétés (Chen *et al.*, 1993; Wolfersberger *et al.*, 1996). Ainsi, la conductance des pores formés par les mutants R521E, R521K, R521Q et R527K mesurée en bicouches lipidiques est significativement plus faible que celle des pores formés par la Cry1Aa (Schwartz *et al.*, 1997b).

Les arginines de la Cry1Ac semblent aussi importantes pour sa toxicité. La mutation de R525, R529 ou R531 entraîne une perte de toxicité pour *P. xylostella* et les cellules CF-1 (Masson *et al.*, 2002). Certains mutants testés dans des bicouches lipidiques présentent une capacité réduite de s'intégrer dans la membrane ou des cinétiques d'ouverture différentes (Masson *et al.*, 2002).

Plusieurs mutations dans le cinquième bloc d'acides aminés conservés dans la Cry4A n'ont pas ou très peu d'effet sur la toxicité de la protéine pour les larves de *Culex pipiens pallens* (Nishimoto *et al.*, 1994). Certains de ces mutants sont cependant moins stables thermiquement et plus sensibles à la digestion que la protéine mère (Nishimoto *et al.*, 1994). Le cinquième bloc semble donc être important pour la stabilité de la protéine et pour la protection de la protéine contre la protéolyse. Peu d'études ont été effectuées sur le rôle du troisième bloc d'acides aminés conservés. La mutation de quelques acides aminés de ce bloc dans la Cry1E ne semble pas modifier les propriétés de la protéine (de Maagd *et al.*, 1999b).

1.3. Rôle du domaine I

Les fonctions attribuées au domaine I comprennent l'oligomérisation de la toxine, son insertion dans la membrane et la formation des pores. Des polypeptides correspondant au domaine I de différentes toxines ont été utilisés pour mettre en évidence les propriétés formatrices de pore de ce domaine (Walters *et al.*, 1993; Von Tersch *et al.*, 1994; Schwartz et Laprade, 2000). Les cinq premières hélices du domaine I de la Cry4B peuvent aussi former des pores dans des liposomes et des bicouches lipidiques (Puntheeranurak *et al.*, 2001, 2004). De plus, une multitude de mutations portant sur des résidus du domaine I démontrent l'importance de ce domaine dans l'insertion et l'oligomérisation de la toxine, et dans la formation des pores (Dean *et al.*, 1996; Li, 1996; Rajamohan *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998; Aronson et Shai, 2001). Ces mutations permettent aussi d'identifier le rôle des différentes composantes du domaine I.

1.3.1. Rôle des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$

Selon le modèle d'insertion en parapluie, l'hélice $\alpha 4$ tapisse la lumière du pore. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études génétiques et biophysiques. Cette hélice joue aussi un rôle essentiel dans la formation des pores. Des expériences effectuées avec des peptides synthétiques correspondant à l'hélice $\alpha 4$ de la Cry3A et de la Cry1Ac démontrent qu'ils interagissent avec la membrane et s'orientent perpendiculairement à sa surface (Gazit *et al.*, 1998; Gerber et Shai, 2000). De plus, ces peptides augmentent, bien que faiblement, la perméabilité de vésicules composées de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine pour la calcéine (Gerber et Shai, 2000). Des mesures de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) démontrent que les peptides correspondant à l'hélice $\alpha 4$ de la Cry3A interagissent fortement entre eux et avec des peptides correspondant aux hélices $\alpha 5$ et $\alpha 7$ (Gazit *et al.*, 1998). L'interaction avec l'hélice $\alpha 5$ a aussi été démontrée pour le peptide correspondant à l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Ac et quelques mutants de ce peptide (Gerber et Shai, 2000). Ces expériences

appuient fortement l'hypothèse de l'insertion de l'hélice $\alpha 4$ dans la membrane selon le modèle en parapluie. Les peptides correspondant à l'hélice $\alpha 5$ de la Cry1Ac et de la Cry3A peuvent aussi s'associer avec des membranes artificielles (Gazit et Shai, 1993; Gazit *et al.*, 1998; Gerber et Shai, 2000). Mais, contrairement à ce qu'on observe avec les peptides correspondant à l'hélice $\alpha 4$, l'association du peptide correspondant à l'hélice $\alpha 5$ se fait de manière coopérative, ce qui indique qu'il forme des agrégats dans la membrane. De plus, le peptide correspondant à l'hélice $\alpha 5$ de la Cry3A s'oriente perpendiculairement à la surface de la membrane (Gazit *et al.*, 1998). Il est même toxique pour les cellules Sf9 (Gazit *et al.*, 1994). La formation de pores par les peptides correspondant à l'hélice $\alpha 5$ de la Cry1Ac et de la Cry3A a aussi été mise en évidence à plusieurs reprises (Gazit et Shai, 1993; Cummings *et al.*, 1994; Gazit *et al.*, 1994; Gerber et Shai, 2000). La formation de pores par un peptide synthétique correspondant aux hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de la Cry1Ac, en plus de la boucle qui les relie, est beaucoup plus efficace que celle qui est due aux peptides individuels même lorsqu'ils sont utilisés ensemble (Gerber et Shai, 2000). Un autre peptide similaire constitué des hélices correspondantes de la Cry4B est aussi très efficace dans la formation de pores (Leetachewa *et al.*, 2006).

Un double mutant cystéine a été créé afin de restreindre les mouvements intramoléculaires entre les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ par la formation d'un pont disulfure entre ces régions. Sa capacité à former des pores a été testée dans des bicouches lipidiques artificielles. À l'état oxydé, ce mutant n'a aucune activité formatrice de pores, mais en présence d'un agent réducteur (le β -mercaptoéthanol), le bris du pont disulfure permet la formation de pores. La restriction des mouvements de l'hélice $\alpha 5$ par la création d'un autre pont disulfure entre cette hélice et l'hélice $\alpha 6$, ou entre l'hélice $\alpha 5$ et la boucle reliant les domaines I et II, empêche également la formation de pores. L'addition de β -mercaptoéthanol brise ces ponts disulfure et restaure l'activité de la toxine. Un autre mutant contenant un pont disulfure reliant entre elles les boucles $\alpha 2$ - $\alpha 3$ et $\alpha 4$ - $\alpha 5$ possède des caractéristiques similaires. Les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ semblent donc contribuer aux changements de conformation menant à la formation de pores, en accord avec le modèle d'insertion en parapluie (Schwartz *et al.*, 1997a; Schwartz et Masson, 2000).

Certains de ces mêmes mutants ont été étudiés quelques années plus tard par un autre groupe (Alzate *et al.*, 2006). Trois des quatre mutants sont toujours actifs bien que leurs activités *in vitro* et *in vivo* soient réduites relativement à celle de la Cry1Aa, et l'ajout de β -mercaptoéthanol n'a soit aucun ou très peu d'effet sur leur activité. Le quatrième mutant de ce groupe est inactif, mais fort probablement en raison des mutations elles-mêmes puisque la mutation individuelle de l'un ou l'autre des résidus formant ce pont empêche également la formation de pores. Les résultats de ces deux groupes de recherche se contredisent de façon évidente. Certains facteurs peuvent néanmoins influencer les résultats de ces deux études. Entre autres, la quantité de protéines mutées dont le pont disulfure a bel et bien été formé doit être prise en considération lors de l'analyse des résultats. L'oxydation des groupements thiols des cystéines sous forme d'acides sulfénique, sulfinique ou sulfonique peut aussi empêcher la formation de ponts disulfure et a déjà été observée pour certains mutants cystéine de la Cry1Aa (Lebel, 2003).

Les résultats obtenus à l'aide de nombreuses mutations modifiant l'hélice $\alpha 4$ dans différentes toxines Cry appuient les hypothèses formulées sur l'importance de cette hélice dans la formation des pores. Deux études se sont attardées aux acides aminés chargés de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa (Masson *et al.*, 1999; Vachon *et al.*, 2004). La plupart des mutants ainsi créés sont substantiellement moins toxiques que la Cry1Aa pour *P. xylostella* (Masson *et al.*, 1999) et *M. sexta* (Vachon *et al.*, 2004). La formation de pores, mesurée dans des expériences de gonflement osmotique, est également fortement réduite pour la plupart de ces mutants (Vachon *et al.*, 2004). De plus, l'introduction d'un acide aspartique aux positions 142 et 143 entraîne une perte totale d'activité. L'augmentation du pH de 7.5 à 10.5 provoque une réduction de l'activité pour tous les mutants dont la mutation porte sur le résidu R131 excepté R131H et une augmentation de l'activité pour les mutants E128C et D136C. Cette augmentation correspond à la restauration de la charge négative (lorsque les expériences sont effectuées à pH 10.5) qui est normalement présente sur les résidus modifiés, mais cette restauration de la charge n'est pas suffisante pour rétablir une activité semblable à celle de la Cry1Aa (Vachon *et al.*, 2004).

Les mutants N135Q de la Cry1Ab et de la Cry1Ac ne forment pas de pores. Des expériences de gonflement osmotique dans lesquelles ces mutants sont mis en compétition avec la Cry1Ac ont démontré que le mutant N135Q de la Cry1Ac se fixe sur les récepteurs (Cooper *et al.*, 1998). Cette mutation dans la Cry1Ab n'altère pas la fixation de la toxine sur les récepteurs (Tigue *et al.*, 2001), mais pour la Cry1Ac elle diminue le niveau de fixation irréversible de la toxine (Cooper *et al.*, 1998; Tigue *et al.*, 2001). Dans les deux cas, la mutation inhibe la formation d'oligomères (Tigue *et al.*, 2001). Manoj Kumar et Aronson (1999) ont aussi produit plusieurs mutants dans l'hélice α_4 de la Cry1Ac. L'examen des mutants avec une activité réduite montre que ces toxines se fixent sur des vésicules de la membrane à bordure en brosse de *M. sexta* et donc sur leurs récepteurs, mais la formation de pores mesurée dans des expériences de gonflement osmotique est très faible. Tous ces mutants forment des oligomères de 130 et 200 kDa (Manoj Kumar et Aronson, 1999). Le faible taux de formation de pores pourrait donc s'expliquer par la capacité réduite de la toxine à s'insérer dans la membrane.

Plusieurs mutations des acides aminés de l'hélice α_5 de la Cry1Ac altèrent sa toxicité (Wu et Aronson, 1992). Toutes les toxines résultant de ces mutations peuvent se fixer aussi bien que la Cry1Ac sur des vésicules de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen de *M. sexta*, mais elles sont beaucoup moins efficaces à les perméabiliser. Une étude approfondie de quelques mutants inactifs (A164D, A164P et L167F) démontre que ces mutations empêchent la formation d'oligomères et probablement l'insertion de la toxine dans la membrane (Aronson *et al.*, 1999).

Puisque l'hélice α_5 fait partie d'un bloc d'acides aminés hautement conservés dans les toxines Cry, il n'est pas surprenant que des mutations dans cette région modifient l'activité de la toxine. La substitution des résidus les plus conservés de l'hélice α_5 de la Cry1Ab (Y161, H168 et R173), individuellement ou plusieurs à la fois, par divers acides aminés entraîne généralement une perte substantielle de toxicité (Soberón *et al.*, 2000; Nuñez-Valdez *et al.*, 2001). Ces mutations ne semblent cependant pas altérer la capacité de la toxine à se fixer sur les récepteurs (Meza *et al.*, 1996; Soberón *et al.*, 2000; Nuñez-Valdez *et al.*, 2001), et le mutant H168F est le seul à posséder une capacité réduite de former des pores dans des vésicules de la membrane à bordure en brosse (Soberón *et al.*,

2000; Nuñez-Valdez *et al.*, 2001). Les résultats *in vivo* et *in vitro* ne semblent donc pas concorder. La validité de l'analyse des résultats *in vitro* obtenus à l'aide de la technique de fluorescence utilisée par ce groupe a été remise en question récemment, entre autres parce que ces auteurs ne tiennent pas compte de la sensibilité de la sonde fluorescente à la force ionique qui varie de façon importante dans leurs expériences (Kirouac *et al.*, 2003).

L'introduction d'une proline dans l'hélice $\alpha 5$ de la Cry1Aa (Ahmad et Ellar, 1990) et de la Cry4B (Sramala *et al.*, 2000) entraîne une perte importante de toxicité. Dans le cas de la Cry4B, la substitution de certains résidus de l'hélice $\alpha 5$ pour une proline entraîne une perte de solubilité de la toxine (Sramala *et al.*, 2000) tandis que, pour la Cry1Aa, la perte d'activité semble être attribuable à une diminution de l'insertion ou de l'oligomérisation de la toxine puisque ses mutants se fixent de façon normale sur les récepteurs (Ahmad et Ellar, 1990).

1.3.2. Rôle des boucles inter-hélices

Plusieurs mutations ont été effectuées en substituant une cystéine à un acide aminé situé dans chacune des boucles reliant les hélices de la Cry1Aa afin d'étudier le rôle de ces boucles dans l'activité de la toxine (Lebel *et al.*, 2008). La capacité de chacun de ces mutants à perméabiliser des vésicules de la membrane à bordure en brosse de *M. sexta* a été analysée. À pH 7.5, tous ces mutants, à l'exception de V150C, forment des pores après une période de préincubation, mais à pH 10.5 plusieurs mutants (sauf I88C, T122C et Y153C) ont une activité réduite. Bien que certains mutants soient très actifs après la préincubation, la vitesse à laquelle les pores se forment est significativement réduite aux deux pH pour tous les mutants à l'exception de I88C et T122C. Ces résultats suggèrent que les boucles reliant les hélices contribuent à la formation des pores. Les mutations Y153C (boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$), W182I et G183C (boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$) dans la Cry1Ab (Nuñez-Valdez *et al.*, 2001), ainsi que plusieurs autres portant sur les acides aminés N85, Q86, R87, I88, E89 (boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$) (Wu et Aronson, 1992) et V150 (boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$) (Manoj Kumar et Aronson, 1999) de la Cry1Ac ont cependant peu d'effet sur la

toxicité de ces protéines. Les mutants N123Y, T122I/A125V (boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$) et F184I (boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$) de la Cry1Ab sont même plus toxiques que leur toxine mère (Jellis *et al.*, 1989). Plusieurs mutants modifiant la boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$ de la Cry4B ont une toxicité qui dépend fortement du type de mutation (Kanintronkul *et al.*, 2003). D'autres mutations portant sur le résidu Y153 (boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$) de la Cry1Ab diminuent substantiellement l'activité de la toxine (Chen *et al.*, 1995; Daniel *et al.*, 2001).

La boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$ de la Cry4Aa est plus longue que son équivalent chez la Cry1Aa, la Cry2Aa, Cry3Aa et la Cry3Bb. Elle possède un motif très intéressant, qui est unique chez les protéines Cry, constitué d'un pont disulfure (C192-C199) et d'un groupement riche en prolines ($^{193}\text{PPNP}^{196}$), ce qui lui confère une grande rigidité. Bien que la mutation individuelle d'un de ces deux éléments n'ait pas d'effet majeur sur l'activité de la toxine, la mutation simultanée de plusieurs acides aminés dans ces deux structures, qui nécessairement abolit la rigidité de cette boucle, réduit de manière significative la toxicité pour *A. aegypti*. La fonction de ce motif rigide n'a cependant pas été étudiée en détail (Tapaneeyakorn *et al.*, 2005).

À la lumière de ces résultats, il est clair que les boucles inter-hélices du domaine I jouent un rôle complexe dans la formation des pores. Les étapes de ce processus restent cependant à être précisées.

1.3.3. Fonction des autres éléments du domaine I

Très peu d'études ont été effectuées sur les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$. Un peptide synthétique correspondant à l'hélice $\alpha 1$ de la Cry3A ne s'associe pas avec une membrane artificielle et ne s'y insère pas (Gazit *et al.*, 1998). Ceci n'est pas surprenant puisque cette hélice est plus courte que la longueur moyenne des hélices transmembranaires observées pour une membrane de 30 Å d'épaisseur (White et Wimley, 1999). Contrairement à ce peptide, celui qui correspond à l'hélice $\alpha 2$ de la Cry3A peut s'associer avec des membranes composées de phosphatidylcholine (Gazit *et al.*, 1998). Il s'oriente parallèlement à la surface de la membrane, tel que prédit par le modèle d'insertion en parapluie. Un comportement similaire a été mis en évidence avec

d'autres peptides correspondant aux hélices α_3 , α_6 et α_7 . La création d'un pont disulfure reliant l'hélice α_2 à l'hélice α_3 dans la Cry1Aa n'a aucun effet sur l'activité de la toxine (Schwartz et Masson, 2000). En supposant que ce pont disulfure soit bien formé, il serait peu probable que ces hélices doivent s'éloigner l'une de l'autre lors de la formation des pores.

Certains groupes ont observé une digestion supplémentaire à celle qui est normalement nécessaire à l'activation des toxines Cry. Cette digestion supplémentaire élimine l'hélice α_1 et une partie de l'hélice α_2 de la Cry1Ab (Miranda *et al.*, 2001) ou de la Cry1Ac (Lightwood *et al.*, 2000). Pour chacune de ces toxines, un premier site de clivage est situé dans l'hélice α_{2a} (~60 kDa) et un deuxième entre les hélices α_{2a} et α_{2b} (~58 kDa). Des expériences de fluorescence *in vitro* mesurant la perméabilité de vésicules de la membrane à bordure en brosse de *M. sexta* en présence de différentes formes digérées de la toxine suggèrent que cette digestion supplémentaire facilite la formation des pores par la toxine (Miranda *et al.*, 2001). Cet effet serait plus important lorsque la toxine est coupée au premier site de protéolyse. L'utilisation d'un anticorps monoclonal qui se fixe de manière similaire au récepteur de type cadhérine sur la toxine favorise la digestion supplémentaire de la protéine (coupée entre les acides aminés F50 et V51). Cette nouvelle forme de la protéine semble former des dimères et des tétramères. Elle serait aussi plus active que la forme classique de la toxine (Gómez *et al.*, 2002b). La technique de fluorescence utilisée lors de ces expériences a cependant été critiquée (Kirouac *et al.*, 2003). Sur la base de ces données, un nouveau mécanisme d'action des protéines Cry a été suggéré dans lequel la toxine se fixe sur des récepteurs de type cadhérine, ce qui favorise la digestion de l'hélice α_1 (Gómez *et al.*, 2002b). Cette digestion serait nécessaire à la formation de pré-pores et à l'insertion de la toxine dans la membrane comme dans le cas de plusieurs autres protéines formatrices de pores (Klimpel *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1992; van der Goot *et al.*, 1993; Chiron *et al.*, 1994; Abrami *et al.*, 1998). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases lors de la formation de pores par la Cry1Aa dans des expériences de gonflement osmotique n'empêche pas celle-ci d'agir et remet en question l'hypothèse que la digestion de l'hélice α_1 soit nécessaire à l'action de la toxine (Kirouac *et al.*, 2006).

Une proline est souvent observée entre les hélices $\alpha 2a$ et $\alpha 2b$ dans les toxines Cry. Elle limite fortement la flexibilité de la chaîne polypeptidique et fragmente l'hélice $\alpha 2$ en deux éléments distincts. Cette proline a donc été remplacée par une alanine (P70A) ou par une glycine (P70G) dans la Cry1Ab (Arnold *et al.*, 2001). Elle a aussi été retirée en éliminant les résidus 69 à 71 ($\Delta^{69}GPS^{71}$). Les mutants P70A et $\Delta^{69}GPS^{71}$ sont aussi efficaces contre les larves de *M. sexta* que la toxine parentale, mais le mutant P70G est 2 à 3 fois moins toxique. Le mutant $\Delta^{69}GPS^{71}$ est cependant le seul à posséder la capacité d'inhiber le transport transépithélial de potassium similaire à celle de la toxine mère, les deux autres mutants entraînant une plus faible inhibition. Ces résultats indiquent que la substitution de la proline par un autre acide aminé nuit à la formation des pores fort probablement en éliminant la brisure entre les deux fragments de l'hélice $\alpha 2$.

Une bonne partie des mutations introduites dans l'hélice $\alpha 3$ ont comme objectif d'étudier le rôle du double pont salin entre l'hélice $\alpha 3$ (R93) et l'hélice $\alpha 2b$ (D74 et E81) des toxines Cry1A. Plusieurs mutations ont modifié la séquence protéique avoisinant l'acide aminé R93 dans la Cry1Aa, la Cry1Ab et la Cry1Ac. Le résidu R93 a lui-même été remplacé par 14 acides aminés différents dans la Cry1Ac. Chacune de ces mutations, à l'exception de la mutation conservatrice R93K, a pour effet de réduire considérablement la toxicité de la toxine pour *M. sexta* et *H. virescens* (Wu et Aronson, 1992; Hussain *et al.*, 1996; Aronson *et al.*, 1999). Une analyse plus poussée du mutant inactif R93F démontre que l'altération de cet acide aminé n'empêche pas la toxine d'interagir avec le récepteur mais réduit de 20% la quantité de toxine qui se fixe de manière irréversible sans que la fixation réversible ne soit changée (Hussain *et al.*, 1996; Aronson *et al.*, 1999).

À quelques exceptions près, les mutations modifiant les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 6$ n'ont pas ou peu d'effet sur l'activité des protéines Cry contrairement aux mutations altérant les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ qui contribueraient directement à la formation des pores.

Toute l'hélice $\alpha 7$ est comprise dans le second bloc d'acides aminés conservés dans les toxines Cry. Cette région contribue à la formation de plusieurs ponts salins entre les domaines I et II de la toxine (Tableau 1). Les mutants D222A, R233A, R234A, D242A, R265A et D242A/R265A de la Cry1Aa ont été conçus afin d'empêcher la formation de l'un ou l'autre de ces ponts. Les mutants R265A et D242A/R265A sont sensibles à la

digestion, et tous les autres mutants sont moins toxiques que leur toxine mère pour *M. sexta*, même si dans certains cas les mutants possèdent un taux de formation des pores accru lorsqu'il est mesuré à l'aide d'expériences de gonflement osmotique. Le pont reliant les positions 242 et 265 semble être essentiel pour l'activité de la Cry1Aa puisque le mutant D242A ne forme pas de pores. Le retrait de ces ponts pourrait rendre la toxine sensible à la digestion par le jus intestinal des larves d'insectes et expliquer la baisse de toxicité observée (Coux *et al.*, 2001). Cette hypothèse a été étudiée en évaluant l'activité du mutant R233A par des mesures de potentiel membranaire des cellules épithéliales d'intestins isolés en présence de suc intestinal. Le suc intestinal a cependant très peu d'effet sur l'activité de ce mutant (Fortier *et al.*, 2007). Plusieurs mutations portant sur les acides aminés R233, R234, D242 et R265 de la Cry1Ab rendent la protéine instable (Meza *et al.*, 1996; Alcantara *et al.*, 2001). Des modifications des acides aminés du bloc 2 (dont l'hélice $\alpha 7$ fait partie) de la Cry3A réduisent aussi la stabilité de cette protéine et la formation de cristaux protéiques dans la bactérie (Park et Federici, 2004). Plusieurs autres mutations portant sur des résidus de l'hélice $\alpha 7$ de la Cry1Ab ne contribuant pas aux ponts salins entraînent aussi la perte de l'expression ou l'instabilité de la protéine (Alcantara *et al.*, 2001).

1.4. Présentation des travaux

Les travaux résumés dans cette thèse ont pour but de clarifier le rôle du domaine I, en particulier de son hélice $\alpha 4$ et des boucles inter-hélices dans la formation de pores par les toxines de *B. thuringiensis*. À cette fin, une série de mutations ponctuelles portant sur des résidus du domaine I de la Cry1Aa ont été réalisées. La plupart des acides aminés de l'hélice $\alpha 4$ (Fig. 10) et au moins un acide aminé de chacune des boucles du domaine I (Fig. 11) ont ainsi été remplacés par une cystéine. Au départ, l'hélice $\alpha 4$ et les boucles du domaine I ont été ciblées dans le but de procéder à des études topologiques de la toxine à l'aide d'agents chimiques qui réagissent spécifiquement avec le groupement thiol des cystéines. En déterminant quelles hélices demeurent à la surface de la membrane et lesquelles traversent la membrane, il est possible de distinguer quel

modèle d'insertion s'applique au mode d'action des toxines. Notons que l'interprétation de tels résultats est simplifiée du fait que la Cry1Aa activée ne possède en soi aucun résidu cystéine. De plus, selon le modèle en parapluie, l'hélice $\alpha 4$ s'insère dans la membrane, tapisse le pore et il est aussi fort probable qu'elle soit impliquée dans la formation d'oligomère. Une analyse détaillée de l'activité des mutants modifiant cette hélice peut nous donner de précieux renseignements sur son rôle en plus de vérifier les hypothèses du modèle en parapluie.

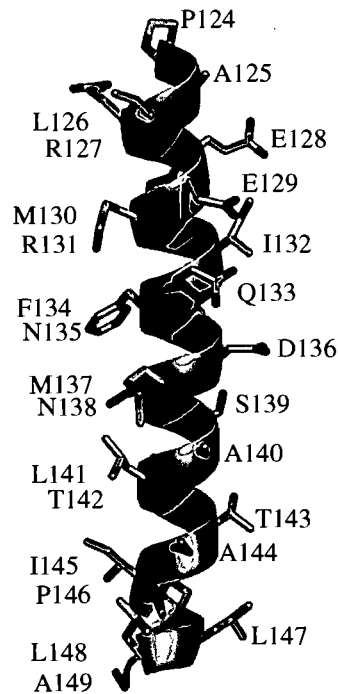


Figure 10. Structure de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa vue de face.

Les chaînes latérales sont colorées en fonction des atomes. Les carbones sont en gris, les oxygènes sont en rouge, les azotes sont en bleu et les soufres sont en jaune. La séquence primaire de l'hélice est aussi présentée. Les acides aminés identifiés en rouge sont ceux pour lesquels la mutation n'a pu être réalisée.

Il était nécessaire, avant toute autre expérience, de caractériser l'activité de base de chacun des mutants. Ceci a été fait à l'aide d'une technique de gonflement osmotique basée sur des mesures de lumière diffusée par des vésicules de la membrane à bordure en brosse de l'intestin moyen de *M. sexta*. Les résultats qui concernent les mutations portant sur les résidus situés dans les boucles du domaine I ont déjà été présentés par Lebel *et al.* (2008), tandis que ceux qui concernent les mutations portant sur les résidus de l'hélice $\alpha 4$ sont présentés dans cette thèse (Chapitre 3) (Vachon *et al.*, 2004; Girard *et al.*, 2008). Les mutations qui altèrent les acides aminés situés du côté hydrophobe n'ont eu que peu ou pas d'effet, tandis que celles qui modifient les acides aminés situés du côté hydrophile de l'hélice $\alpha 4$ ont réduit en général l'activité de la toxine de façon majeure. Il était donc difficile d'effectuer des études topologiques avec ce dernier groupe de mutants puisque leur capacité à former des pores est largement réduite.

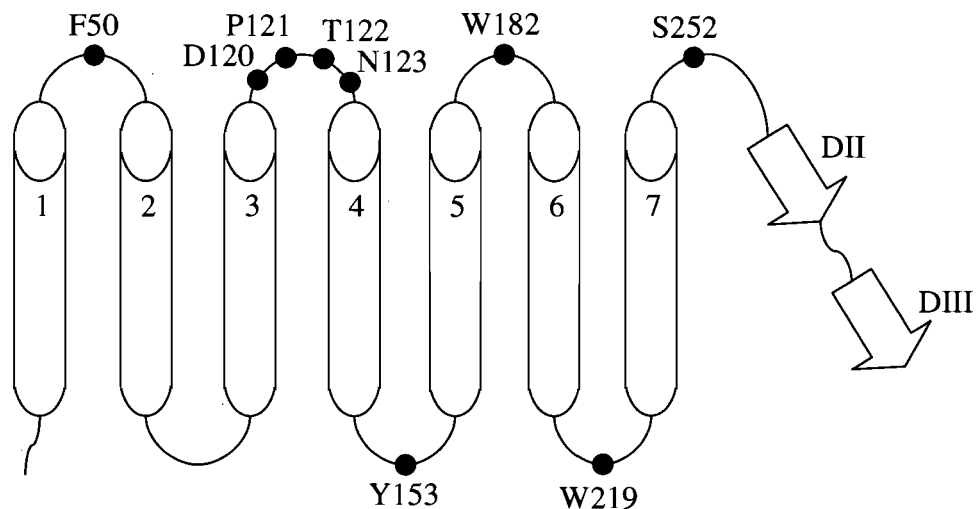


Figure 11. Représentation schématique du domaine I de la Cry1Aa.

Les hélices du domaine I ont été déployées afin d'identifier les acides aminés mutés pour les expériences décrites dans le Chapitre 5. Ceux-ci sont identifiés par un point.

Afin de préciser le rôle de l'hélice $\alpha 4$ dans la formation des pores, nous avons cherché à déterminer les causes de la réduction d'activité de ce groupe de mutants (Chapitre 4). Une analyse de leur structure a donc été effectuée. L'utilisation de protéases aurait pu mettre en évidence une anomalie de la structure des mutants inactifs puisque la Cry1Aa est normalement résistante à la protéolyse. La trypsine et la chymotrypsine ont donc été utilisées afin de vérifier cette hypothèse. Leur structure secondaire a aussi été examinée par dichroïsme circulaire. D'autre part, l'introduction d'une cystéine dans les mutants entraîne la possibilité que celle-ci puisse former un pont disulfure avec une autre cystéine d'un polypeptide présent lors de leur production ou même avec celle d'un autre monomère de toxine. La formation d'un tel pont pourrait nuire de façon significative à la formation des pores. Afin de mettre en évidence la formation d'homo-dimères, un échantillon de chaque mutant a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en absence d'agent réducteur. Il est aussi possible que les mutants forment des dimères avec des molécules autres que la toxine qui ne pourrait être mis en évidence sur gel de polyacrylamide à cause de leur trop petite taille. Si des ponts disulfure nuisent à la formation de pores, l'utilisation d'un agent réducteur pourrait rétablir leur activité. Ainsi, tous les mutants ont été testés dans des expériences de gonflement osmotique réalisées en présence de dithiothréitol. Enfin, la capacité des mutants inactifs de se fixer sur les récepteurs a été évaluée à l'aide d'expériences de compétition entre les mutants et la Cry1Aa. L'utilisation d'un excès de mutants inactifs qui peuvent toujours se fixer sur les récepteurs inhibera alors la formation de pore par la Cry1Aa dans les expériences de gonflement osmotique.

Pour la dernière étape de ce travail, la majorité des mutants pour lesquels la cystéine introduite à la place d'un résidu situé dans l'une ou l'autre des boucles du domaine I ont été modifiés chimiquement (Chapitre 5). Ces expériences ont été effectuées dans le but d'obtenir des informations sur la topologie des pores. L'introduction d'un encombrement stérique, en nuisant aux mouvements de certaines régions de la molécule, peut ainsi permettre d'identifier les régions de la protéine qui s'insèrent dans la membrane. Les mutants choisis pour cette modification avaient une activité formatrice de pores comparable à celle de la Cry1Aa ou légèrement réduite par rapport à celle-ci. Dans un premier temps, une biotine (via un composé méthaneithiosulfonate) a été ajoutée

sur le groupement cystéine et, de façon subséquente, une streptavidine, qui se fixe spécifiquement sur les groupements biotine, a été ajoutée afin d'obtenir un encombrement encore plus important. Les résultats surprenants de la modification du mutant Y153C de la boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$ avec la biotine qui stimule son activité ont entraîné une série de modifications chimiques supplémentaires. Trois autres composés méthane-thiosulfonate qui introduisent une charge négative ou positive, ou un groupement aromatique ont aussi été utilisés pour modifier ce mutant. Ils ont été choisis afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la biotine agit de façon similaire à la tyrosine, un résidu aromatique qui permet d'ancrer la protéine au niveau de l'interface entre les milieux aqueux et lipidique.

1.4.1. Contribution des coauteurs

Contribution générale : J'ai rédigé tous les articles présentés dans cette thèse avec l'aide des docteurs Laprade et Vachon pour la correction de l'anglais. Ces derniers m'ont aussi donné des conseils judicieux tout au long de la rédaction de ces articles. Ces travaux ont été financés en majeure partie par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada. Ces fonds ont été obtenus par les professeurs Laprade et Schwartz. La mutagenèse a été effectuée par Gabrielle Préfontaine (M.Sc.) sous la direction du docteur Luke Masson à l'Institut de recherche en biotechnologie du Conseil national de recherches du Canada. J'ai personnellement produit les toxines et les vésicules de membrane à bordure en brosse avec l'aide de Lucie Marceau. J'ai également écrit plusieurs programmes qui m'ont aidé dans le traitement de l'ensemble des données. J'ai effectué toute l'analyse des données et l'interprétation des résultats.

Contribution spécifique au Chapitre 3 : J'ai effectué la très grande majorité des expériences de gonflement osmotique et des bioessais *in vivo*. Lucie Marceau et Vincent Vachon ont effectué une partie des expériences tout comme Yanhui Su au cours d'un stage durant lequel elle s'est familiarisée avec la technique de gonflement osmotique. Geneviève Larouche m'a aidé pour les bioessais réalisés dans le laboratoire

du docteur Charles Vincent. Le docteur Vachon m'a aussi conseillé dans l'élaboration des protocoles expérimentaux.

Contribution spécifique au Chapitre 4 : J'ai effectué toutes les expériences de gonflement osmotique, de compétition, de transfert de protéine sur membrane, de digestion, d'électrophorèse et de dichroïsme circulaire. J'ai aussi élaboré et mis au point tous les protocoles pour ces mêmes expériences. La professeure Andreea Schmitzer a été mentionnée dans la section «remerciements» de cet article pour nous avoir prêté l'équipement nécessaire pour les expériences de dichroïsme circulaire.

Contribution spécifique au Chapitre 5 : Geneviève Lebel a mis en évidence l'oxydation des groupements thiol des cystéines discutée dans ce chapitre. J'ai effectué toutes les expériences de gonflement osmotique, de transfert de protéine sur membrane et d'électrophorèse en plus d'avoir réalisé toutes les modifications chimiques décrites dans ce chapitre. J'ai aussi élaboré et mis au point tous les protocoles expérimentaux.

2. Matériel et méthodes

2.1. Mutagenèse

Au moins un acide aminé de chacune des boucles reliant les hélices du domaine I, ainsi que les domaines I et II, et la plupart des acides aminés de l'hélice $\alpha 4$ de la CryIAa ont été remplacés individuellement par une cystéine par mutagenèse dirigée *in vitro* dans *Escherichia coli* à l'aide de la méthode à double oligonucléotide (Deng et Nickoloff, 1992) (Clonotech Transformer™ kit, Clonotech Laboratories, Palo Alto, CA) et le plasmide d'expression pMP39 (Masson *et al.*, 1990). Les mutants E128C, N135C et W219C ont été préparés dans le vecteur navette *E. coli* – *B. thuringiensis* pBA1 (Bah *et al.*, 2004) en utilisant la même approche. Tous les gènes mutés ont été séquencés à l'aide de nucléotides fluorescents et d'un séquenceur automatisé Applied Biosystems modèle 370A (Foster City, CA).

2.2. Production et préparation des toxines Cry

2.2.1. Conditions oxydantes

La CryIAa et ses mutants ont été produits dans *E. coli* à l'exception des mutants E128C, N135C et W219C qui ont été produits dans *B. thuringiensis*. Les souches de *E. coli* sont cultivées pendant 2-3 jours à 37°C dans le milieu de culture YT (8 g/l de tryptone, 5 g/l d'extrait de levure et 5 g/l de NaCl) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, et celles de *B. thuringiensis* sont cultivées pendant 2-3 jours à 30°C dans le milieu YT contenant 10 µg/ml de tétracycline. Les protoxines produites sous forme d'inclusions insolubles sont purifiées par des lavages successifs tel que décrit auparavant (Masson *et al.*, 1990, 1994) et activées en incubant 50 mg de protoxine dans 40 ml de tampon carbonate de sodium (50 mM à pH 10,5) contenant 50 mM de NaCl et 5 mg de trypsine (Gibco BRL, Burlington, Ontario) pendant 90 minutes à 37°C. Les échantillons sont par

la suite centrifugés à $200\ 000 \times g$ pendant 90 minutes afin d'éliminer les lipides et autres éléments insolubles. Les toxines activées sont ensuite purifiées par chromatographie liquide à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions Mono-Q. Les molécules fixées sont éluées à l'aide d'un gradient de 50 à 500 mM de NaCl dans le tampon carbonate (pH 10,5) (Masson *et al.*, 1994). Chaque toxine est par la suite dialysée dans un bain d'eau distillée et le précipité formé est récolté et conservé à 4°C. La pureté et l'intégrité de chaque toxine sont évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (section 2.4.). Chaque toxine est resolubilisée dans un tampon contenant 10 mM de 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonate (Caps)-KOH et 150 mM de KCl (pH 10,5) avant d'être utilisée.

2.2.2. Conditions réductrices

Afin d'éviter l'oxydation du groupement thiol des cystéines, certains mutants ont aussi été produits dans des conditions réductrices. La procédure est la même que celle décrite dans la section précédente, mais 2 mM d'éthylène-diamine-tétraacétate (EDTA) est ajouté dès que la croissance bactérienne est complétée et à toutes les étapes subséquentes de la purification et 5 mM de dithiothréitol (DTT) est ajouté dès la fin de la période d'incubation avec la trypsine et à toutes les étapes suivantes. Chaque échantillon est concentré par ultrafiltration avec des filtres de cellulose régénérée Amicon (Millipore, Bedford, Massachusetts) ayant une limite d'exclusion de 30 kDa plutôt que dialysé après la chromatographie. En préparation pour les expériences de modification chimique, l'EDTA et le DTT sont retirés des échantillons en dialysant ceux-ci contre un tampon contenant 10 mM de N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonate) (Hepes)-KOH et 100 mM de KCl (pH 7,5) et dont l'oxygène a été retiré en faisant barboter de l'azote dans la solution pendant une heure. La composition du tampon de dialyse a été choisie afin d'optimiser la réactivité du groupement thiol des cystéines et des agents chimiques réagissant spécifiquement avec ces résidus. Tous les échantillons sont ensuite conservés dans des fioles scellées desquelles l'oxygène a été évacué avec un flux d'azote.

2.3. Modification chimique

Les résidus cystéine sont normalement absents de la Cry1Aa activée. Il est donc possible de modifier spécifiquement un acide aminé de la protéine, lorsque celui-ci a été remplacé par une cystéine, à l'aide d'agents chimiques qui réagissent spécifiquement avec son groupement thiol. Une première réaction avec le N-biotinylaminoéthyl méthane-thiosulfonate (MTSEA-biotine) a été effectuée pour les mutants F50C, D120C, P121C, T122C, N123C, R127C, Y153C, W182C, W219C et S252C. Le milieu réactionnel contenait de 260 à 1570 µg de toxine par ml, selon le mutant, et le réactif dans un ratio molaire de 1:10 (toxine:MTSEA-biotine). Les mutants ainsi modifiés ont été utilisés dans des expériences de gonflement osmotique après avoir été incubés ou non en présence de 2 µg de streptavidine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) pour chaque µg de toxine. D'autres réactifs, le 2-aminoéthyl méthane-thiosulfonate (MTSEA), le (2-sulfonatoéthyl) méthane-thiosulfonate (MTSES) et le 4-(hydroxyméthyl)benzyl méthane-thiosulfonate (MTSHMB) ont aussi été utilisés pour modifier le mutant Y153C en utilisant le même ratio molaire que pour le MTSEA-biotine. Tous les réactifs méthane-thiosulfonate proviennent de Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario) et toutes les réactions sont effectuées à la température de la pièce pendant au moins une heure.

2.4. Électrophorèse

Afin de détecter la formation d'homo-dimères due à la présence de ponts disulfure inter-moléculaires, un échantillon de chaque mutant a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10% d'acrylamide) dans des conditions standard (Laemmli, 1970). Chaque toxine (3 µg) est incubée dans un tampon d'échantillon (concentrations finales : 50 mM de 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (Tris)-HCl (pH 6,8), 2% (p/v) de dodécylsulfate de sodium, 0,1% (p/v) de bleu de bromophénol et 10% (p/v) de glycérol) avec et sans DTT (concentration finale de 100 mM).

2.5. Transfert des protéines sur membrane

Le degré de réactivité des cystéines des mutants F50C, D120C, P121C, T122C, N123C, R127C, Q151C, Y153C, W182C, W219C et S252C a été évalué de la façon suivante. Chacun de ces mutants (100 ng) est d'abord modifié avec du MTSEA-biotine tel que décrit dans la section 2.3. Après avoir migré sur gel de polyacrylamide (10% d'acrylamide) en absence de DTT, les protéines sont transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (Immobilon-P, Millipore) dans une cassette de transfert *mini blot* EC140 (E-C Apparatus, Milford, Massachusetts) sous une tension de 200 V pendant deux heures. Le tampon (25 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM de glycine et 10% (v/v) de méthanol) est maintenu à 4°C pendant le transfert. Les sites de fixation non spécifique de cette membrane sont ensuite bloqués avec une solution contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 250 mM de NaCl, 2,5% (p/v) d'albumine de sérum bovin et 0,1% (p/v) de Tween-20. Par la suite, la membrane est incubée avec 5 µg de streptavidine conjuguée à une peroxidase de raifort dans 10 ml de tampon TGG (0,5% (p/v) de Tween-20, 1 M de glucose, 10% (p/v) de glycérol, 250 mM de NaCl et 100 mM de phosphate de sodium (pH 7,2)) pendant une heure à température de la pièce. L'excédent de réactif est retiré en lavant la membrane à quatre reprises pendant 10 min dans un tampon contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 137 mM de NaCl et 0,1% (p/v) de Tween-20. Les protéines marquées sont détectées par chimioluminescence avec les réactifs d'Amersham (Uppsala, Suède) en suivant les instructions du fabricant.

2.6. Digestion des toxines

Une altération possible de la conformation des mutants activés pourrait les rendre sensibles à la protéolyse. Tous les mutants ayant une activité faible ou négligeable ont donc été soumis à l'action prolongée de deux protéases : la trypsine et la chymotrypsine. Chacun de ces mutants (3 µg) est incubé avec 3 µg de trypsine ou de chymotrypsine dans 15 µl à 37°C. La réaction est arrêtée immédiatement après avoir mélangé les réactifs ou après 12 heures en faisant bouillir les échantillons pendant 5 min. Chaque

échantillon est par la suite analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (10% d'acrylamide) en présence de DTT tel que décrit dans la section 2.4.

2.7. Dichroïsme circulaire

Une analyse de la structure secondaire de la Cry1Aa et de certains mutants inactifs a été effectuée en mesurant leur spectre de dichroïsme circulaire. Ceux-ci sont mesurés sur une plage de longueurs d'onde allant de 190 à 280 nm avec un spectromètre Chirascan CD (Applied Photophysics, Leatherhead, Royaume-Uni) à la température de la pièce. Une concentration de 0,5 mg/ml de toxine et un parcours optique de 0,2 mm ont été choisis. La valeur du dichroïsme circulaire est mesurée avec un pas de 0,5 nm et un temps d'intégration de 0,5 s, et chaque expérience est répétée 10 fois. Le spectre du tampon de solubilisation (150 mM de KCl et 10 mM de Caps-KOH (pH 10,5)) est soustrait de celui de chaque toxine.

2.8. Bioessais

Des oeufs fertilisés de *M. sexta* ont été achetés de l'insectarium du département d'entomologie de la North Carolina State University (Raleigh, Caroline du Nord). Les larves ont été élevées sur un milieu nutritif artificiel fourni avec les œufs. Les bioessais ont été effectués avec des larves néonates et des toxines activées avec la trypsine. Chaque toxine est diluée à la concentration désirée dans un tampon phosphate contenant 8 mM de Na_2HPO_4 , 2 mM de KH_2PO_4 (pH 7,4) et 150 mM de NaCl. Chaque échantillon de toxine (100 μl) est déposé sur le milieu dans un puits d'une surface de 1,8 cm^2 . Lorsque l'échantillon est absorbé par le milieu, une larve est placée dans chacun des puits et élevée à 27°C, à un taux d'humidité de 70%, et une photopériode de 12 heures de clarté et 12 heures de noirceur. Le pourcentage de mortalité est calculé après 7 jours et corrigé en fonction des témoins à l'aide de la correction d'Abbott. Le gain de poids moyen pour les larves survivantes est aussi calculé après 7 jours. Tous les mutants

sont systématiquement testés à une concentration de 2 µg/ml (111 ng/cm²) et les mutants peu toxiques sont aussi testés à une concentration de 25 µg/ml (1,4 µg/cm²). Six réplicats de 25 larves sont effectués pour chaque concentration utilisée.

2.9. Préparation des vésicules

Des intestins moyens complets sont retirés de larves de *M. sexta* du 5^e stade et les tubules de Malpighi retirés de la surface de l'intestin. Les intestins sont par la suite coupés longitudinalement afin de retirer la membrane péritrophique et son contenu, puis rincés dans une solution maintenue à 4°C contenant 300 mM de sucrose, 5 mM d'éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N, N', N'-tétracétate (EGTA) et 17 mM de Tris-HCl (pH 7,5). Les vésicules de la membrane à bordure en brosse sont préparées à partir d'homogénats de l'intestin moyen à l'aide d'une technique de centrifugation différentielle et de précipitation au magnésium (Wolfersberger *et al.*, 1987) et conservées à -80°C jusqu'à ce qu'elles soient utilisées. En préparation pour les expériences de gonflement osmotique, les vésicules sont resuspendues à environ 90% de leur volume final dans une solution contenant 10 mM d'Hepes-KOH (pH 7,5) ou de Caps-KOH (pH 10,5) et incubées à 4°C pendant la nuit précédant les expériences afin de laisser la solution s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. Au moins une heure avant le début des expériences, les vésicules sont diluées à leur concentration finale de 0,4 mg de protéine membranaire par ml avec le tampon approprié auquel a été ajouté de l'albumine de sérum bovin afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/ml.

2.10. Gonflement osmotique

2.10.1. Expériences de préincubation

La perméabilité des vésicules a été analysée avec une technique de gonflement osmotique (Carroll et Ellar, 1993). Dans un premier type d'expériences, les vésicules

sont préincubées pendant 60 minutes à 23°C avec une concentration de toxine prédéterminée qui varie de 5 à 150 pmol de toxine par mg de protéines membranaires. Les expériences sont initiées en mélangeant rapidement les vésicules (à l'aide d'un système d'injection Hi-Tech Scientific, Salisbury, Royaume-Uni) avec un volume égal d'une solution contenant 10 mM d'Hepes-KOH (pH 7,5) ou de Caps-KOH (pH 10,5), 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin et 150 mM de KCl, d'hydrochlorure de N-méthyl-D-glucamine ou de gluconate de potassium, ou 300 mM de sucrose ou de raffinose. La lumière diffusée par les vésicules est mesurée à 23°C à une longueur d'onde de 450 nm avec un tube photomultiplicateur à un angle de 90° relativement au faisceau incident à l'aide d'un spectromètre (Photon Technology International, South Brunswick, New Jersey). L'intensité lumineuse est mesurée à une fréquence de 10 Hz et normalisée relativement à la valeur maximale de l'expérience témoin effectuée en absence de toxine. Le pourcentage de recouvrement de volume est calculé selon la formule : $100(1-I_t)$ où I_t est l'intensité lumineuse normalisée mesurée à un temps t . À moins d'indications contraires, les données présentées sont la moyenne et l'erreur type de trois expériences effectuées avec des préparations différentes de vésicule. Chacun de ces réplicats est la moyenne de cinq tracés obtenus avec la même préparation de toxine.

2.10.2. Cinétique de gonflement osmotique

Les expériences qui ont pour but de mesurer le taux de formation des pores dans les vésicules sont effectuées de la même façon que les expériences de la section précédente sauf que 150 pmol de toxine par mg de protéines membranaires sont ajoutés à la solution de KCl avant que celle-ci ne soit mélangée avec les vésicules. Ceci implique que les vésicules sont exposées à la toxine au moment où le choc osmotique se produit. Pour ces expériences, le pourcentage de recouvrement de volume est calculé pour chacun des points expérimentaux et les valeurs obtenues en absence de toxine sont soustraites de celles obtenues en présence de toxine. Dans certains cas, les courbes expérimentales sont lissées avec une sigmoïde de Boltzmann et les paramètres cinétiques sont extraits de la sigmoïde. Ces paramètres sont le temps de latence et le taux de gonflement qui sont

respectivement le temps nécessaire pour obtenir 5% de recouvrement de volume et la pente maximale de la sigmoïde.

2.10.3. Compétition entre les mutants et la Cry1Aa

La technique de gonflement osmotique a été utilisée afin d'évaluer si les mutants inactifs pouvaient se fixer sur les récepteurs des toxines Cry. La capacité de ces mutants à déloger la Cry1Aa des récepteurs et de réduire ainsi la quantité de pores formés est observée à l'aide d'expériences de cinétique de gonflement osmotique mentionnées ci-dessus. Dans ces expériences de compétition, 500 pmol/mg de protéines membranaires de l'un ou l'autre des mutants inactifs sont présents dans la solution hypertonique de KCl avec ou sans 50 pmol/mg de protéines membranaires de Cry1Aa.

3. Cysteine Scanning Mutagenesis of $\alpha 4$, a Putative Pore-Lining Helix of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa

Frédéric Girard, Vincent Vachon, Gabrielle Préfontaine, Lucie Marceau, Yanhui Su, Geneviève Larouche, Charles Vincent, Jean-Louis Schwartz, Luke Masson et Raynald Laprade

Applied and Environmental Microbiology 74 (2008) 2565-2572

Résumé

L'hélice $\alpha 4$ du domaine I des toxines Cry du bacille de Thuringe tapisse probablement la lumière des pores qu'elles forment dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen des insectes visés. Afin d'étudier son rôle dans la formation des pores, la plupart de ses acides aminés ont été remplacés individuellement par une cystéine dans la Cry1Aa. La toxicité de chaque mutant pour des larves néonates de *Manduca sexta* a été mesurée, et leur capacité à former des pores dans des vésicules de la membrane à bordure en brosse provenant de l'épithélium intestinal de cet insecte a été analysée avec une technique de gonflement osmotique basée sur des mesures de lumière diffusée. La majorité des mutants ont une toxicité et une capacité à former des pores qui est fortement réduite par rapport à celles de la Cry1Aa. La plupart des mutations qui entraînent une diminution substantielle ou une perte totale d'activité portent sur des résidus qui sont situés du côté hydrophile de l'hélice tandis que celles qui n'ont peu ou pas d'effet portent sur des résidus situés du côté hydrophobe. Les propriétés des pores formés par les mutants qui conservent une activité significative sont similaires à celles de la Cry1Aa, ce qui suggère que la réduction d'activité observée pour plusieurs mutants est principalement due à une diminution du nombre de pores formés.

Cysteine Scanning Mutagenesis of $\alpha 4$, a Putative Pore-Lining Helix of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Cry1Aa[∇]

Frédéric Girard,¹ Vincent Vachon,¹ Gabrielle Préfontaine,² Lucie Marceau,¹ Yanhui Su,^{1,3} Geneviève Larouche,⁴ Charles Vincent,⁴ Jean-Louis Schwartz,¹ Luke Masson,² and Raynald Laprade^{1*}


Groupe d'Étude des Protéines Membranaires, Université de Montréal,¹ and Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada,² Montreal, Quebec, Canada; Peking University, Beijing, People's Republic of China³; and Horticultural Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, Quebec, Canada⁴

Received 11 January 2008/Accepted 21 February 2008

Running Title: Cysteine Scanning Mutagenesis of Cry1Aa Helix $\alpha 4$

Applied and Environmental Microbiology, May 2008, Vol. 74 No. 9, p. 2565-2572.

© American Society for Microbiology 2008

* 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) 343-7924. Fax: (514) 343-7146. 

[∇] Published ahead of print on 7 March 2008.

Helix $\alpha 4$ of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins is thought to line the lumen of the pores they form in the midgut epithelial cells of susceptible insect larvae. To define its functional role in pore formation, most of the $\alpha 4$ amino acid residues were replaced individually by a cysteine in the Cry1Aa toxin. The toxicities and pore-forming abilities of the mutated toxins were examined, respectively, by bioassays using neonate *Manduca sexta* larvae and by a light-scattering assay using midgut brush border membrane vesicles isolated from *M. sexta*. A majority of these mutants had considerably reduced toxicities and pore-forming abilities. Most mutations causing substantial or complete loss of activity map on the hydrophilic face of the helix, while most of those having little or only relatively minor effects map on its hydrophobic face. The properties of the pores formed by mutants that retain significant activity appear similar to those of the pores formed by the wild-type toxin, suggesting that mutations resulting in a loss of activity interfere mainly with pore formation.

Bacillus thuringiensis is a gram-positive spore-forming bacterium that produces a variety of insecticidal toxins which accumulate as protoxins in the form of parasporal crystals. Once ingested by susceptible insect larvae, the crystals become soluble in the midgut, and the protoxins are converted to active toxins by intestinal proteases. The activated toxins act by forming pores in the midgut luminal membrane after binding to specific receptors located at the membrane surface of the intestinal epithelium columnar cells (25). These pores are large enough to disrupt the ionic gradients established across the membrane and to cause the osmotic lysis of the cells (27).

The structures of several insecticidal Cry toxins have been elucidated by X-ray crystallography (4, 5, 13, 16, 19, 20, 24). With the exception of a recently described crystal protein of unknown toxicity (1), they all share a remarkably similar three domain structure. Domain I is composed of a bundle of seven amphipathic α -helices, with helix $\alpha 5$ surrounded by the other helices. Domain II is composed of three β -sheets with a “Greek key” topology forming a β -prism, and domain III is composed of two antiparallel sheets forming a β -sandwich with a “jelly roll” topology. While domain I is thought to be responsible for membrane insertion and pore formation, domains II and III are thought to be involved in the binding of the toxin to its receptors (9, 16, 19, 25, 27).

Receptor binding presumably triggers a conformational change in the toxin molecule that leads to its oligomerization and insertion into the membrane. According to the umbrella model of insertion, a hairpin composed of helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ inserts into the membrane, while the rest of the helices are deployed over the membrane surface (2, 14, 15, 28). Results from chemical modification of preformed Cry1Aa pores in artificial membranes, using a mutant toxin possessing an aspartic acid-to-cysteine substitution at residue 136 in helix $\alpha 4$, indicated that at least part of the hydrophilic face of this helix lined the pore lumen (23). In agreement with the notion that $\alpha 4$ plays an important role in pore formation, single-site mutations in most of its charged residues cause a strong reduction in the pore-forming ability and toxicity of Cry1Aa (23, 32). Substitution of asparagine-135 by a glutamine residue in Cry1Ab and Cry1Ac disrupted the ability of these toxins to oligomerize without affecting their binding properties (7, 29). In contrast, mutants with alterations in isoleucine-132 and glutamine-133 of Cry1Ac retained the ability to oligomerize but were poorly active in bioassays and brush border membrane

vesicle osmotic swelling experiments, suggesting that the mutations affected the insertion of the toxin into the membrane or the properties of the pores (18).

In order to investigate the functional role of helix $\alpha 4$ further, cysteine scanning mutagenesis was utilized in which the $\alpha 4$ residues of the CryIAa toxin were individually replaced by cysteine. During activation, all cysteine residues are naturally removed from wild-type CryIAa protoxin (16), thus leaving a single cysteine substitution in the activated mutant toxins. In this study, a detailed examination of the effects of these mutations on the properties of the pores formed, including the rate of pore formation, was determined using a light-scattering assay and brush border membrane vesicles isolated from *Manduca sexta*. Almost all of the mutants displayed a reduced toxicity and pore-forming ability. Mutations in most of the residues located on the hydrophobic face of the helix had little or only relatively minor effects on toxin activity, whereas mutations in most of the hydrophilic residues caused substantial or complete loss of activity.

MATERIALS AND METHODS

Mutagenesis and toxin preparation. Most amino acid residues from helix $\alpha 4$ of CryIAa have been replaced individually by cysteine by oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis in *Escherichia coli* using the double oligonucleotide method (10) (Clontech Transformer kit; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) and the expression plasmid pMP39 (22). The N135C mutant toxin was prepared in the *E. coli*-*B. thuringiensis* shuttle vector pBA1 (3) using the same approach. All mutant genes were sequenced using fluorescent nucleotides and an Applied Biosystems (Foster City, CA) model 370A automated sequencer.

Wild-type CryIAa and mutant toxins were produced in *E. coli* except for N135C mutant toxin, which was produced in *B. thuringiensis*. *E. coli* strains were grown for 2 to 3 days at 37°C in YT broth (8 g/liter tryptone, 5 g/liter yeast extract, and 5 g/liter NaCl) containing 100 μ g/ml ampicillin, and the *B. thuringiensis* strain was grown for 2 to 3 days at 30°C in YT broth containing 10 μ g/ml tetracycline. Protoxins produced as insoluble inclusions were purified as described elsewhere (21, 22) and activated by incubating 50 mg of protoxin in 40 ml of 50 mM carbonate buffer (pH 10.5) containing

50 mM NaCl and 5 mg trypsin (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) for 90 min at 37°C. Activated toxins were centrifuged for 90 min at $200,000 \times g$ to remove lipids and other insoluble material. Toxins were then purified by fast protein liquid chromatography using a Mono-Q anion exchange column and by eluting bound toxin with a 50 to 500 mM NaCl gradient in carbonate buffer (pH 10.5) (21). Precipitates formed by dialyzing purified toxins against distilled water were collected and stored at 4°C. The purity and integrity of each toxin preparation were verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Bioassays. Fertilized eggs of *M. sexta* were purchased from the North Carolina State University Entomology Department insectary (Raleigh, NC) and raised on a standard artificial diet supplied with the eggs. Toxicity assays were performed on neonate larvae with trypsin-activated toxins. These were diluted in phosphate buffered saline (8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , and 150 mM NaCl [pH 7.4]). Toxin samples (100 μl) were layered onto artificial diet in 1.8- cm^2 wells and allowed to stand until they were completely absorbed by the diet. One larva was placed in each well and reared at 27°C and 70% relative humidity with a 12-h light and 12-h darkness photoperiod. Mortality was recorded after 7 days and adjusted relative to control values with Abbott's correction. Weight gained by surviving larvae was also recorded after 7 days. Mutant toxins were systematically tested at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (111 ng/cm^2), and for those toxins that were poorly active at this concentration, the tests were repeated at 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Six replicates of 25 larvae each were used for each toxin concentration tested.

Preparation of brush border membrane vesicles. Whole midguts isolated from fifth-instar *M. sexta* larvae were freed of attached Malpighian tubules, cut longitudinally to remove the peritrophic membrane and gut contents, and rinsed thoroughly with ice-cold 300 mM sucrose, 5 mM EGTA, and 17 mM Tris-HCl (pH 7.5). Brush border membrane vesicles were prepared from midgut homogenates by a procedure involving magnesium precipitation and differential centrifugation (33) and stored at -80°C until use. In preparation for light-scattering experiments, vesicles were resuspended to about 90% of the desired final volume in 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) or 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS)-KOH (pH 10.5) and allowed to equilibrate overnight at 4°C. At least 1 h before the beginning of the experiments, they

were diluted to a final concentration of 0.4 mg of membrane protein/ml with the appropriate buffer supplemented with enough bovine serum albumin to achieve a final concentration of 1 mg/ml.

Light-scattering assay. Brush border membrane permeability properties were analyzed using a light-scattering assay (6). In most experiments, vesicles were incubated for 60 min at 23°C with the specified toxin concentration, ranging from 5 to 150 pmol of toxin/mg of membrane protein. Assays were initiated by rapidly mixing the vesicles with an equal volume of a solution containing 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) or CAPS-KOH (pH 10.5), 1 mg/ml bovine serum albumin, and a 150 mM concentration of KCl, *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride, or potassium gluconate, or a 300 mM concentration of sucrose or raffinose, using a stopped flow apparatus (Hi-Tech Scientific Co., Salisbury, United Kingdom). Alternatively, in experiments designed to monitor the rate of pore formation, 150 pmol of toxin/mg of membrane protein was added to the KCl solution before mixing with the vesicles, without prior incubation. Scattered light intensity was monitored at a wavelength of 450 nm, with a photomultiplier tube at an angle of 90° relative to the incident light beam, at 23°C in a Photon Technology International (South Brunswick, NJ) spectrofluorometer. Data were recorded every 0.1 s and normalized relative to the maximum value obtained for control vesicles in the absence of toxin. Percent volume recovery was defined as $100(1 - I_t)$, where I_t is the relative scattered light intensity at a given time t . For kinetic experiments, percent volume recovery was calculated for every experimental point, and values obtained for control vesicles in the absence of toxin were subtracted from the experimental values measured in the presence of toxin. Each curve was fitted with a Boltzmann sigmoid, and kinetic parameters were extracted from the fitted curves (32). Unless indicated otherwise, data are means \pm standard errors of the means (error bars) of three experiments carried out with a different vesicle preparation. Data for each of these replicates consist of the average of five traces obtained using the same vesicle preparation.

RESULTS

In Cry1Aa, helix $\alpha 4$ is composed of 26 amino acids (16) of which most were individually replaced by a cysteine residue. For reasons that remain unclear, cysteine mutations at proline-124, alanine-125, or leucine-148 were not obtained despite repeated attempts. Furthermore, only minute quantities of T143C protoxin were produced in either *E. coli* or *B. thuringiensis*, and this mutant was consequently removed from the present study. Results for mutants E128C, E129C, and D136C have been reported elsewhere (32).

Toxicity. Bioassays were performed as described in Materials and Methods with neonate *M. sexta* larvae for each of the remaining $\alpha 4$ cysteine mutants (Table 1). At 2 μg of toxin per ml of buffer solution, at least 85% mortality was observed in the presence of Cry1Aa, R127C, M130C, M137C, S139C, L141C, I145C, and A149C. Mutant toxins I132C and F134C were significantly less toxic than Cry1Aa, but they nevertheless killed 69% and 71% of the larvae, respectively. Less than 25% mortality was observed in the presence of any of the remaining 10 mutants. For this latter group, weight gain was also measured after 7 days to monitor sublethal effects. Control larvae reared in the absence of toxin gained 111 ± 6 mg after 7 days ($n = 78$). With the exception of mutants N135C, A144C, and L147C, all mutants that caused low mortality were able to impair larval development significantly. The 10 mutants that caused low percentage mortality at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were also tested at 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. At this concentration, only N135C, A144C, and L147C still showed less than 25% mortality. In all cases, the weight gained by surviving larvae was significantly lower than that measured in the absence of toxin and was lower at 25 μg of toxin/ml than at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pore-forming ability. The ability of each mutant toxin to form pores was examined by using an osmotic swelling assay (6). In this assay, brush border membrane vesicles, incubated for 60 min with different toxin concentrations, are rapidly mixed with a hypertonic solution of KCl. As a result of the osmotic gradient, vesicular shrinkage can be observed as a sharp rise in scattered light intensity (Fig. 1). The pores formed by an active toxin, such as A149C, increase membrane permeability to the solute, thus allowing the vesicles to swell back to a fraction of their original volume as observed by a reduction in scattered light intensity (Fig. 1A). Membrane permeability increases

rapidly with increasing toxin concentration. In contrast, inactive mutants, such as S139C, have little influence on vesicle swelling rates (Fig. 1B).

The pore-forming abilities of some wild-type and mutant toxins depend on pH (30–32). Potential effects of pH on the activity of the $\alpha 4$ mutants were therefore investigated by performing the experiments at pH 7.5 and 10.5 (Fig. 2). Because the pKa of the cysteine thiol group is 8.33 (26), the single cysteine residue of each mutant should be negatively charged at the higher pH but uncharged at the lower pH value. Only toxin mutants R127C (Fig. 2C), M130C (Fig. 2D), F134C (Fig. 2H), M137C (Fig. 2J), L141C (Fig. 2N), and A149C (Fig. 2T) had an activity which was comparable to that of the wild-type toxin (Fig. 2A). In comparison with Cry1Aa, the other mutants had various activities ranging from mildly to largely reduced. Among those with a large reduction in activity, mutants N135C (Fig. 2I), S139C (Fig. 2L), A140C (Fig. 2M), T142C (Fig. 2O), A144C (Fig. 2P), and L147C (Fig. 2S) caused volume recovery to reach levels that were not significantly different from control values measured in the absence of toxin ($P < 0.05$). The pore-forming activities of the remaining mutants, L126C (Fig. 2B), R131C (Fig. 2E), I132C (Fig. 2F), Q133C (Fig. 2G), N138C (Fig. 2K), I145C (Fig. 2Q), and P146C (Fig. 2R), were significantly lower than that of Cry1Aa, but in their presence, the vesicles were able to swell significantly more than in the absence of toxin ($P < 0.05$). For Cry1Aa and most of its mutants, toxin-induced membrane permeability was similar at both pH values tested. However, L141C (Fig. 2N), I145C (Fig. 2Q), and P146C (Fig. 2R) were significantly more active at pH 7.5 than at pH 10.5 ($P < 0.05$). Q133C (Fig. 2G) was also somewhat more active at the lower pH, but the difference was only marginally significant ($0.05 < P < 0.1$).

Pore properties. All mutants that retained a detectable pore-forming activity were further tested to investigate possible alterations in the ion selectivity and size of their pores. Ionic selectivity of the pores was tested following incubation of the vesicles with 150 pmol of toxin/mg of membrane protein in osmotic swelling experiments where potassium was replaced by the larger cation, *N*-methyl-D-glucamine (Fig. 3A), or in which chloride was replaced by the larger anion, gluconate (Fig. 3B). Experiments using *N*-methyl-D-glucamine were carried out only at pH 7.5, since this amine is not ionized at pH 10.5. As was reported earlier (8, 31, 32), the volume recovery values measured after

3 seconds in the presence of Cry1Aa are far superior in the presence of *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride than in the presence of potassium gluconate as expected from the fact that the pores are cation selective (17). For all mutants, volume recovery was also much higher in the presence of *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride (Fig. 3A) than in the presence of potassium gluconate (Fig. 3B).

Among the mutants that increased membrane permeability to KCl approximately as well as wild-type Cry1Aa, mutant toxins R127C, M130C, F134C, and A149C were also as effective as the wild-type toxin in permeabilizing the membrane for *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride (Fig. 3A). However, M137C and L141C were slightly, but significantly, less active than Cry1Aa ($P < 0.05$). All mutants that were less efficient than Cry1Aa in permeabilizing the membrane to KCl also had a significantly lower ability to increase membrane permeability to *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride ($P < 0.01$). Moreover, membrane permeability to *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride was not significantly higher in the presence of I132C or N138C than in the absence of toxin ($P < 0.05$) (Fig. 3A).

In the presence of potassium gluconate, mutants R127C, M130C, M137C, and L141C were as effective as Cry1Aa at both pH 7.5 and 10.5 (Fig. 3B). Significantly lower volume recovery values were observed for mutants F134C and A149C at pH 10.5 ($P < 0.05$), but these mutants demonstrated wild-type activity at pH 7.5. Significant differences in osmotic swelling measured at pH 7.5 and 10.5 ($P < 0.05$) were recorded for L126C, L141C, I145C, and P146C (Fig. 3B). The difference in osmotic swelling observed for R131C, Q133C, F134C, and A149C at pH 7.5 and 10.5 were only marginally significant ($0.05 < P < 0.1$). R131C, I145C, and P146C were active at pH 7.5, albeit significantly less active than Cry1Aa ($P < 0.05$), but inactive at pH 10.5.

Sucrose (Fig. 4A) and raffinose (Fig. 4B), two large uncharged solutes, were used to investigate possible alterations in the size of the pores formed by the mutant toxins. Osmotic swelling measured in the presence of sucrose was much larger than that measured in the presence of raffinose as expected from the larger size of the latter sugar. At both pH values, only toxin mutants R127C, M130C, and L141C permeabilized the membrane for sucrose as efficiently as Cry1Aa did. Among the other mutants tested, only M137C was able to increase significantly membrane permeability to sucrose at

both pH values. While L126C had a significant effect only at pH 7.5, F134C and A149C significantly increased membrane permeability to sucrose only at pH 10.5. In the case of F134C, at pH 7.5, the osmotic swelling values were only marginally different ($0.05 < P < 0.1$) from those measured in the absence of toxin or in the presence of Cry1Aa. For all mutants, volume recovery values measured in the presence of raffinose were very low in comparison with those measured in the presence of the other solutes. Only Cry1Aa, R127C, and M130C displayed significant activity at pH 7.5, and only Cry1Aa and R131C were significantly active at pH 10.5.

Kinetics of pore formation. Determination of pore formation rates was carried out by exposing the vesicles to toxin at the moment they were diluted with the hypertonic KCl solution. Such assays were performed only for mutants that retained significant activity in incubation experiments using KCl. As illustrated in Fig. 5, volume recovery, calculated for every experimental point, increased in a sigmoidal fashion after a delay period in the presence of active toxins, such as Cry1Aa and A149C, and somewhat more slowly in the presence of a less active toxin, such as I145C. Kinetic parameters, including the delay time and the maximal osmotic swelling rate, were estimated from Boltzmann sigmoidal curves fitted to the experimental values (Table 2). Mutants R127C, M130C, F134C, and M137C displayed parameters similar to those of Cry1Aa at both pH levels with the exception of F134C for which the delay at pH 10.5 was slightly, but significantly, longer than that observed with Cry1Aa. The kinetic parameters estimated for L141C and A149C were comparable to those of Cry1Aa at pH 7.5, but these mutants were significantly less active than Cry1Aa at pH 10.5. The remaining mutants, L126C, R131C, I132C, Q133C, N138C, I145C, and P146C, were all much less active than Cry1Aa was at both pH 7.5 and 10.5. The delay periods measured for Q133C, M137C, L141C, I145C, and A149C were significantly longer at pH 10.5 than at pH 7.5 ($P < 0.05$) and the maximal swelling rates measured for R127C, Q133,C and L141C were significantly lower ($P < 0.05$) at the higher pH.

DISCUSSION

Most mutations analyzed in the present study caused a strong reduction in both the toxicity of Cry1Aa toward *M. sexta* larvae and its ability to increase the permeability of midgut brush border membrane vesicles isolated from *M. sexta* to a variety of small solutes. In general, the toxicity of each mutant correlated well with its pore-forming ability compared to that of wild-type Cry1Aa, as was observed previously for a variety of Cry1Aa $\alpha 4$ mutants with alterations in one or the other of its charged residues (32). Notable exceptions were identified, however, including I132C, S139C, and I145C mutant toxins, for which levels of toxicity only slightly lower than that of Cry1Aa were observed (Table 1) despite pronounced reductions in their ability to increase the permeability of the vesicles (Fig. 2). Differences between the in vivo and in vitro activities of Cry1Aa mutants have been described previously (8, 31). In all former cases, however, the mutants had lost substantial toxicity while retaining a pore-forming ability that was comparable to that of the wild-type toxin. Although further work will be required to precisely identify the reasons for these apparent discrepancies, they probably reflect important differential effects of the complex midgut microenvironmental conditions, which are only partially reconstituted in the in vitro experiments, on the pore-forming ability of the mutants (11, 12, 30).

As summarized in Fig. 6, only 6 of the 19 mutants tested in the present study and none of the three cysteine mutants studied previously (32) retained a pore-forming ability that was comparable to that of wild-type Cry1Aa. These comprise five mutants (M130C, F134C, M137C, L141C, and A149C) in which a nonpolar residue was replaced by a cysteine. Except for the A149 mutant, these mutated residues map close to one another on a face of the helix, delimited by residues L126 and F134, in which all residues are nonpolar. Only one mutant retained wild-type activity after the substitution of a polar residue (R127C). Other mutants with alterations at residue R127 (R127E and R127N) also retained a pore-forming ability that was comparable to that of wild-type Cry1Aa (32). Although this residue is immediately adjacent to the hydrophobic side of the helix, it is located near its N-terminal end and may therefore not be inserted in the membrane at the level of the lipid bilayer.

All other mutants tested had a substantially reduced (L126C, E128C, Q133C, D136C, I145C, and P146C) or negligible (E129C, R131C, I132C, N135C, N138C, S139C, A140C, T142C, A144C, and L147C) pore-forming ability (Fig. 6). In contrast with R131C, other mutants with alterations at residue R131 (R131D, R131E, R131H, and R131Q) retained a readily detectable level of activity, at least at pH 7.5 (32). On the other hand, the very poor activity of N135C correlates well with the inactivity of the N135Q mutants of Cry1Ab and Cry1Ac (7, 29), two toxins in which helix α 4 is identical to that of Cry1Aa except for one amino acid at position 148. In a previous study, the inactivity of the T142D mutant was tentatively attributed to a deleterious effect of introducing a negative charge in a region of the helix that is normally devoid of charged residues (32). However, the results of the present study indicate that the sensitivity of the toxin to alterations at residue T142 is independent of the charge, since the T142C toxin was inactive at pH 7.5 and 10.5 despite the fact that its thiol group should have been uncharged at the lower pH but negatively charged at the higher pH. Introducing a negative charge on the cysteine of some mutants nevertheless had a disruptive effect on toxin activity, which was especially pronounced for I145C and P146C, two mutants in which the residue that was altered was nonpolar. It should be pointed out, however, that both of these mutants had a considerably reduced pore-forming activity when measured at pH 7.5 so that the added negative charge accentuated, rather than caused, the deleterious effect of the mutation. In addition, minor effects of pH were observed in the kinetic experiments for a few of the mutants. These were most apparent for the Q133C and L141C mutants, for which both the delay and osmotic swelling rate were affected significantly, even though this effect was much less evident following preincubation of the vesicles with the toxin for an hour before the onset of the assay.

Notwithstanding such subtle differences, the activities of the α 4 mutants followed a remarkably similar pattern in all osmotic swelling experiments carried out with and without preincubation in the presence of toxin. These reductions in activity cannot be attributed to major changes in the ionic selectivity of the pores, since for each mutant, the ratio of its activity relative to that of Cry1Aa is similar in experiments performed with potassium chloride, with a larger cation, *N*-methyl-D-glucamine, and with a larger anion, gluconate (Fig. 3). Similarly, these reductions in activity cannot be attributed to

major changes in the size of the pores formed by the mutant toxins, since a similar pattern is also observed in the presence of the disaccharide sucrose and the trisaccharide raffinose (Fig. 4). Although minor effects on the ionic selectivity and size of the pores cannot be completely excluded, these observations, as well as the results of the experiments analyzing the kinetics of pore formation, indicate that the reduction in the activity of the mutants is mainly due to an alteration in the number of pores formed, rather than to a change in their properties.

A similar conclusion was reached from the study of Cry1Aa $\alpha 4$ mutants in which alterations in charged residues caused a sharp reduction in the pore formation of the toxin (32). It is also consistent with earlier results in which the ion channel properties of the pores formed by the Cry1Aa mutant N138C in planar lipid bilayers were examined in detail (23). Their conductance was indeed similar to that of the pores formed by the wild-type toxin, but the probability of the channels being open was considerably lower (12.2% for N138C versus 65.0% for Cry1Aa). It should be pointed out, however, that the probability of the channels being open does not necessarily reflect the pore-forming ability of the toxin, although it must contribute to the overall permeability of the membrane. In fact, even though single-channel lipid bilayer experiments allow precise measurements of the pore properties, once these have formed in the membrane, the kinetics of pore formation are much more reliably studied in osmotic swelling experiments involving a large population of vesicles, each possessing the toxin receptors of the insect host.

In summary, the results of the present study are consistent with our earlier hypothesis that part of $\alpha 4$ lines the lumen of the pores formed by Cry1Aa (23). They also stress the importance of this helix in the mechanism of pore formation by this toxin. Its pore-forming ability is indeed very sensitive to alterations, not only of charged residues of $\alpha 4$, as was documented previously (23, 32), but of most of its polar residues as well. Further work will be required to establish whether the reduced activity caused by such alterations is due to decreased receptor binding, reduced oligomer formation, and/or membrane insertion. The mutants described herein should be particularly useful in exploring the role of each of these steps in the overall mechanism of action of *B. thuringiensis* toxins.

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, and Valorisation-Recherche Québec.

REFERENCES

1. **Akiba, T., K. Higuchi, E. Mizuki, K. Ekino, T. Shin, M. Ohba, R. Kanai, and K. Harata.** 2006. Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to β -pore-forming toxins. *Proteins* **63**:243–248.
2. **Aronson, A. I., and Y. Shai.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:1–8.
3. **Bah, A., K. van Frankenhuyzen, R. Brousseau, and L. Masson.** 2004. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invertebr. Pathol.* **85**:120–127.
4. **Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar, and J. Li.** 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**:363–382.
5. **Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat, and J. Lescar.** 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**:3391–3401.
6. **Carroll, J., and D. J. Ellar.** 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771–778.
7. **Cooper, M. A., J. Carroll, E. R. Travis, D. H. Williams, and D. J. Ellar.** 1998. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem. J.* **333**:677–683.
8. **Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade, and R. Frutos.** 2001. Role of

- interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**:35546–35551.
9. **Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S.-J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara, and S. R. Hussain.** 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview. *Gene* **179**:111–117.
 10. **Deng, W. P., and J. A. Nickoloff.** 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**:81–87.
 11. **Fortier, M., V. Vachon, R. Frutos, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2007. Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6208–6213.
 12. **Fortier, M., V. Vachon, M. Kirouac, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 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.
 13. **Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn, and L. English.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**:1101–1109.
 14. **Gazit, E., P. La Rocca, M. S. P. Sansom, and Y. Shai.** 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.
 15. **Gerber, D., and Y. Shai.** 2000. Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**:23602–23607.
 16. **Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447–464.
 17. **Kirouac, M., V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2002. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:171–179.

18. **Kumar, A. S. M., and A. I. Aronson.** 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181**:6103–6107.
19. **Li, J., J. Carroll, and D. J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815–821.
20. **Li, J., D. J. Derbyshire, B. Promdonkoy, and D. J. Ellar.** 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**:571–577.
21. **Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas, and R. Brousseau.** 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851–860.
22. **Masson, L., G. Préfontaine, L. Péloquin, P. C. K. Lau, and R. Brousseau.** 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.
23. **Masson, L., B. E. Tabashnik, Y.-B. Liu, R. Brousseau, and J.-L. Schwartz.** 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996–32000.
24. **Morse, R. J., T. Yamamoto, and R. M. Stroud.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409–417.
25. **Pigott, C. R., and D. J. Ellar.** 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:255–281.
26. **Rawn, J. D.** 1989. *Biochemistry*, p. 59. Neil Patterson Publishers, Burlington, NC.
27. **Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775–806.
28. **Schwartz, J.-L., M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Préfontaine, R. Brousseau, and L. Masson.** 1997. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**:397–402.

29. **Tigue, N. J., J. Jacoby, and D. J. Ellar.** 2001. The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5715–5720.
30. **Tran, L. B., V. Vachon, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4488–4494.
31. **Vachon, V., G. Préfontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J.-L. Schwartz, and R. Laprade.** 2002. Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* **41**:6178–6184.
32. **Vachon, V., G. Préfontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade, and L. Masson.** 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6123–6130.
33. **Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, V. F. Sacchi, B. Giordana, and G. M. Hanozet.** 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:301–308.

TABLE 1. Toxicity of Cry1Aa $\alpha 4$ mutants toward *M. sexta* larvae

Toxin	Toxin dose of 2 $\mu\text{g/ml}$		Toxin dose of 25 $\mu\text{g/ml}$	
	% Mortality ^a	Wt gain (mg) ^b	% Mortality	Wt gain (mg)
Cry1Aa (wild type)	95 \pm 2 (54)	— ^c	—	—
L126C	21 \pm 4 (6)**	12 \pm 2 (6)**	100 (6)	—
R127C	99.3 \pm 0.7 (6)	—	—	—
M130C	99.3 \pm 0.7 (6)	—	—	—
R131C	0 (6)**	59 \pm 6 (6)*	40 \pm 9 (12)**	11 \pm 2 (12)**
I132C	69 \pm 6 (6)**	—	—	—
Q133C	16 \pm 6 (6)**	16 \pm 9 (6)**	100 (6)	—
F134C	71 \pm 7 (6)**	—	—	—
N135C	1.4 \pm 0.9 (6)**	65 \pm 9 (6)	22 \pm 7 (6)**	50 \pm 10 (6)**
M137C	96 \pm 2 (6)	—	—	—
N138C	19 \pm 2 (6)**	16 \pm 3 (6)**	100 (6)	—
S139C	85 \pm 5 (6)	—	—	—
A140C	11 \pm 5 (6)**	32 \pm 7 (6)**	84 \pm 6 (6)*	—
L141C	93 \pm 4 (6)	—	—	—
T142C	11 \pm 4 (6)**	11 \pm 2 (6)**	98.6 \pm 0.9 (6)	—
A144C	0 (6)**	149 \pm 6 (6)	6 \pm 4 (6)**	14 \pm 2 (6)**
I145C	95 \pm 3 (6)	—	—	—
P146C	0 (6)**	44 \pm 8 (6)**	100 (6)	—
L147C	0 (6)**	180 \pm 10 (6)	0 (6)**	50 \pm 10 (6)*
A149C	97 \pm 2 (6)	—	—	—

^a Values, corrected by Abbott's formula, are means \pm standard errors of the mean with the number of independent experiments shown in parentheses. Student *t* test differences shown were calculated relative to the values obtained for Cry1Aa (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

^b Measured when mortality was lower than 50%. Student *t* test differences shown were calculated relative to the control values measured in the absence of toxin (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

^c —, not tested.

TABLE 2. Kinetic parameters of pore formation by Cry1Aa mutant toxins

Toxin	Delay (min) ^{a,b}		Rate (% volume recovery/min) ^{b,c}	
	pH 7.5	pH 10.5	pH 7.5	pH 10.5
Cry1Aa (wild type)	0.48 ± 0.06	0.65 ± 0.02	30 ± 7	21 ± 1
L126C	> 6	> 6	1.11 ± 0.07*	1.8 ± 0.6**
R127C	0.38 ± 0.08	0.6 ± 0.1	26 ± 1	19 ± 2
M130C	0.35 ± 0.08	0.59 ± 0.07	25 ± 3	23 ± 1
R131C	> 6	NA ^d	4.2 ± 0.9*	NA
I132C	1.0 ± 0.2	NA	5 ± 2*	NA
Q133C	2.2 ± 0.6*	> 6	2.5 ± 0.2*	0.2 ± 0.3**
F134C	0.5 ± 0.1	0.79 ± 0.04*	16 ± 1	9 ± 5
M137C	0.49 ± 0.06	0.78 ± 0.08	20 ± 3	16 ± 4
N138C	> 6	> 6	0.9 ± 0.2*	0.8 ± 0.8**
L141C	0.42 ± 0.06	1.0 ± 0.1*	20 ± 3	6 ± 3**
I145C	1.1 ± 0.1**	3.8 ± 0.5**	4 ± 2*	1.3 ± 0.6**
P146C	> 6	NA	0.9 ± 0.4*	NA
A149C	0.59 ± 0.06	1.17 ± 0.07**	15.2 ± 0.6	11 ± 2*

^a Delay is defined as the time required to reach 5% volume recovery. > 6, mutants for which 5% volume recovery was not reached within the time course of the experiments.

^b Significantly different from the corresponding value for Cry1Aa (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

^c Osmotic swelling rates correspond to the maximal slopes of the curves.

^d NA, not active.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Effects of the Cry1Aa mutant toxins A149C (A) and S139C (B) on the osmotic swelling of brush border membrane vesicles isolated from fifth-instar *M. sexta* larvae. Vesicles (0.4 mg membrane protein/ml) were equilibrated overnight in 10 mM HEPES-KOH, pH 7.5. Before the experiments, bovine serum albumin was added to a final concentration of 1 mg/ml, and the vesicles were incubated 1 hour with the indicated concentrations of toxin (in picomole of toxin/milligram of membrane protein). The vesicles were rapidly mixed with an equal volume of 150 mM KCl, 1 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM Hepes/KOH, pH 7.5, directly in a cuvette using a stopped flow apparatus. Osmotic swelling of the vesicles was monitored by measuring scattered light intensity at an angle of 90° in a PTI spectrofluorometer. Each tracing represents the average of five experiments performed with the same representative vesicle preparation.

FIG. 2. Dose-response curves for Cry1Aa mutant toxins. Experiments were performed as described in the legend to Fig. 1, except that 10 mM HEPES-KOH was replaced by 10 mM CAPS-KOH in the experiments carried out at pH 10.5. Values of percent volume recovery after 3 s were derived from curves similar to those shown in Fig. 1 as described under Materials and Methods. Significant differences with the corresponding values obtained for Cry1Aa are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

FIG. 3. Effects of mutant toxins on the permeability of brush border membrane vesicles to different salts. Membrane permeability was assayed using the experimental protocol described in the legend to Fig. 1 but replacing KCl with *N*-methyl-D-glucamine hydrochloride (A) or potassium gluconate (B) following incubation of the vesicles with 150 pmol toxin/mg membrane protein. Only those mutants that were able to permeabilize the membrane to KCl were tested for their effect on membrane permeability to the other solutes. Significant differences with the corresponding values obtained for Cry1Aa are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

FIG. 4. Effects of mutant toxins on the permeability of brush border membrane vesicles to oligosaccharides. Membrane permeability to the disaccharide sucrose (A) and

the trisaccharide raffinose (B) was assayed using the experimental protocol described in the legend to Fig. 1 following incubation of the vesicles with 150 pmol toxin/mg membrane protein. Only those mutants that were able to permeabilize the membrane to KCl were tested for their effect on membrane permeability to these solutes. Significant differences with the corresponding values obtained for Cry1Aa are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

FIG. 5. Kinetics of pore formation by Cry1Aa and the mutant toxins I145C and A149C at pH 7.5. Permeability of the vesicles to KCl was assayed as described in the legend to Fig. 1 except that the vesicles were not preincubated with the toxin. Instead, 150 pmol toxin/mg membrane of the indicated toxin was added to the KCl solution before mixing with the vesicles. Percent volume recovery was calculated for every experimental point and values obtained for control vesicles, assayed without added toxin, were subtracted from those obtained in the presence of toxin. For clarity, error bars are shown only every 50th experimental point.

FIG. 6. Summary of mutant pore-forming properties. Polar amino acid residues are circled, and non polar residues are boxed. The effect of their replacement by a cysteine residue on toxin pore-forming ability, deduced from osmotic swelling experiments, is indicated by the color of the circles and boxes: residues shown in black forms correspond to mutants that retained wild-type or near wild-type activity, those shown in white forms, correspond to mutants that retained a negligible or very low activity, and those shown in gray forms correspond to mutants that retained an intermediate activity. Data for E128C, E129C and D136C are derived from a previous study (32), and mutants corresponding to residues identified by crossed-out forms were not available for the present study.

Figure 1

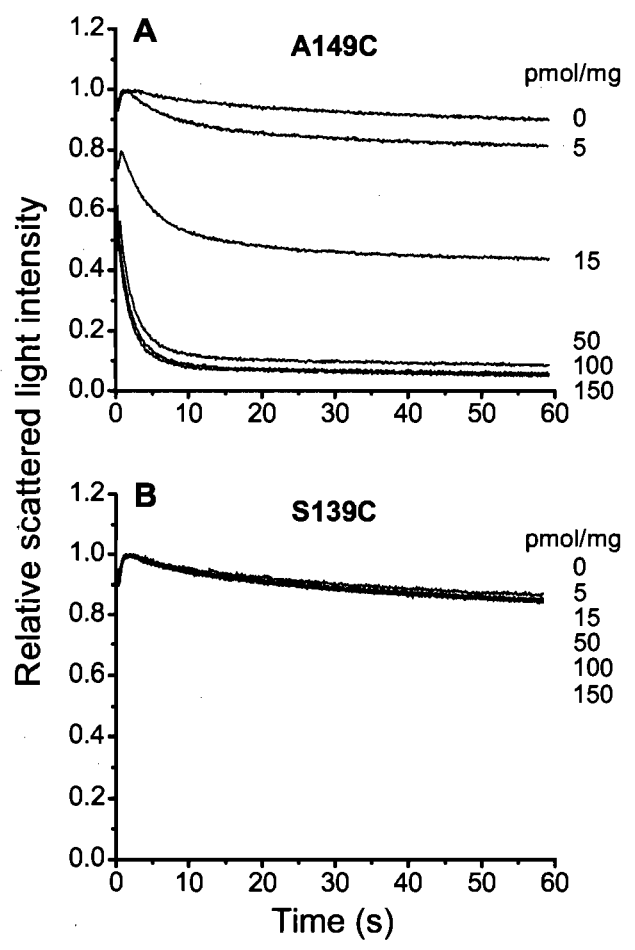


Figure 2

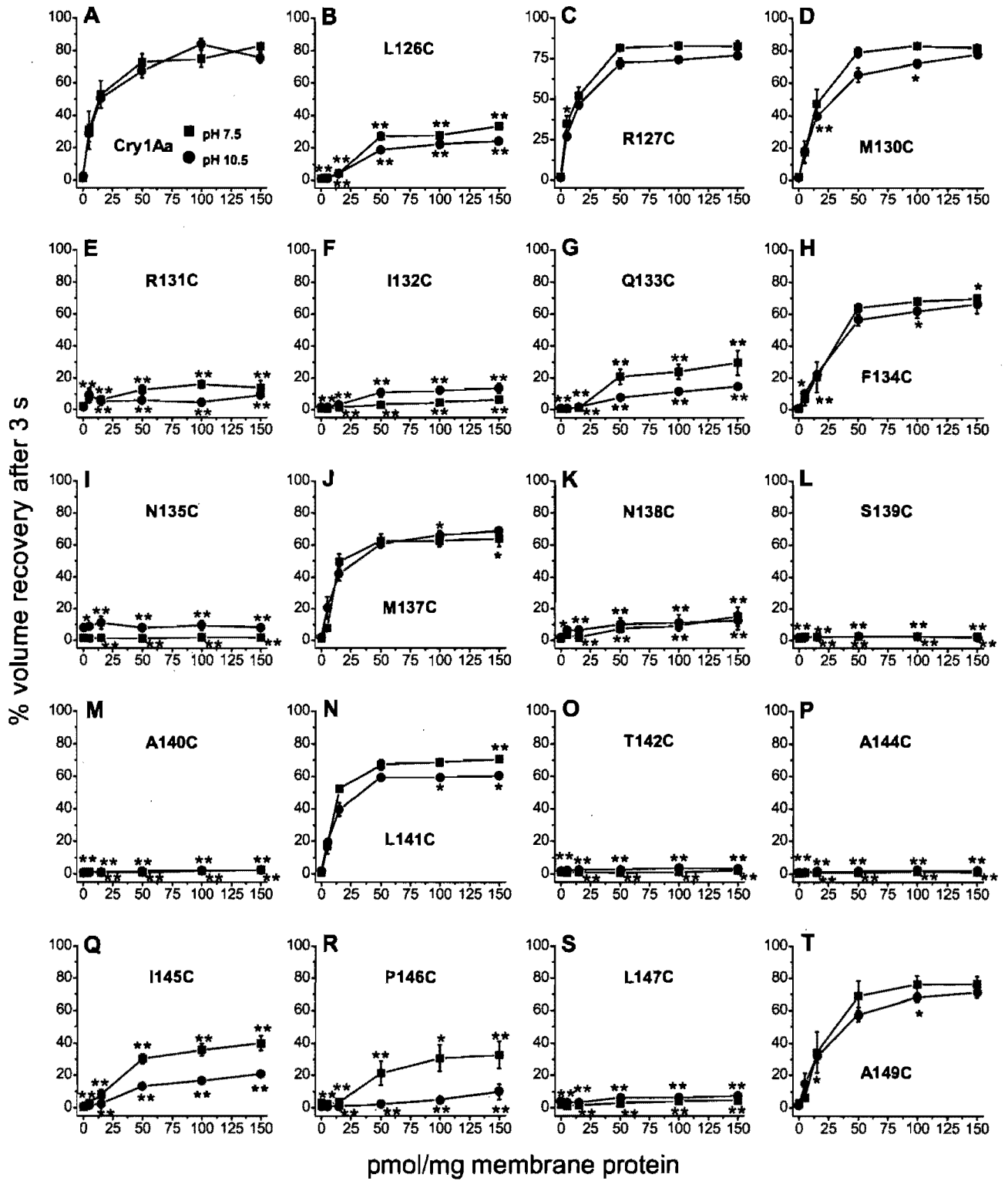


Figure 3

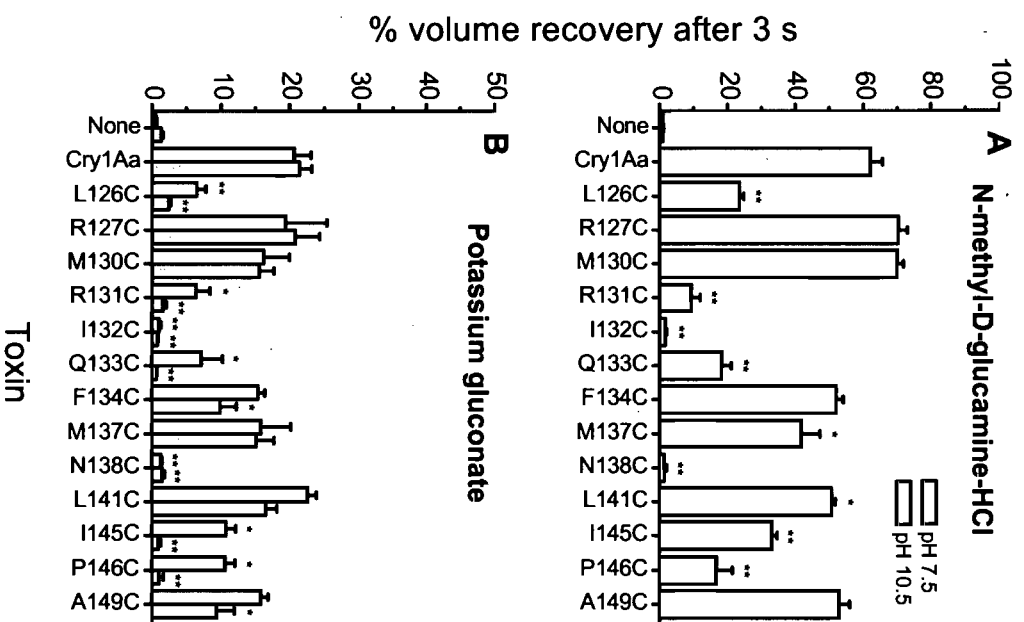


Figure 4

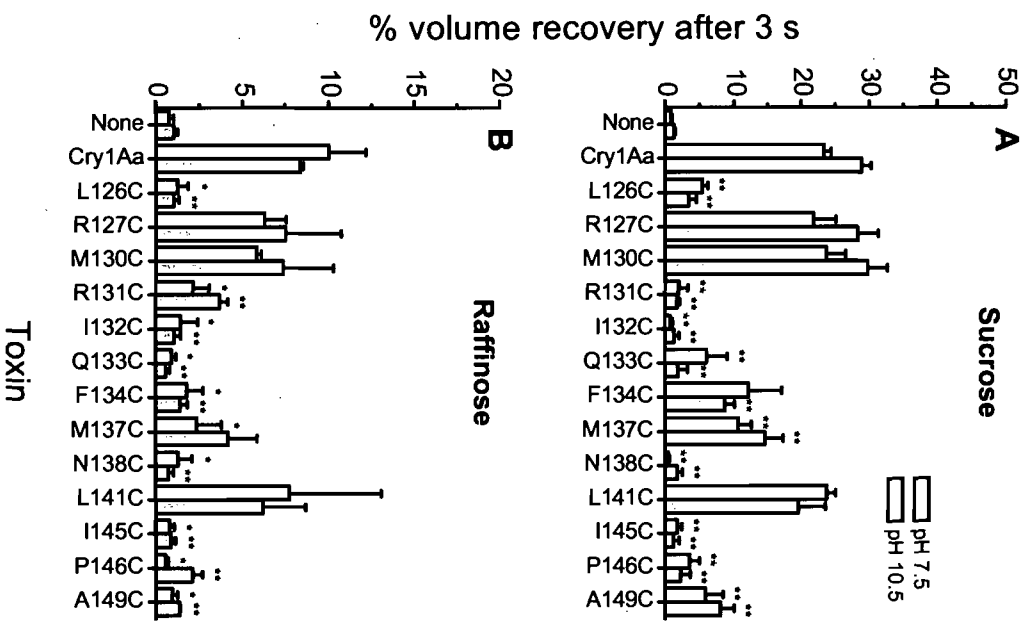


Figure 5

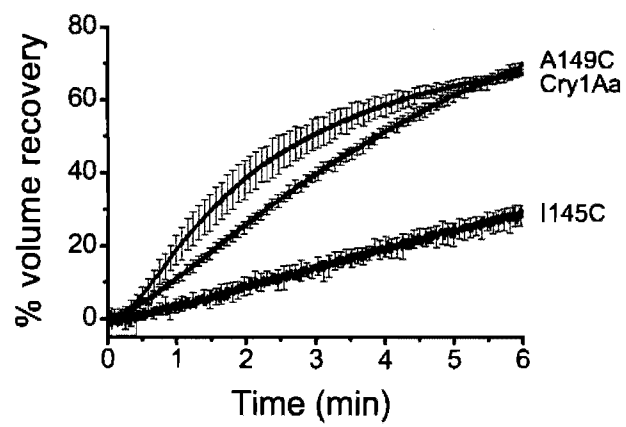
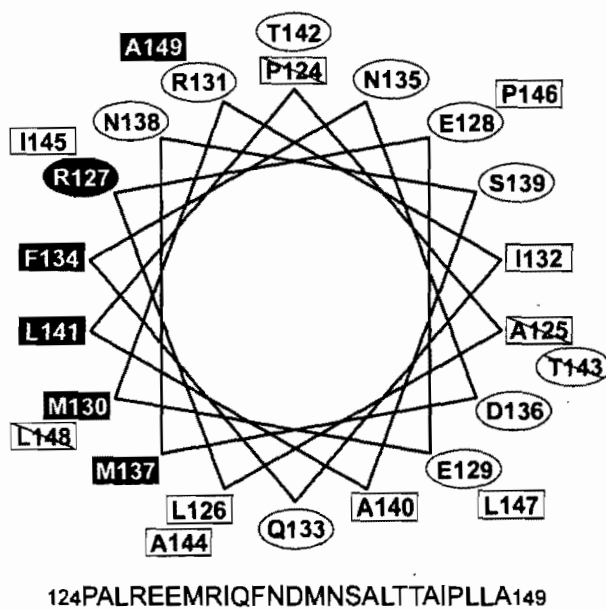


Figure 6



4. Helix α 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin plays a critical role in the post-binding steps of pore formation

Frédéric Girard, Vincent Vachon, Gabrielle Préfontaine, Lucie Marceau, Jean-Louis Schwartz, Luke Masson et Raynald Laprade

Applied and Environmental Microbiology, soumis le 27 mai 2008

Résumé

De nombreuses mutations portant sur des acides aminés situés du côté hydrophile de l'hélice α 4 de la Cry1Aa entraînent une diminution importante de la capacité de la toxine à former des pores. La possibilité qu'une modification de la structure tridimensionnelle de ces mutants par rapport à celle de la Cry1Aa et la formation de ponts disulfure intermoléculaires soient responsables de leur perte d'activité a été examinée. L'incubation de chaque mutant avec de la trypsine ou de la chymotrypsine pendant 12 h n'a pas mis en évidence un changement majeur de la structure de ces protéines. Par contre, le spectre de dichroïsme circulaire des mutants I132C, S139C et V150C est légèrement différent de celui de la Cry1Aa. De plus, la formation de ponts disulfure intermoléculaires a été observée pour plusieurs mutants. L'ajout de dithiothréitol augmente significativement l'activité des mutants E128C, I132C, S139C, T142C, I145C, P146C et V150C. Ceci explique partiellement la réduction d'activité de ces mutants puisque leur activité demeure tout de même inférieure à celle de la Cry1Aa. La fixation sur les récepteurs de chacun des mutants inactifs a été examinée à l'aide d'une technique de gonflement osmotique. Tous les mutants étudiés, à l'exception de L147C, sont capables d'inhiber la formation de pores par la Cry1Aa, ce qui indique qu'ils sont capables de se fixer sur les récepteurs. Ces résultats indiquent que l'hélice


$\alpha 4$ joue un rôle dans les étapes de formation des pores qui suivent la fixation sur les récepteurs.


Helix α 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin Plays a Critical Role
in the Post-Binding Steps of Pore Formation

Frédéric Girard,¹ Vincent Vachon,¹ Gabrielle Préfontaine,² Lucie Marceau,¹ Jean-Louis
Schwartz,¹ Luke Masson,² and Raynald Laprade^{1*}

*Groupe d'Étude des Protéines Membranaires, Université de Montréal,¹ and
Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada,² Montreal,
Quebec Canada*

Running Title: Role of Cry1Aa Helix α 4 in Pore Formation

* 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) 343-7924. Fax: (514) 343-7146. 



Helix $\alpha 4$ of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins is thought to play a critical role in their mode of action. Accordingly, single-site substitutions of many Cry1Aa helix $\alpha 4$ amino acid residues have previously been shown to cause substantial reductions in pore-forming activity. Changes in protein structure and formation of intermolecular disulfide bonds were investigated as possible factors responsible for the inactivity of these mutants. Incubation of each mutant with trypsin and chymotrypsin for 12 hours did not reveal overt structural differences with Cry1Aa although circular dichroism was slightly decreased in the 190-210-nm region for mutants I132C, S139C and V150C. Addition of dithiothreitol stimulated pore formation by E128C, I132C, S139C, T142C, I145C, P146C and V150C. However, in the presence of these mutants, membrane permeability never reached that measured with Cry1Aa, indicating that the formation of disulfide bridges could only partially explain their loss of activity. The ability of a number of inactive mutants to compete with wild-type Cry1Aa for pore formation in brush border membrane vesicles isolated from *Manduca sexta* was also investigated with an osmotic swelling assay. With the exception of L147C, all mutants tested could inhibit the formation of pores by Cry1Aa, indicating that they retained receptor binding ability. These results strongly suggest that helix $\alpha 4$ is mainly involved in the post-binding steps of pore formation.

During the last few decades, the insecticidal toxins produced by *Bacillus thuringiensis* have been used increasingly for the highly focused biological control of insect pests in the form of formulated sprays and in transgenic plants (29). At the same time, the mechanism by which these proteins form pores in the apical membrane of midgut epithelial cells of targeted insects has been studied extensively (7, 29). In the case of the three-domain Cry toxins, specificity is mostly attributable to their capacity to bind to certain proteins located at the surface of the intestinal membrane through specific segments of domains II and III composed mainly of β -sheets (16, 27). On the other hand, membrane insertion and pore formation are thought to occur through elements of domain I composed of a bundle of six amphipathic α -helices surrounding the highly hydrophobic helix α 5 (17, 19).

Several lines of evidence indicate that helices α 4 and α 5 play a particularly important role in these processes (3). Spectroscopic studies with synthetic peptides corresponding to domain I helices revealed that α 4 and α 5 have the best propensity to insert into artificial membranes although insertion and pore formation was most efficient when α 4 and α 5 were connected by a segment corresponding to the α 4- α 5 loop of the toxin (13,14). A particularly large number of single-site mutations altering amino acids from these helices which lead to a strong reduction in the toxicity and pore-forming ability of the toxin have been characterized (2, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 31, 33). Finally, a site-directed chemical modification study has provided strong evidence that α 4 lines the lumen of the pores formed by the toxin (23).

Recent studies have established that toxin activity is especially sensitive to modifications, not only in the charged residues of α 4 (31), but in most of its hydrophilic residues (15). Furthermore, the loss of activity of most of these mutants did not result from an altered selectivity or size of the pores, but from a reduced pore-forming capacity of the toxin (15, 31). In order to better understand the role of α 4 in the mechanism of pore formation, the present study was carried out with a series of previously characterized CryIAa mutants in which most of the residues from this helix were replaced by cysteines (15). By subjecting these mutants to circular dichroism, protease sensitivity, pore formation inhibition, and electrophoretic mobility analyses, our data

suggest that mutations in $\alpha 4$ which alter the pore-forming ability of Cry1Aa do so mainly by preventing the proper oligomerization or membrane insertion of the toxin.

MATERIALS AND METHODS

Toxin preparation. Several amino acids located in helix $\alpha 4$ and V150 located in the loop linking helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ have been replaced individually by a cysteine using oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis in *Escherichia coli* using the double oligonucleotide method (11). These mutations were created in the pMP39 plasmid (22) with the exception of E128C and N135C which were prepared in the *E. coli*-*B. thuringiensis* shuttle vector pBA1 (4).

Toxins were produced in *E. coli* or *B. thuringiensis* and activated by incubating 50 mg of protoxin in 40 ml of 50 mM carbonate buffer (pH 10.5) containing 50 mM NaCl and 5 mg trypsin (Gibco BRL, Burlington, Ontario) for 3 hours at 37°C. The toxins were then purified by fast protein liquid chromatography using a Mono-Q anion exchange column as described previously (21, 22).

Circular dichroism. The secondary structure of Cry1Aa mutants was analyzed by circular dichroism spectroscopy. Data were obtained from 190 nm to 280 nm with a Chirascan CD spectrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) at room temperature using a 0.2-mm optical path length and a toxin concentration of 0.5 mg/ml. Circular dichroism was measured every 0.5 nm with an integration time of 0.5 s and each experiment was repeated 10 times. Values measured for the solubilization buffer containing 150 mM KCl and 10 mM 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid-KOH (pH 10.5) were subtracted from the toxin spectra.

Electrophoresis and protein digestion. Proteolysis was analyzed by incubating 3 μ g of each of the inactive mutants (trypsin-activated for 3 hours) with 3 μ g of trypsin or chymotrypsin at 37°C. The reaction was stopped immediately after the addition of the protease or after 12 hours by boiling the samples for 5 min. The samples were diluted with loading buffer (final concentration of 100 mM dithiothreitol, 50 mM Tris-HCl, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol) and resolved by sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel electrophoresis (18). The gels were stained with

GelCode Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, IL) following the manufacturer's instructions.

To identify the possible formation of homo-dimers through a disulfide bridge, all of the helix α 4 mutants were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis as described above with the exception that 3 μ g of each toxin was mixed with loading buffer containing dithiothreitol or no reducing agent.

Preparation of brush border membrane vesicles. Brush border membrane vesicles were prepared from *Manduca sexta* midgut homogenates with a procedure involving magnesium precipitation and differential centrifugation (32).

Osmotic swelling assay. Toxin-induced permeability of brush border membrane vesicles was analyzed with a light-scattering assay (8). Toxins were first incubated in the presence or absence of 2 mM EDTA and 5 mM dithiothreitol at a concentration of 0.5 mg/ml for at least one hour. They were then incubated with the vesicles (0.4 mg membrane protein/ml, 10 mM HEPES-KOH and 1 mg/ml bovine serum albumin [pH 7.5]) for one hour. An osmotic shock was initiated by rapidly mixing the vesicles with an equal volume of a hypertonic salt solution (150 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, 1 mg/ml bovine serum albumin [pH 7.5]) using a stopped flow apparatus (Hi-Tech Scientific, Salisbury, UK). Vesicle volume was monitored by measuring the scattered light intensity at a wavelength of 450 nm with a photomultiplier tube at an angle of 90° relative to the incident light beam in a Photon Technology International (South Brunswick, NJ) spectrofluorometer. Data were recorded at 23°C every 0.1 s for 1 min. Percent volume recovery is defined as $100(1 - I_t)$, where I_t is the relative scattered light intensity at a given time t .

This technique was also used to study the ability of inactive mutants to compete with wild-type Cry1Aa for pore formation (9). In this competition assay, 500 pmol/mg of brush border membrane protein of each of the inactive mutants was present in the hypertonic solution with or without 50 pmol of Cry1Aa/mg of membrane protein. Vesicles were not preincubated with the toxins, but exposed to them as they were subjected to the osmotic shock. Scattered light intensity was monitored as described above for 6 min. Percent volume recovery was calculated for every experimental point. Values obtained for control vesicles in the absence of toxin were subtracted from those

measured in the presence of toxin. Data are means \pm standard errors of the means of three experiments carried out with a different vesicle preparation. Each replicate consists of the average of five traces obtained using the same vesicle preparation.

RESULTS

As changes in toxin structure are likely to affect its activity, several Cry1Aa mutants previously shown to be substantially inactive in osmotic swelling experiments using brush border membrane vesicles from *M. sexta* (15) were examined for structural alterations using different approaches.

Protease digestion. Changes in protein conformation could expose normally hidden proteolysis sites. Therefore, the mutants, previously activated with trypsin for three hours, were further incubated with either trypsin (Fig. 1A) or chymotrypsin (Fig. 1B) for 12 hours. The activated form of Cry1Aa had an apparent molecular mass of 60 kDa, as was the case for all mutants (Fig. 1A and 1B for time $t = 0$ h at which the activated toxin samples were boiled immediately after the addition of trypsin or chymotrypsin). The lower molecular weight bands present at $t = 0$ h correspond to trypsin (Fig. 1A) and chymotrypsin (Fig. 1B). No subsequent digestion was obvious after 12 hours of incubation with trypsin for either Cry1Aa or any one of its mutants (Fig. 1A). However, chymotrypsin was able to digest a fraction of the activated Cry1Aa to a protein of 55 kDa after 12 hours (Fig. 1B). All mutants were also partially degraded to a 55 kDa-fragment albeit to a variable extent, but no additional digestion was observed. Both proteases efficiently degraded bovine serum albumin after 12 hours (Fig. 1A, 1B).

Circular dichroism. Cry1Aa and most of its inactive mutants, such as T142C, had similar circular dichroism spectra. However, the spectra of mutants I132C, S139C and V150C deviate slightly from that of Cry1Aa between 190 and 210 nm, a region which is strongly influenced by the α -helical content of the protein (Fig. 2).

Homo-dimer formation. Introduction of a cysteine residue, an amino acid which is normally absent from Cry1Aa, could favor the formation of homo-dimers through a disulfide bridge and significantly impair the activity of the toxin. To investigate this possibility, cysteine mutants, both active and inactive, were analyzed by electrophoresis in the presence and absence of dithiothreitol. Cry1Aa and most mutants did not dimerize

(L126C, I132C, N138C, T142C, A144C, I145C, A149C and V150C) or only to a barely detectable level (E129C, R131C, N135C, A140C, P146C and L147C) (Fig. 3A). However, substantial amounts of dimers were observed for mutants R127C, E128C, M130C, Q133C, M137C and S139C or, to a lesser extent, for F134C and L141C. In all cases, the dimers dissociated when reducing agent was added to the loading buffer (Fig. 3B).

In order to investigate the effect of dimer formation on the activity of the mutant toxins, these were incubated for a least one hour in the presence of dithiothreitol prior to a one hour incubation period with the vesicles, in preparation for osmotic swelling experiments. Toxin concentrations for these experiments were chosen based on the previously observed activities of these mutants: 150 (Fig. 4A) and 50 (Fig. 4B) pmol of toxin/mg of membrane protein were used for those that had a reduced activity and for those that retained a near wild-type activity, respectively (15, 31). As expected, the reducing agent had no significant effect in light scattering experiments performed in the presence of Cry1Aa or in the absence of toxin (Fig. 4). However, significant increases in volume recovery were observed in the presence of dithiothreitol for mutants E128C, I132C, S139C T142C, I145C, P146C and V150C (Fig. 4A).

Competition assay. Binding of the inactive mutants was also investigated using a competition assay. For this assay, the vesicles were not preincubated with the toxin for one hour as in the previous experiments, and the rate of pore formation was monitored for 6 min following exposure to the toxins. Adding an excess of an inactive mutant that retains the ability to bind to its receptors should inhibit Cry1Aa-induced vesicle swelling. Concentrations of 50 pmol of Cry1Aa (Fig. 5A) and 500 pmol of each of the inactive mutants per mg of membrane protein were used in these experiments. In the absence of Cry1Aa, all mutants tested were nearly completely inactive (Fig. 5) with the exception of I132C (Fig. 5D) and N138C (Fig. 5F) for which a slight pore-forming activity was detected. Competition experiments were performed with a wild-type to mutant ratio of 50:500 pmol of toxin/mg of membrane protein. Mutants E129C (Fig. 5B) and N135C (Fig. 5E) completely inhibited pore formation by Cry1Aa. A strong inhibition was observed for mutants R131C (Fig. 5C), I132C (Fig. 5D), N138C (Fig.

5F), S139C (Fig. 5G), A140C (Fig. 5H), T142C (Fig. 5I), A144 (Fig. 5J) and V150C (Fig. 5L). Only mutant L147C was unable to inhibit pore formation (Fig. 5K).

DISCUSSION

Trypsin had no detectable effect on the activated form of Cry1Aa or its mutants (Fig. 1A). However, chymotrypsin was able to cleave part of Cry1Aa to a stable fragment of approximately 55 kDa (Fig. 1B and Table 1). These results suggest that chymotrypsin has access to a portion of the protein that could not be cleaved by trypsin. Similar findings were obtained with the mutant toxins when exposed to chymotrypsin although some appeared somewhat less susceptible to this digestion than Cry1Aa (Fig. 1B). However, there was no correlation between the extent of cleavage (Fig. 1B) and the pore-forming activity of the mutants (Fig.4).

Cry1Aa (17) shares a remarkably similar three-dimensional structure with other Cry toxins (5, 6, 12, 19, 24). As expected, the circular dichroism spectrum of Cry1Aa (Fig. 2) was also similar to those of other Cry toxins (1, 26, 28). Slight differences observed in the spectra of mutants I132C, S139C and V150C when compared with those of Cry1Aa and most of its mutants (Table 1) may help to explain their reduced ability to form pores (Fig. 4). As discussed below, these three mutants were among those that displayed a higher pore-forming ability in the presence of dithiothreitol. Therefore, their altered spectra may be a result of extraneous intermolecular disulfide bridging to a polypeptide fragment, possibly during activation.

The effect of dithiothreitol was tested on both the electrophoretic mobility (Fig. 3) and pore-forming ability (Fig. 4) of each mutant. This compound had no readily apparent effect on L126C, E129C, R131C, N135C, N138C, A140C, A144C, L147C and A149C, although trace amounts of a band corresponding to toxin dimers were detected for some of these mutants and disappeared after addition of the reducing agent (Table 1). On the other hand, mutants E128C and S139C displayed both disulfide-linked homo-dimer formation and dithiothreitol-stimulated pore-forming activity (Table 1). Increased volume recovery was especially notable for S139C which was almost completely inactive in the absence of reducing agent (Fig. 4A). Nevertheless, although homo-dimer formation may contribute to reduce the activity of both mutants, the proportion of

dimers detected, at least in the case of S139C (Fig. 3A), appears insufficient to account fully for the small activity measured for these mutants in the absence of dithiothreitol. Homo-dimer formation was readily detectable on polyacrylamide gels for mutants R127C, M130C, Q133C and M137C and to a lesser extent for mutants F134C and L141C (Fig. 3 and Table 1). However, addition of dithiothreitol had no significant effect on volume recovery measured in their presence (Fig. 4 and Table 1). For each of these mutants, the modified residue is located on or near the hydrophobic side of helix $\alpha 4$ and, according to the published structure of Cry1Aa, most of them face the core of the protein and are therefore not accessible to the solvent (17). The denaturing conditions used in these experiments probably exposed this region of the protein and allowed the formation of disulfide bridges which were absent under the non-denaturing conditions used in the osmotic swelling assay. The remaining mutants (I132C, T142C, I145C, P146C and V150C) did not display detectable homo-dimer formation, but did have significant dithiothreitol-enhanced pore-forming activity (Table 1). This group of mutants appears to have formed a disulfide bridge with other polypeptides. These could be molecules that are insufficiently large to alter significantly the electrophoretic mobility of the hetero-dimers. Alternatively, the mutant toxins could have reacted with large proteins during an early step in their preparation. This protein moiety would then have been largely degraded during the activation step in the presence of trypsin. Formation of such hetero-dimers, in addition to the homo-dimers discussed above, could also contribute to alter the activity of mutants E128C and S139C.

Previously published toxicity results for mutants E128C, S139C and I145C did not correlate well with their activity measured with the osmotic swelling assay (15, 31). For all three mutants, toxicity approached that of the wild-type toxin, but pore formation in brush border membrane vesicles was significantly reduced. These experiments, however, were conducted in the absence of a reducing agent. As stated above, addition of dithiothreitol strongly increased the activity of these mutants (Table 1). The reducing conditions present in the insect midgut therefore probably contribute to their higher *in vivo* activity. On the other hand, despite a significant stimulation of pore formation by I132C, T142C, P146C and V150C under reducing conditions, the activity of these

mutants remains significantly lower than that of Cry1Aa, at least qualitatively in agreement with their reduced toxicity.

A number of mutants were completely inactive or, in the case of I132C (Fig. 5D) and N138C (Fig. 5F), very slightly active, when tested alone at 500 pmol of toxin/mg of membrane protein (Fig. 5). These results are in agreement with those of previous experiments using 150 pmol of toxin/mg of membrane protein (15, 31) and imply that any volume recovery observed in the competition experiments illustrated in Fig. 5 is mainly due to the permeability induced by Cry1Aa. They also imply that a reduced activity relative to that of Cry1Aa in these competition experiments is due to the ability of the mutant to compete with Cry1Aa for its binding site on the membrane receptors (9). These experiments thus demonstrate that, with the exception of mutant L147C, all mutants tested retain the ability to bind to vesicles despite their poor pore-forming ability (Fig. 5 and Table 1). In agreement with these results and with the fact that helix $\alpha 4$ is identical in Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac, except for the amino acid at position 148, mutants N135Q from Cry1Ab and Cry1Ac (9, 30), and R131L, I132S, I132L, I132V, I132N and Q133R from Cry1Ac (20) have also been shown to bind to *M. sexta* brush border membrane vesicles despite their inability to increase membrane permeability.

To date, the only mutation altering a helix $\alpha 4$ residue in a Cry1 toxin to show an effect on receptor binding is L147C presented in this study. The reason for its inability to bind to the midgut membrane will nevertheless require further investigation since it does not appear to result from an altered secondary or tertiary structure or to the formation of a disulfide bond.

In summary, although disulfide bridge formation can account for some loss of activity for a few mutants (Table 1), it remains clear that other factors are also involved. For instance, the activity of E128C, in the absence of reducing agent, has previously been shown to be significantly increased by raising the pH from 7.5 to 10.5, a procedure which restores the negative charge on the mutated residue (31). Even for those mutants that were strongly stimulated by dithiothreitol, volume recovery values always remained lower than those measured for Cry1Aa. With one exception, all mutations tested herein that caused a loss of pore-forming ability did not prevent binding of the toxin to its

receptors. In addition, no obvious structural alteration could explain the loss of activity of the resulting mutants. This implies that these mutations primarily affect later steps in pore formation including either toxin oligomerization or insertion into the membrane, or both. In any case, the results of the present study underscore the importance of helix $\alpha 4$ in the mechanism of pore formation and in particular in its post-binding steps.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Andreea Schmitzer, Université de Montréal, for kindly giving us the possibility to perform the circular dichroism experiments and for her valuable advice.

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, and Valorisation-Recherche Québec.

REFERENCES

1. **Arnold, S., A. Curtiss, D. H. Dean, and O. Alzate.** 2001. The role of a proline-induced broken-helix motif in α -helix 2 of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *FEBS Lett.* **490**:70-74.
2. **Aronson, A. I., C. Geng, and L. Wu.** 1999. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2503-2507.
3. **Aronson, A. I., and Y. Shai.** 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:1-8.
4. **Bah, A., K. van Frankenhuyzen, R. Brousseau, and L. Masson.** 2004. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invertebr. Pathol.* **85**:120-127.
5. **Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar, and J. Li.** 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**:363-382.

6. **Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat, and J. Lescar.** 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**:3391-3401.
7. **Bravo, A., S. S. Gill, and M. Soberón.** 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**:423-435.
8. **Carroll, J., and D. J. Ellar.** 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**:771-778.
9. **Cooper, M. A., J. Carroll, E. R. Travis, D. H. Williams, and D. J. Ellar.** 1998. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem. J.* **333**:677-683.
10. **Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S.-J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara, and S. R. Hussain.** 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis - a minireview. *Gene* **179**:111-117.
11. **Deng, W. P., and J. A. Nickoloff.** 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**:81-87.
12. **Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn, and L. English.** 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**:1101-1109.
13. **Gazit, E., P. La Rocca, M. S. P. Sansom, and Y. Shai.** 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.
14. **Gerber, D., and Y. Shai.** 2000. Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**:23602-23607.
15. **Girard, F., V. Vachon, G. Préfontaine, L. Marceau, Y. Su, G. Larouche, C. Vincent, J.-L. Schwartz, L. Masson, and R. Laprade.** 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.
16. **Gómez, I., L. Pardo-López, C. Muñoz-Garay, L. E. Fernandez, C. Pérez, J. Sánchez, M. Soberón, and A. Bravo.** 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* **28**:169-173.
 17. **Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler.** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**:447-464.
 18. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
 19. **Li, J., J. Carroll, and D. J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**:815-821.
 20. **Manoj Kumar, A. S., and A. I. Aronson.** 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181**:6103-6107.
 21. **Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas, and R. Brousseau.** 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**:851-860.
 22. **Masson, L., G. Préfontaine, L. Péloquin, P. C. K. Lau, and R. Brousseau.** 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.
 23. **Masson, L., B. E. Tabashnik, Y.-B. Liu, R. Brousseau, and J.-L. Schwartz.** 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996-32000.
 24. **Morse, R. J., T. Yamamoto, and R. M. Stroud.** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**:409-417.

25. **Nuñez-Valdez, M., J. Sánchez, L. Lina, L. Güereca, and A. Bravo.** 2001. Structural and functional studies of α -helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**:122-131.
26. **Park, H.-W., and B. A. Federici.** 2004. Effect of specific mutations in helix α 7 of domain I on the stability and crystallization of Cry3A in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Biotechnol.* **27**:89-100.
27. **Pigott, C. R., and D. J. Ellar.** 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:255-281.
28. **Puntheeranurak, T., P. Uawithya, L. Potvin, C. Angsuthanasombat, and J.-L. Schwartz.** 2004. Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its α 1- α 5 fragment. *Mol. Membr. Biol.* **21**:67-74.
29. **Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
30. **Tigue, N. J., J. Jacoby, and D. J. Ellar.** 2001. The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5715-5720.
31. **Vachon, V., G. Préfontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade, and L. Masson.** 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6123-6130.
32. **Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, V. F. Sacchi, B. Giordana, and G. M. Hanozet.** 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**:301-308.
33. **Wu, D., and A. I. Aronson.** 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:2311-2317.

TABLE 1. Summary of results^a

Toxin	Chymotrypsin digestion ^b	Circular dichroism ^c	Effect of DTT		Competition ^f
			SDS-PAGE ^d	Pore formation ^e	
Cry1Aa	partial		—	—	
L126C			—	—	
R127C			++	—	
E128C			++	+	
E129C	minor	wild-type	trace	—	complete
M130C			++	—	
R131C	minor	wild-type	trace	—	strong
I132C	partial	lower	—	+	strong
Q133C			++	—	
F134C			+	—	
N135C	minor	wild-type	trace	—	complete
M137C			++	—	
N138C	minor	wild-type	—	—	strong
S139C	minor	lower	++	+	strong
A140C	partial	wild-type	trace	—	
L141C			+	—	
T142C	minor	wild-type	—	+	strong
A144C	partial	wild-type	—	—	strong
I145C			—	+	
P146C			trace	+	
L147C	minor	wild-type	trace	—	none
A149C			—	—	
V150C	minor	lower	—	+	strong

^a Experiments were only performed with the indicated mutants.

^b Apparent amount of digestion of the toxin to a fragment of about 55 kDa.

^c Compared with the Cry1Aa spectrum. "Wild-type" indicates that the spectrum of the mutant was similar to that of Cry1Aa, and "lower" indicates a decrease in the α -helical content of the protein.

^d Presence of a band corresponding to a 120 kDa protein characteristic of homo-dimers in polyacrylamide gels, in the absence of dithiothreitol, in substantial (++) , moderate (+) or trace amounts. Absence of homo-dimer bands is indicated by —.

^e Presence of disulfide bridges as revealed by the effect of dithiothreitol on pore formation. Addition of dithiothreitol had either no effect (—) or increased (+) toxin activity.

^f Ability of each mutant to inhibit the formation of pores by Cry1Aa.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Protease sensitivity of Cry1Aa and its inactive mutants. Samples (3 μg) of each of the indicated toxins were incubated with 3 μg of trypsin (A) or chymotrypsin (B) at 37°C. The reaction was stopped at the beginning of the experiment or after 12 h by boiling the samples for 5 min. The samples were then analyzed by sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel electrophoresis.

FIG. 2. Circular dichroism spectra of wild-type and mutant toxins. Data were obtained with a Chirascan CD spectrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) at room temperature using a 0.2-mm optical path length and a toxin concentration of 0.5 mg/ml. Traces shown correspond to the average of 10 replicate scans.

FIG. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis (10% polyacrylamide) of Cry1Aa and its mutants in the absence (A) and presence (B) of dithiothreitol. Each well contained 3 μg of the indicated toxin.

FIG. 4. Effect of dithiothreitol on pore formation by Cry1Aa and its mutants. Each toxin was first incubated in the presence (black bars) and absence (white bars) of 2 mM EDTA and 5 mM dithiothreitol at a concentration of 0.5 mg/ml for a least one hour. Vesicles (0.4 mg membrane protein/ml) isolated from 5th-instar larvae were equilibrated overnight in 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5). Before the experiments, bovine serum albumin was added to a final concentration of 1 mg/ml. The toxin was then incubated for one hour with the vesicles prior to the experiment at a concentration of 150 pmol of toxin/mg of membrane protein for mutants with reduced activity (A) or 50 pmol of toxin/mg of membrane protein for those with near wild-type activity (B). The vesicles were then rapidly mixed with an equal volume of a solution containing 150 mM KCl, 1 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM HEPES-KOH (pH 7.5) directly in a cuvette using a stopped flow apparatus. Osmotic swelling of the vesicles was monitored by measuring scattered light intensity at an angle of 90°. Significant Student *t*-test differences between values obtained in the presence and absence of dithiothreitol are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

FIG. 5. Competitive binding assay between Cry1Aa and its inactive mutants. Permeability of the vesicles to KCl was assayed as described in the legend of Fig. 4 except that the toxins were not preincubated with the vesicles but mixed with the KCl solution prior to the osmotic shock. Indicated concentrations (Cry1Aa:Mutant) are in pmol of toxin/mg of membrane protein. Volume recovery was calculated for every experimental point and values obtained for control vesicles, assayed without added toxin, were subtracted from those obtained in the presence of toxin. For clarity, error bar are shown for every 50th experimental point.

Figure 1

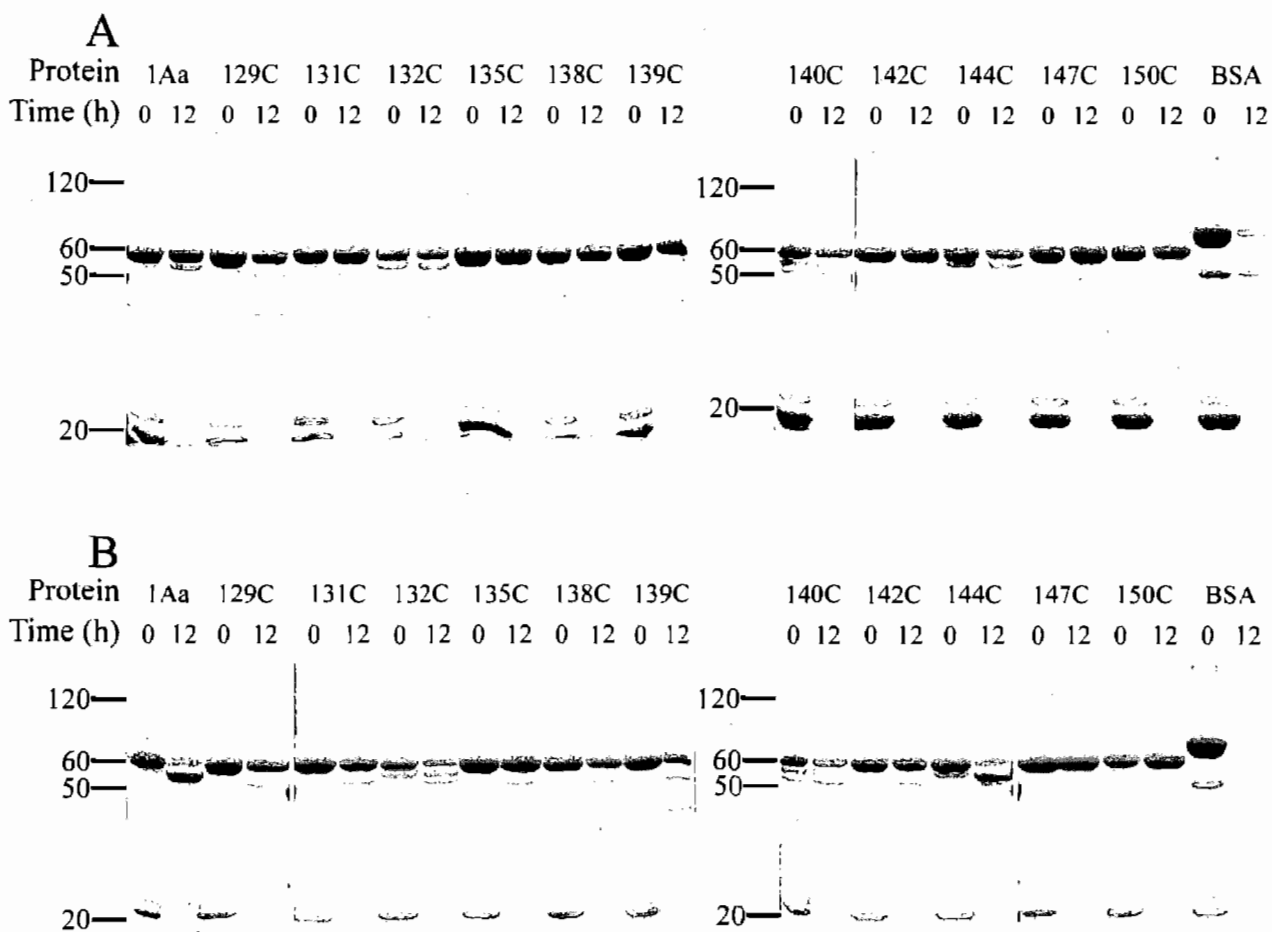


Figure 2

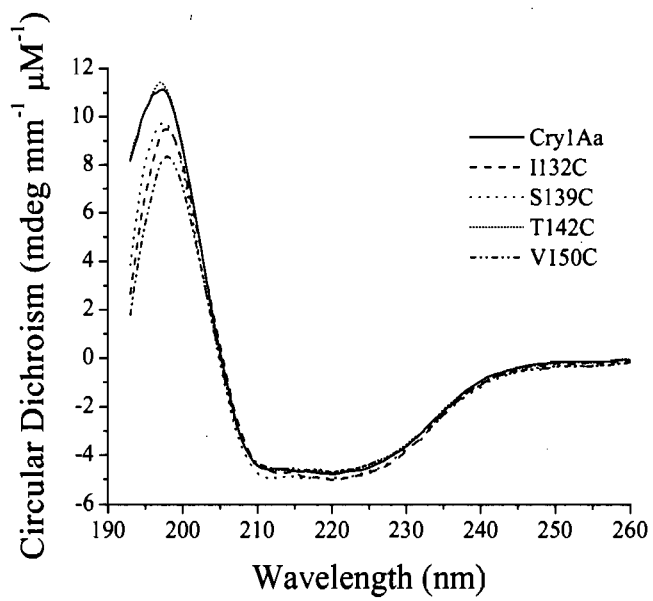


Figure 3

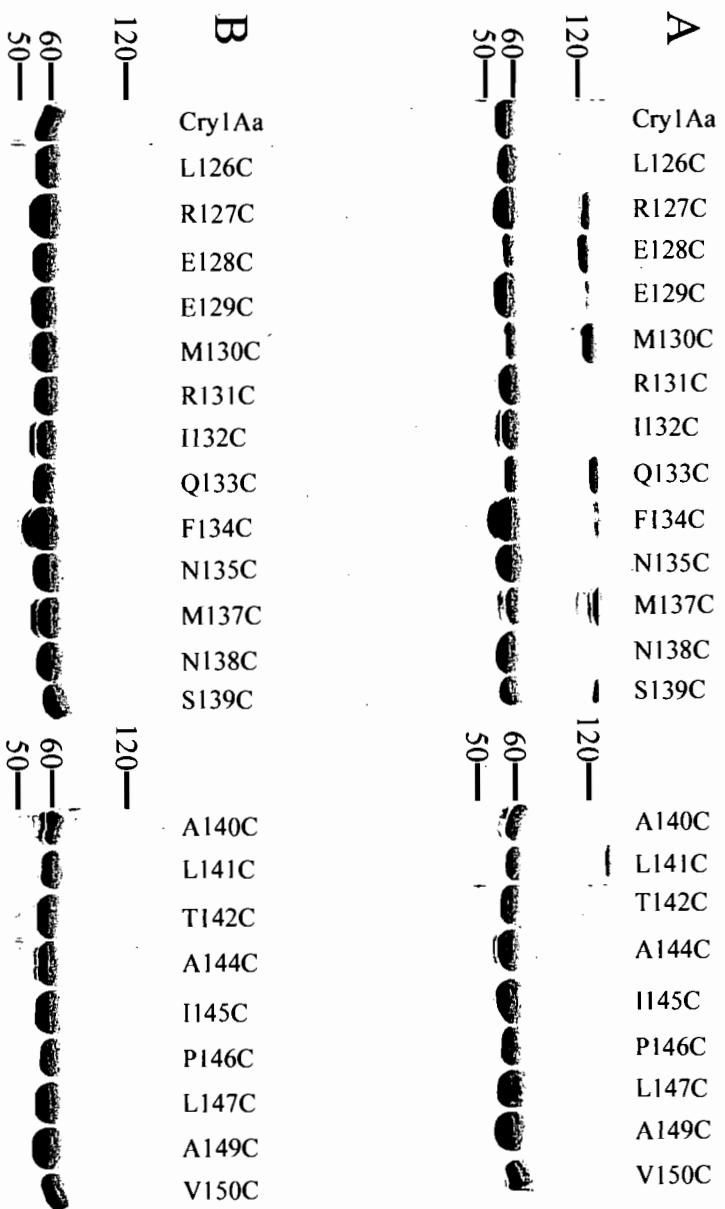


Figure 4

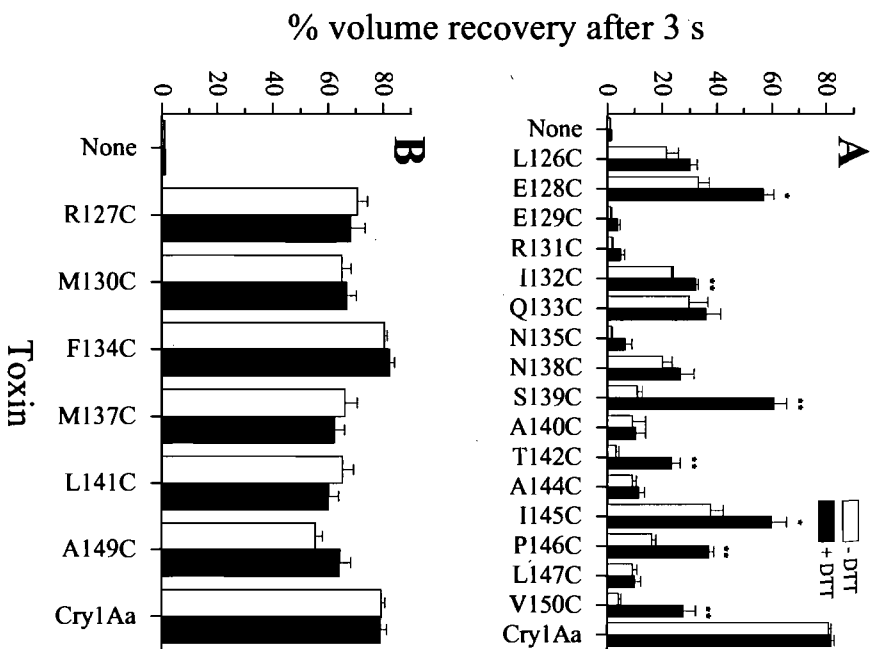
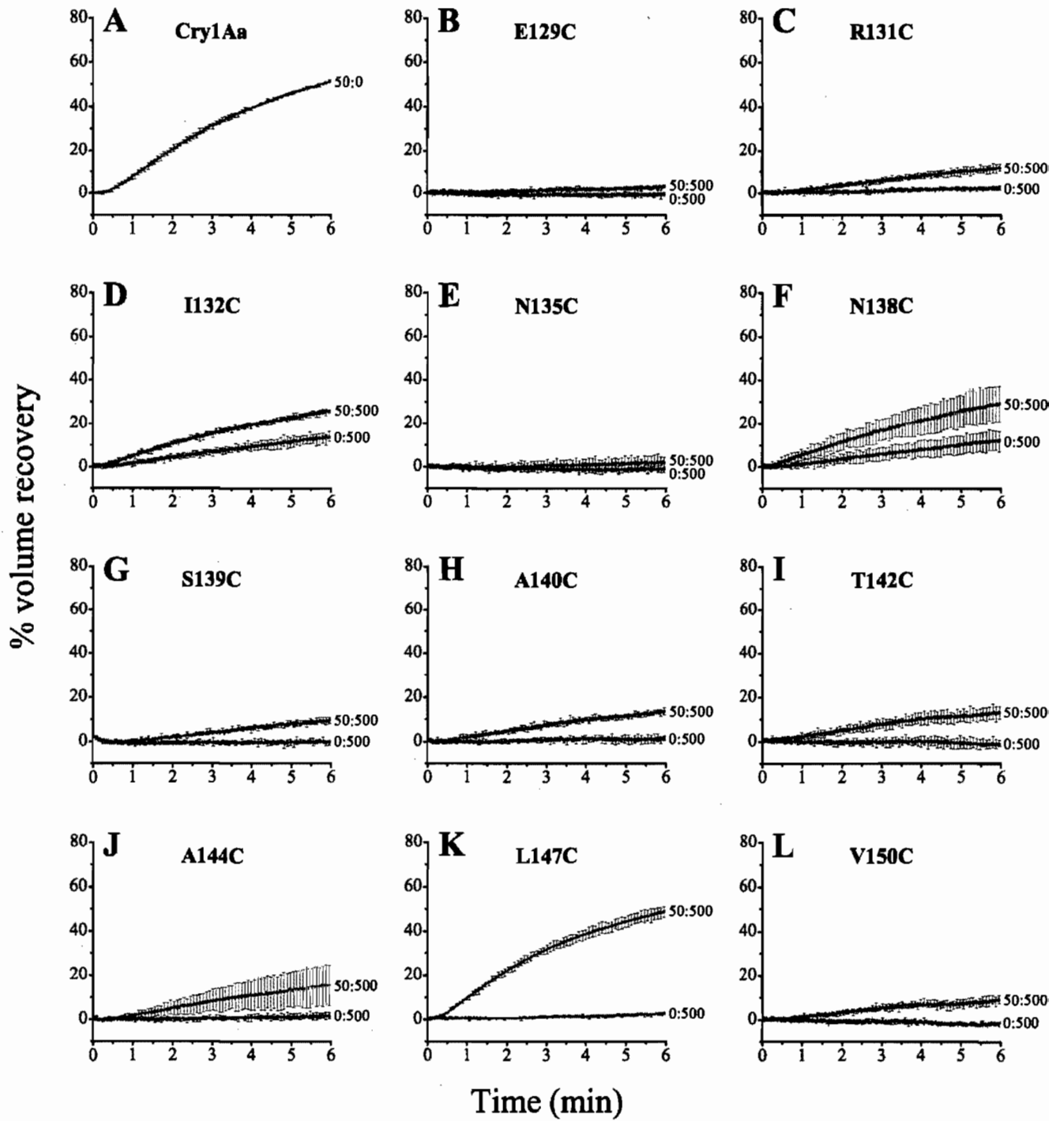


Figure 5



5. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation

Frédéric Girard, Vincent Vachon, Geneviève Lebel, Gabrielle Préfontaine, Jean-Louis Schwartz, Luke Masson and Raynald Laprade

Biochimica et Biophysica Acta, soumis en août 2008

Résumé

Les toxines Cry de *Bacillus thuringiensis* agissent en formant des pores dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen des insectes visés. Afin d'étudier le mécanisme d'insertion de la protéine dans la membrane, des mutants cystéine de la Cry1Aa ont été modifiés avec des réactifs méthane-thiosulfonate. Le groupement thiol des cystéines s'oxyde fortement sous forme d'oxyacide de soufre et sa réactivité augmente significativement lorsque chaque mutant est produit en conditions réductrices. La modification chimique de chaque mutant avec un agent contenant une biotine n'a pas d'effet significatif sur la formation des pores, sauf pour S252C dont l'activité est légèrement réduite et pour Y153C dont l'activité est fortement augmentée. La formation de pores par le mutant Y153C est aussi significativement stimulée lorsqu'il est modifié avec des agents qui introduisent, sur la cystéine, un groupement contenant une charge négative ou positive, ou un groupement aromatique. L'addition de streptavidine inhibe de façon significative la formation de pores par plusieurs mutants biotinylés dont la mutation porte sur un résidu situé à l'intérieur ou près des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$. Ces résultats corrélerent bien avec les prédictions du modèle d'insertion en parapluie.

Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation

Frédéric Girard^a, Vincent Vachon^a, Geneviève Lebel^a, Gabrielle Préfontaine^b, Jean-Louis Schwartz^a, Luke Masson^b, Raynald Laprade^{a,*}

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

^b*Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2*

* Corresponding author. Groupe d'étude des protéines membranaires, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Centre Ville Station, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7. Tel.: +1 514 343 7960; fax: +1 514 343 7146.

Keywords: Insecticidal toxin; Site-directed sulfhydryl modification; Membrane insertion; Pore formation; *Bacillus thuringiensis*; *Manduca sexta*

Abstract

Bacillus thuringiensis Cry toxins form pores in the apical membrane of insect larval midgut cells. To investigate their mechanism of membrane insertion, mutants in which cysteine replaced individual amino acids located within the pore-forming domain of Cry1Aa were chemically modified with sulfhydryl-specific reagents. The thiol group of cysteine was highly susceptible to oxidation and its reactivity was significantly increased when the toxins were purified under reducing conditions. Addition of a biotin group to the cysteine had little effect on the ability of the toxins to permeabilize *Manduca sexta* brush border membrane vesicles except for a slight reduction in activity for S252C and a large increase in activity for Y153C. The activity of Y153C was also significantly increased after modification by reagents that added an aromatic or a charged group to the cysteine. When permeability assays were performed in the presence of streptavidin, a large biotin-binding protein, the pore-forming activity of several mutants, including Y153C, where the altered residue is located within the hairpin comprising helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$, or in adjacent loops, was significantly reduced. These results support the umbrella model of toxin insertion.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis produces a variety of proteins with insecticidal activity [1,2]. These include the Cyt and Cry proteins, which are most often produced as crystalline inclusions during sporulation, and the Vip proteins, which are secreted during the vegetative phase of growth. Cyt proteins are specifically toxic to certain species of Diptera in vivo and cytolytic to most cultured cells in vitro. Cry toxins form a large family of proteins that are collectively active against insects of several orders and other invertebrate species. Although the mode of action of all these toxins has not been fully elucidated, members of each family appear to interact with the apical membrane of the intestinal epithelium of susceptible insects.

In the case of the three-domain Cry toxins, the protein first binds to specific receptors located at the surface of the intestinal membrane. This interaction is mediated by elements of domains II and III, mainly composed of β -sheets [3,4]. Receptor binding triggers the insertion of the toxin into the membrane and the formation of large pores that abolish vital transmembrane ionic gradients. These pores allow the diffusion of a wide variety of charged and uncharged solutes, but display a slight cationic selectivity [5]. Their formation is attributable to domain I, composed of six amphipathic α -helices surrounding a hydrophobic helix ($\alpha 5$) [6-8].

During the course of studies aimed at evaluating the contribution of different domain I structural elements in the mechanism of pore formation, a large number of mutant Cry1Aa toxins have been created in which a single, strategically located amino acid was replaced by cysteine. The altered residues include charged amino acids of $\alpha 3$ [9], numerous amino acids located in the inter-helical loops of domain I [9,10] and almost all residues of $\alpha 4$, the helix that is thought to line the pore lumen [11-13]. The activity of these mutants, analyzed with an osmotic swelling assay based on scattered light intensity measurements, varied considerably. Although most $\alpha 3$ and domain I loop mutants showed a near wild-type activity at pH 7.5, several of them were less efficient than Cry1Aa when tested at pH 10.5 [9,10]. On the other hand, most $\alpha 4$ mutants were considerably less active than the unaltered Cry1Aa toxin, especially when the substituted amino acid was located on the hydrophilic face of the helix [11-13].

In the present study, we have taken advantage of the unique chemical properties of the thiol group of cysteine and of the fact that this amino acid is absent from the wild-type activated Cry1Aa toxin [7]. The toxins selected for these experiments include those inter-helical loop mutants that were toxic and displayed a pore-forming activity comparable to that of Cry1Aa at pH 7.5 and that could be produced in sufficient quantities [9,10], as well as R127C, the only α 4 cysteine mutant with wild-type activity in which the altered residue was hydrophilic and surface-exposed [11–13]. The effects of thiol-specific reagents on the pore-forming activity of these mutants was only evident when the mutated amino acid was part of the α 4- α 5 hairpin, or of the adjacent α 3- α 4 and α 5- α 6 loops, indicating that these structural elements play a major role in the mechanism of pore formation.

2. Materials and methods

2.1. Mutagenesis and toxin preparation

The Cry1Aa cysteine mutants used in this study were prepared in *Escherichia coli* with the double oligonucleotide site-directed mutagenesis method [14] and the pMP39 plasmid [15] except for W219C which was prepared in the *E. coli*-*B. thuringiensis* shuttle vector pBA1 [16]. Their pore-forming properties have been reported previously [9–13]. Toxins were produced in *E. coli*, or *B. thuringiensis* for W219C, activated with trypsin, and purified by fast protein liquid chromatography with a Mono-Q anion exchange column as described previously [15,17]. For most experiments, however, the purification was performed under reducing conditions to minimize the oxidation of the thiol group of cysteine. This was done by adding 2 mM EDTA as soon as the bacterial growth was completed and during all subsequent steps, and 5 mM dithiothreitol during all purification steps following the incubation with trypsin. Each toxin was concentrated by ultra-filtration with 30-kDa cutoff Amicon regenerated cellulose membranes (Millipore, Bedford, MA) after purification. In preparation for the experiments, EDTA and dithiothreitol were removed by dialysis against buffer containing 100 mM KCl and 10 mM HEPES-KOH, pH 7.5, from which oxygen had been removed by extensive

bubbling of nitrogen gas through the solution. Toxin samples were then stored in nitrogen-flushed sealed vials until use.

2.2. Chemical modification

Chemical modification with N-biotinylaminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA-biotin) was performed on each of the mutants in the buffer used for dialysis. Depending on the mutant, the reaction mixture contained 260 to 1570 μg of toxin per ml and the reagent in a toxin:MTSEA-biotin molar ratio of 1:10. The toxins thus modified were used for osmotic swelling experiments after having been incubated for at least an hour with or without 2 μg of streptavidin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont.) per μg of toxin. Other reagents, 2-aminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA), (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate (MTSES), 4-(hydroxymethyl)benzyl methanethiosulfonate (MTSHMB) were also used with mutant Y153C at the same molar ratio as was used for MTSEA-biotin. All methanethiosulfonate reagents were obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Ont.) and all reactions were carried out at room temperature for at least one hour.

2.3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using 10% acrylamide gels under standard conditions [18]. Each toxin (3 μg per well) was diluted in sample buffer (final concentrations of 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (w/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate, and 0.1% (w/v) bromophenol blue) in the presence or absence of 100 mM dithiothreitol and boiled for 5 min before electrophoresis. Gels were either stained with GelCode Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, IL) following the manufacturer's instructions, or used for western blot analysis (section 2.4).

2.4. Western blot

The reactivity of the cysteine thiol group of each mutant protein was analyzed by western blot. Each mutant (100 ng) was first modified with MTSEA-biotin as described in section 2.2. After electrophoretic migration in a 10%-acrylamide sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel in the presence or absence of dithiothreitol, the proteins were transferred onto a Immobilon-P polyvinylidene fluoride membrane (Millipore) in an EC140 mini blot module transfer cassette (E-C Apparatus, Milford, MA) under a 200 V potential difference for two hours. The buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine and 10% (v/v) methanol) was maintained at 4°C throughout the transfer. Non-specific binding sites were blocked with a solution containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 2.5% (w/v) bovine serum albumin and 0.1% (w/v) Tween-20. The membrane was then incubated with 5 µg of horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Pierce) in 10 ml of TGG buffer (0.5% (w/v) Tween-20, 10% (w/v) glycerol, 1 M glucose, 250 mM NaCl, and 100 mM sodium phosphate, pH 7.2) during one hour at room temperature. The membrane was finally rinsed four times for ten minutes with a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl and 0.1% (w/v) Tween-20. Labeled proteins were detected by enhanced chemiluminescence using the reagents from Amersham (Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Preparation of brush border membrane vesicles

Fertilized eggs of *M. sexta* were purchased from the North Carolina State University Entomology Department insectary (Raleigh, NC) and larvae were raised on a standard artificial diet supplied with the eggs. Brush border membrane vesicles were prepared from whole midgut homogenates with a procedure involving magnesium precipitation and differential centrifugation [19].

2.6. Osmotic swelling assay

Kinetics of pore formation in *M. sexta* brush border membrane vesicles were analyzed with an osmotic swelling assay based on scattered light intensity measurements [20]. Vesicles (0.4 mg membrane protein per ml) suspended in 10 mM HEPES-KOH, pH 7.5, and 1 mg/ml bovine serum albumin were rapidly mixed with an equal volume of a solution containing 150 pmol of the desired toxin per mg of membrane protein, 150 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.5, and 1 mg/ml bovine serum albumin using a stopped-flow apparatus (Hi-Tech Scientific, Salisbury, UK). Volume changes were monitored at room temperature by measuring the intensity of scattered light at an angle of 90° from the incident beam at a wavelength of 450 nm with a photomultiplier tube in a Photon Technology International (South Brunswick, NJ) spectrofluorometer.

Data were recorded every 0.1 s for 6 min and normalized relative to the maximum value obtained for control vesicles in the absence of toxin. Scattered light intensity is an inverse function of vesicle volume and percent volume recovery was defined as $100(1 - I_t)$, where I_t is the relative scattered light intensity at a given time t . Volume recovery values were calculated for every experimental point and control values obtained in the absence of toxin were subtracted from those measured in the presence of toxin.

3. Results and discussion

The goal of the present study was to investigate the effects of sulfhydryl-specific reagents on the pore-forming properties of selected Cry1Aa cysteine mutants. In initial experiments, however, these effects appeared very modest for all mutants tested and tended to become gradually less evident as the samples were stored for long periods before they were chemically modified (data not shown). It was therefore suspected that the reactivity of our mutants could be lowered because their cysteine residues were being converted to cysteic acid derivatives. The thiol group of cysteine is indeed susceptible to oxidation to sulfenic (-SOH), sulfinic (-SO₂H) and sulfonic (-SO₃H) acids [21–23]. These derivatives cannot react with thiol-specific reagents, and their formation, in addition to being very poorly reversible, is favored by several factors which are part

of the conditions generally used for the purification of *B. thuringiensis* Cry toxins. These factors include exposure to molecular oxygen, due to extensive vortexing of the samples, the presence of metallic cations which catalyze the reaction, and high pH [21–23]. To minimize oxidation of the thiol group, all mutants were therefore produced in the presence of a chelating agent, EDTA, and a reducing agent, dithiothreitol, under the conditions described in section 2.2. The latter compound was added only after the activation step as it interferes with the catalytic activity of trypsin.

Mutant reactivity was analyzed by western blotting after chemical modification with MTSEA-biotin. Following migration on polyacrylamide gels in the absence of dithiothreitol and transfer to polyvinylidene fluoride membranes, biotinylated proteins were labeled with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin and detected by chemiluminescence (Fig. 1A). All mutants prepared under reducing conditions were labeled with MTSEA-biotin although the level of their reactivity varied. P121C, N123C and R127C displayed the most intense signal, but T122C, Y153C, W219C and S252C also showed a strong reactivity. On the other hand, F50C, D120C, Q151C and W182C were less intensely labeled than the other toxins. These differences may be the result of lower cysteine accessibility to the solvent, and hence to the reagent, or to a higher level of oxidation in those mutants with lower reactivity. All reactions could be reversed by the addition of dithiothreitol in the sample buffer, indicating that the labeling resulted specifically from the formation of a disulfide bond between cysteine and the methanethiosulfonate reagent (Fig. 1B). When similar experiments were carried with mutants produced under our usual conditions [15,17], their reactivity was considerably weaker than when they were produced under reducing conditions (data not shown). Toxins prepared with the new procedure were therefore used in all subsequent experiments.

The ability of each mutant to increase the permeability of *M. sexta* midgut brush border membrane vesicles was tested at pH 7.5 using an osmotic swelling assay (Fig. 2). All mutants permeabilized the membrane at a rate which was comparable to that observed with wild-type Cry1Aa (Fig. 2A), except for Q151C (Fig. 2H) which was inactive, and for Y153C (Fig. 2I) and W182C (Fig. 2J) which were less active than the others. The activity of D120C (Fig. 2C) [9], P121C (Fig. 2D), T122C (Fig. 2E), N123C

(Fig. 2F) and W219C (Fig. 2K) [10], as well as R127C (Fig. 2G) [13] was similar to that reported earlier for the same mutants produced under standard conditions. However, F50C (Fig. 2B) and S252C (Fig. 2L), produced under reducing conditions, were significantly more active than previously reported [10]. This difference was particularly evident for S252C which was as active as wild-type Cry1Aa in the present study. Because the substitution of serine by a cysteine residue is rather conservative, this mutation could be expected to have little or no effect on the activity of the toxin. This was only observed when the toxin was produced under reducing conditions however, and the lower activity reported previously [10] is likely explained by the presence of oxidized species when it is produced under standard conditions. Although the oxidation of the thiol group modifies only slightly the size of the residue, it introduces a negative charge that could reduce toxin activity. While the substitution of phenylalanine by cysteine is much less conservative, the lower activity of F50C (Fig. 2B), when produced under standard conditions, could also be due to the oxidation of its thiol group.

In contrast, Q151C produced under reducing conditions was almost completely inactive (Fig. 2H) despite the fact that it had a readily detectable activity, albeit reduced relative to that of wild-type Cry1Aa, when produced under standard conditions [10]. Because dithiothreitol, present during the purification steps, was removed before the experiments, a possible explanation for the inability of Q151C to permeabilize the membrane is the formation of a disulfide bridge between two toxin molecules as was observed previously for other Cry1Aa cysteine mutants [24]. The presence of a disulfide bond was demonstrated by re-incubating the toxin with dithiothreitol (Fig. 3). Under these conditions, the ability of mutant Q151C to permeabilize the vesicles was restored to a level which was even superior to that observed when the protein was produced under standard conditions [10]. The possibility that homo-dimers were formed between toxin molecules was investigated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in the presence and absence of dithiothreitol (Fig. 4). Only Q151C and W182C formed detectable amounts of dimers (Fig. 4A) which dissociated in the presence of the reducing agent (Fig. 4B). For both mutants, however, the proportion of dimers appears insufficient to fully account for their rather small activity when compared with the wild-type toxin (Fig. 2). Because these mutants were among those

that were biotinylated less efficiently (Fig. 1), the possibility that they were partially oxidized before the chemical modification could explain their limited reactivity and contribute, along with the formation of homo-dimers, to their modest pore-forming activity. This explanation cannot be extended to all mutants that were poorly labeled, however, since F50C and D120C formed pores as efficiently as wild-type Cry1Aa despite the fact that their reactivity was comparable to that of Q151C and W182C. The consequences of the presence of a cysteine acid residue on pore formation could therefore vary considerably depending on its position within the structure of the toxin.

Except for Q151C, which was inactive, all mutants were incubated with a ten-fold excess of MTSEA-biotin for at least one hour and their activity was subsequently tested with the osmotic swelling assay (Fig. 2). Except for Y153C and S252C, this chemical modification had no significant effect on the ability of the toxin to alter the permeability of the vesicles. The activity of S252C was slightly reduced (Fig. 2L), but the effect of Y153C on membrane permeability was strongly increased when the toxin was biotinylated (Fig. 2I). The presence of a strategically located biotin group on each of the mutants was further exploited by repeating the osmotic swelling experiments after incubating the biotinylated toxins with streptavidin, a 60-kDa protein which binds to biotin non-covalently, but with high affinity [25]. The presence of streptavidin had no significant effect on the pore-forming activity of F50C, D120C, T122C, W219C and S252C (Fig. 2B, C, E, K, L), but considerably reduced that of the remaining mutants, P121C, N123C, R127C, Y153C and W182C (Fig. 2D, F, G, I, J). Interestingly, in this latter group of mutants, the altered residues are located in the loop linking helices $\alpha 3$ and $\alpha 4$ (P121C and N123C), near the N-terminal extremity of helix $\alpha 4$ (R127C), in the loop linking helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ (Y153C), or in the loop linking helices $\alpha 5$ and $\alpha 6$ (W182C). These residues are thus located near or within the hairpin composed of helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$, a region thought to be involved in toxin insertion according to the umbrella model [26–29]. In agreement with this model, binding of streptavidin to a residue located within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop could prevent the hairpin from interacting with the membrane, and binding of this large protein to the loops located at the N-terminal end of $\alpha 4$ or at the C-terminal end of $\alpha 5$ could hinder the conformational change that allows

these two helices to move away from the other domain I helices before inserting into the membrane.

D120C and T122C did not show a similar reduction in activity even though their altered residue is located in the same loop as those of P121C and N123C. In the case of D120C, this lack of effect could possibly be related to its rather modest reactivity with MTSEA-biotin noted above (Fig. 1). As for T122C, its biotin group appears to be less readily accessible to the bulky streptavidin molecule in the intact protein (Fig. 2E) than after being denatured for the western blot experiment (Fig. 1). It remains possible that the lack of any streptavidin effect on F50C activity could be due to the latter's low level of biotinylation. However, a clear reduction in activity was observed for W182C even though both mutants displayed a similar reactivity (Fig. 1). The lack of any streptavidin effect on the activity of F50C, W219C and S252C could therefore be due to poor accessibility of the biotin group or to the possibility that streptavidin binding to their biotinylated residue does not alter the function of the toxin. This latter hypothesis appears more likely, however, in the light of the fact that these mutated residues are surface-exposed in the crystal structure of Cry1Aa [7].

The reduced activity of Y153C relative to wild-type Cry1Aa may suggest that the presence of an aromatic residue in position 153 is important for toxin insertion since aromatic amino acids are thought to facilitate the translocation of protein segments through biological membranes and to contribute to the anchoring of membrane proteins by interacting with phospholipid head groups at the water-lipid interface [30]. In agreement with this hypothesis, the Cry1Ab mutants Y153A, Y153R and Y153D [31], as well as Y153C [32], also display reduced pore-forming activity, although the reduction is more pronounced for Y153D than for the other mutants. Furthermore, substitution of the structurally equivalent tyrosine at position 202 of the more distantly related toxin Cry4Aa by alanine or cysteine resulted in an almost complete loss of toxicity, but the Y202F mutant was only slightly less active than the wild-type toxin [33].

In this context, the two-membered heterocyclic moiety of biotin could possibly interact with the membrane in a manner similar to that of the side chain of aromatic residues and thus stimulate pore formation by Y153C. This hypothesis and the

importance of tyrosine at position 153 were tested by modifying this mutant with MTSHMB, a reagent that adds a 4-(hydroxymethyl)benzyl group, similar to the side chain of tyrosine, on the cysteine residue via a disulfide bond. This treatment indeed stimulated the activity of the toxin (Fig. 5). Pore formation by Y153C was also increased, however, after chemical modification with MTSES and MTSEA which adds a negative and a positive charge, respectively, on the cysteine (Fig. 5). It should nevertheless be pointed out that charged residues are often found on membrane proteins at the water-lipid interface and may contribute to anchoring the protein in the membrane [30]. None of the chemical modifications restored toxin activity to a wild-type level, possibly because the added side chains were all considerably longer than that of the tyrosine residue normally present at this position.

In conclusion, steric constraints introduced by biotinylation of single cysteine residues followed by streptavidin binding interfered with pore formation when the introduced cysteine was located within the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ hairpin, or in the adjacent $\alpha 3$ - $\alpha 4$ and $\alpha 5$ - $\alpha 6$ loops, but had no significant effect when it was located elsewhere in domain I. The activity of Y153C, in which the mutated amino acid is located at the tip of the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ hairpin, was stimulated when it was modified with reagents that added a biotin, a positive or negative charge, or an aromatic group that resembled the tyrosine side chain normally present at this location. Taken together, these results stress the importance of these domain I structural elements and provide further support for the umbrella model of toxin insertion [26–29].

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 and Valorisation-Recherche Québec.

References

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] C.R. Pigott, D.J. Ellar, Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (2007) 255–281.
- [5] 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.
- [6] J. Li, J. Carroll, D.J. Ellar, Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution, *Nature* 353 (1991) 815–821.
- [7] P. Grochulski, L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, M. Cygler, *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation, *J. Mol. Biol.* 254 (1995) 447–464.
- [8] D.H. Dean, F. Rajamohan, M.K. Lee, S.-J. Wu, X.J. Chen, E. Alcantara, S.R. Hussain, Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – a minireview, *Gene* 179 (1996) 111–117.
- [9] 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 Cry1Aa, *Biochemistry* 41 (2002) 6178–6184.

- [10] 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, Submitted to Appl. Environ. Microbiol.
- [11] L. Masson, B.E. Tabashnik, Y.-B. Liu, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel, J. Biol. Chem. 274 (1999) 31996–31200.
- [12] 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 Cry1Aa display altered pore-forming abilities, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 6123–6130.
- [13] 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 $\alpha 4$, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa, Appl. Environ. Microbiol. 74 (2008) 2565–2572.
- [14] W.P. Deng, J.A. Nickoloff, Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site, Anal. Biochem. 200 (1992) 81–87.
- [15] 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.
- [16] A. Bah, K. van Frankenhuyzen, R. Brousseau, L. Masson, The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability, J. Invertebr. Pathol. 85 (2004) 120–127.
- [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] M. Wolfersberger, P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, V.F. 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.
- [20] J. Carroll, 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.
- [21] G. Capozzi, G. Modena, Oxidation of thiols, in: S. Patai (Ed.), *The Chemistry of the Thiol Group*, part 2, John Wiley & Sons, London, 1974, pp. 785–839.
- [22] W.S. Allison, Formation and reactions of sulfenic acids in proteins, *Acc. Chem. Res.* 9 (1976) 293–299.
- [23] J.L. Kice, Mechanisms and reactivity in reactions of organic oxyacids of sulfur and their anhydrides, *Adv. Phys. Org. Chem.* 17 (1980) 65–181.
- [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 post-binding steps of pore formation, Submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*
- [25] L. Chaiet, F.J. Wolf, The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes, *Arch. Biochem. Biophys.* 106 (1964) 1–5.
- [26] J.-L. Schwartz, M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Préfontaine, R. Brousseau, L. Masson, Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering, *FEBS Lett.* 410 (1997) 397–402.
- [27] E. Gazit, P. La Rocca, M.S.P. Sansom, Y. Shai, 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 (1998) 12289–12294.
- [28] D. Gerber, Y. Shai, 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 (2000) 23602–23607.

- [29] A.I. Aronson, Y. Shai, Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action, FEMS Microbiol. Lett. 195 (2001) 1–8.
- [30] S.H. White, W.C. Wimley, Membrane protein folding and stability: physical principles, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28 (1999) 319–365.
- [31] X.J. Chen, A. Curtiss, E. Alcantara, D.H. Dean, Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles, J. Biol. Chem. 270 (1995) 6412–6419.
- [32] M.-E. Nuñez-Valdez, J. Sánchez, L. Lina, L. Güereca, A. Bravo, Structural and functional studies of α -helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin, Biochim. Biophys. Acta 1546 (2001) 122–131.
- [33] W. Pornwiroon, G. Katzenmeier, S. Panyim, C. Angsuthanasombat, 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 (2004) 292–297.

Figure legends

Fig. 1. Chemical reactivity of Cry1Aa domain I cysteine mutants. Toxins were first incubated with a ten-fold excess of MTSEA-biotin for at least one hour. Following migration on 10%-acrylamide sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels in the absence (A) or presence (B) of dithiothreitol, 100 ng of each mutant was transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane. Biotinylated proteins were labeled with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase and revealed by enhanced chemiluminescence.

Fig. 2. Effect of chemical modification on the pore-forming activity of domain I cysteine mutants. Mutant toxins were tested after treatment with MTSEA-biotin (b) and subsequent incubation with streptavidin (s) or without chemical modification (c). Vesicles (0.4 mg membrane protein/ml) isolated from 5th-instar larvae were equilibrated overnight in 10 mM HEPES-KOH, pH 7.5. Before the experiments, bovine serum albumin was added to a final concentration of 1 mg/ml. 150 pmol of mutant toxin/mg of membrane protein were added to a solution containing 150 mM KCl, 1 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5. The vesicles were then rapidly mixed with an equal volume of the KCl solution directly in a cuvette using a stopped flow apparatus. Osmotic swelling of the vesicles was monitored by measuring scattered light intensity at an angle of 90° in a Photon Technology International spectrofluorometer. Percent volume recovery was calculated for every experimental point and values obtained for control vesicles, assayed without added toxin, were subtracted from those obtained in the presence of toxin. For clarity, error bars representing the standard error about the mean of three independent experiments are shown for every 50th experimental point.

Fig. 3. Effect of dithiothreitol on the formation of pores by mutant Q151C. Experiments were conducted as described in the legend of Fig. 2 except that the toxin was incubated with 5 mM dithiothreitol and 2 mM EDTA for at least one hour before the beginning of the osmotic swelling assay.

Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of Cry1Aa domain I cysteine mutants in the absence (A) or presence (B) of dithiothreitol. Each well contained 3 μ g of the indicated toxin.

Fig. 5. Chemical modification of mutant Y153C. Experiments were performed as described in the legend of Fig. 2 except that the toxin was either modified with MTSEA (+), MTSES (-) or MTSHMB (*) for at least one hour, or not modified (#), before the beginning of the osmotic swelling assay.

Figure 1

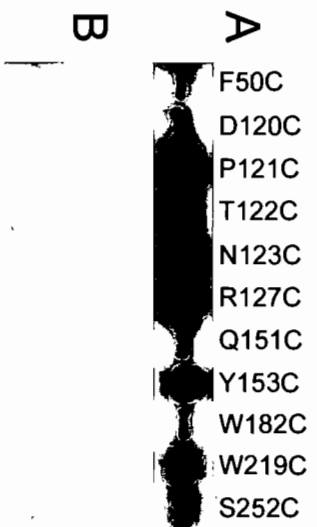


Figure 2

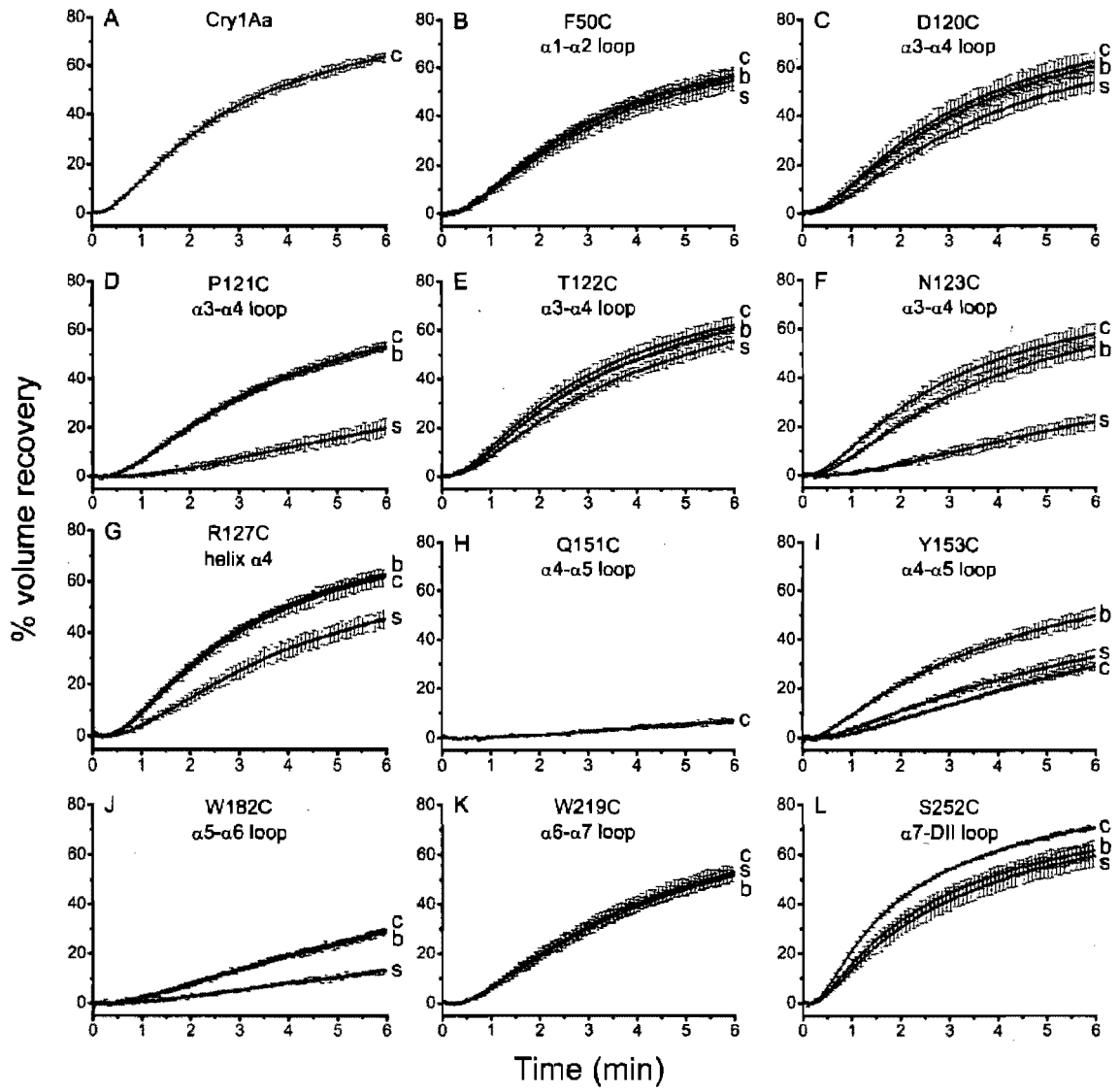


Figure 3

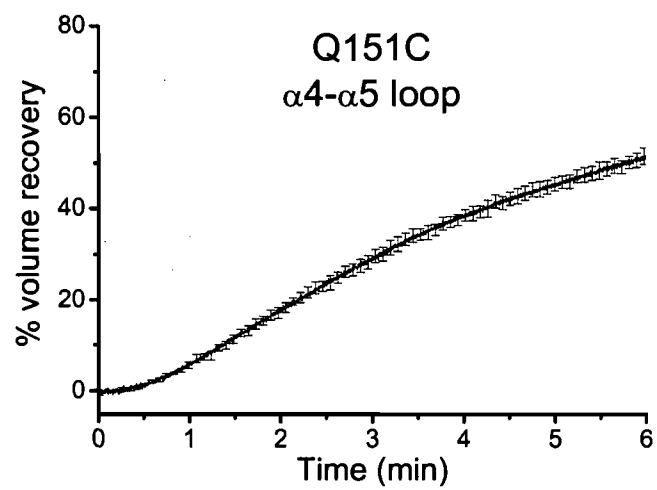


Figure 4

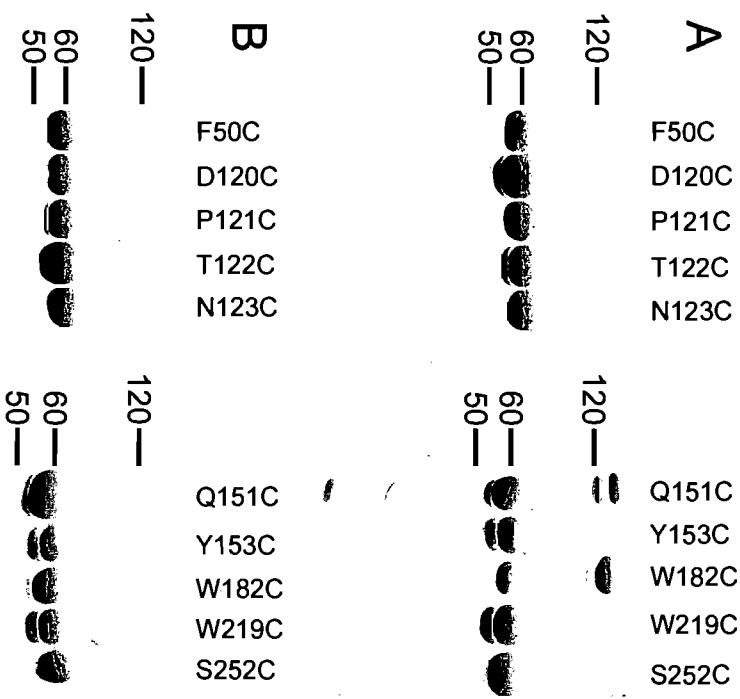
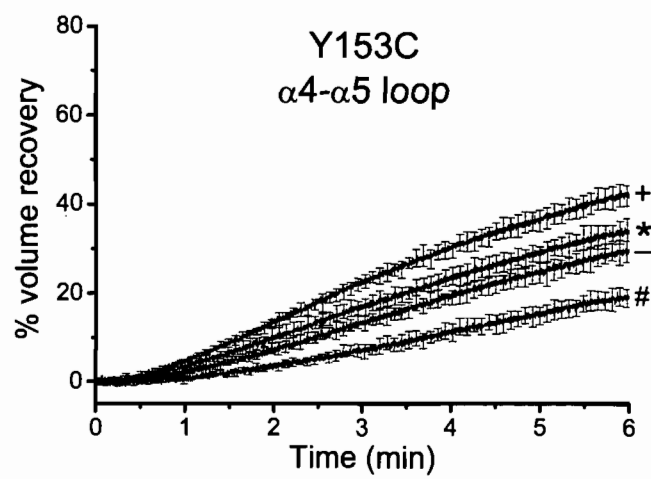


Figure 5



6. Discussion générale

Il est généralement accepté que les toxines Cry de *B. thuringiensis* forment des pores en suivant des étapes bien précises. La solubilisation et l'activation des protoxines dans l'intestin des larves d'insectes visés ont été étudiées en détail et leurs mécanismes ont été bien caractérisés. L'interaction des toxines avec les récepteurs est une autre étape dont les mécanismes sont relativement bien compris. Plusieurs récepteurs des toxines Cry ont été identifiés (Pigott et Ellar, 2007) et plusieurs sites d'interaction, avec les récepteurs, des domaines II et III sont connus (voir section 1.2.1.). Par contre, les connaissances des mécanismes qui régissent les étapes suivant la fixation des protéines sur les récepteurs et les changements de conformation qu'ils impliquent demeurent limitées. Ces étapes incluent la formation d'oligomères, l'insertion dans la membrane et la création de pores. Il est généralement accepté que le rôle du domaine I est au cœur de ces étapes (voir section 1.3.). La fonction spécifique des éléments structuraux du domaine I reste cependant à être précisée.

L'objectif des travaux présentés dans cette thèse était d'améliorer nos connaissances sur le rôle que joue le domaine I dans la formation des pores par les toxines Cry. Plus spécifiquement, ces travaux ont examiné la fonction des boucles qui relient les hélices du domaine I entre elles et les domaines I et II de la Cry1Aa. Le rôle de l'hélice $\alpha 4$ qui, selon le modèle d'insertion en parapluie (Knowles, 1994), est celle qui tapisse la lumière du pore a aussi été étudié attentivement. Ainsi, la plupart des acides aminés de l'hélice $\alpha 4$ et au moins un acide aminé de chacune des boucles du domaine I ont été remplacés individuellement par une cystéine. La cystéine, normalement absente de la Cry1Aa activée, est donc un choix intéressant puisqu'elle peut être modifiée avec des agents chimiques spécifiques. De plus, il est possible de modifier sa charge en effectuant les expériences à différents pH.

Bien que des mutations portant sur des résidus de l'hélice $\alpha 4$ de diverses protéines Cry aient été effectuées auparavant (voir section 1.3.1.), les travaux présentés dans cette thèse sont les premiers à examiner de façon systématique l'effet de mutations altérant chacun des acides aminés de cette hélice (à quelques exceptions près) à l'aide d'une variété de techniques *in vivo* et *in vitro*. Des mesures de toxicité nous ont permis de

vérifier l'effet global des mutations sur l'insecte *in vivo*. Par ailleurs, une technique de gonflement osmotique, lequel est détecté par des mesures de lumière diffusée, nous a permis de caractériser l'effet de ces mutations sur la formation des pores, leurs propriétés et leur nombre. Ces techniques nous renseignent sur l'impact de telles mutations sur la capacité de la toxine à former des pores de façon générale. Elles nous permettent aussi d'évaluer l'impact de ces mutations sur diverses étapes de la formation des pores. Les résultats et conclusions de ces études sont résumés dans le tableau 1. Les travaux de modification chimique des mutants des boucles du domaine I sont aussi uniques puisqu'ils sont les premiers à étudier les changements de conformation des toxines Cry en introduisant un encombrement stérique à l'aide de réactifs de type méthaneéthiosulfonate et de streptavidine.

6.1. Formation de pores par les mutants de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa

La substitution d'un acide aminé de l'hélice $\alpha 4$ par une cystéine entraîne en général une réduction de la toxicité et de la capacité des toxines à former des pores dans des vésicules de la membrane à bordure en brosse de *M. sexta* (Chapitre 3). Trois autres mutants cystéine qui ont été analysés auparavant présentent des caractéristiques similaires (Vachon *et al.*, 2004). Une mutagenèse systématique portant sur tous les résidus de l'hélice $\alpha 4$ (à quelques exceptions près) nous a permis de conclure que la substitution d'un acide aminé situé du côté hydrophile entraîne en général une réduction plus importante de l'activité de la toxine qu'une substitution du côté hydrophobe.

En général, la toxicité des mutants corrèle bien avec leur capacité de former des pores dans des vésicules sauf pour I132C, S139C et I145C, pour lesquels des différences très importantes sont observées (Chapitre 6, Tableau 1). Pour ces mutants, la toxicité est légèrement inférieure à celle de la Cry1Aa alors que leur capacité à former des pores dans des vésicules est fortement réduite (Chapitre 3, Tableau 1). Des différences entre des résultats *in vivo* et *in vitro* ont déjà été observées auparavant (Coux *et al.*, 2001; Vachon *et al.*, 2002). Il s'agit cependant de cas où, contrairement à ce qui a été observé ici, la toxicité des mutants est fortement réduite malgré le fait que leur capacité à former

des pores demeure similaire à celle de la protéine d'origine. Toutefois, une forte augmentation de l'activité des mutants S139C et I145C dans des expériences de gonflement osmotique est observée lorsque ces mutants sont incubés avec du DTT avant les expériences (Chapitre 4, Fig. 4). Des ponts disulfure qui se sont formés entre deux molécules de toxine ou avec d'autres polypeptides empêchent alors la toxine de former des pores. Le DTT a pour effet de les briser. Il est très probable que le milieu fortement réducteur de l'intestin des larves de *M. sexta* brise aussi ces ponts disulfure. Les différences observées entre les expériences *in vivo* et *in vitro* pour les mutants S139C et I145C sont donc très probablement attribuables à la formation de ponts disulfure intermoléculaires (Chapitre 6, Tableau 1). Une augmentation d'activité en présence de DTT a aussi été observée pour le mutant I132C, mais celle-ci est moins importante et ne permet d'expliquer qu'une partie des différences observées entre les résultats de toxicité et de gonflement osmotique (Chapitre 4).

Le pH auquel les expériences de gonflement osmotique sont effectuées peut avoir des effets sur l'activité de certains mutants (Tran *et al.*, 2001; Fortier *et al.*, 2005). Les mutants I145C et P146C ont une activité réduite, par rapport à celle de la Cry1Aa, lorsque les expériences sont effectuées à pH 7,5, mais elle est encore plus réduite à pH 10,5 (Chapitre 3, Fig. 2). À pH 10,5, le groupement thiol de la cystéine est chargé négativement tandis qu'il est neutre à pH 7,5. Les expériences de cinétique de gonflement osmotique démontrent aussi que les mutants Q133C et L141C forment des pores moins rapidement à pH 10,5 qu'à pH 7,5 (Chapitre 3, Tableau 2). Pour tous ces mutants, il semble donc que la charge négative introduite à pH 10,5 nuise à la formation de pores par la toxine. Par ailleurs, la situation inverse a été observée pour les mutants E128C et D136C (Vachon *et al.*, 2004). L'augmentation d'activité lorsque le pH est augmenté à 10,5 peut alors s'expliquer par la restitution de la charge négative qui est normalement présente sur l'acide aminé qui a été muté.

Quelques mutations modifiant l'hélice $\alpha 4$ des toxines Cry1A ont déjà démontré l'importance de cette hélice dans la formation de pores (Cooper *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999; Tigue *et al.*, 2001; Vachon *et al.*, 2004). L'activité des mutants présentés dans ces articles corrèle bien avec celle des mutants correspondant aux mêmes résidus que ceux présentés dans cette thèse. La mutation R131C (Chapitre 3, Fig. 2) entraîne une

perte d'activité de formation de pores plus faible que d'autres mutations portant sur le même résidu (R131D, R131E, R131H et R131Q). Pour certaines de ces mutations, l'activité de la toxine est même comparable à celle de la Cry1Aa (Vachon *et al.*, 2004). Les résultats présentés dans ces différentes études sont donc en accord avec la conclusion de cette thèse puisque l'activité des mutants qui y sont présentés corrèle bien avec celle des mutants étudiés dans le Chapitre 3. Dans tous ces travaux, les mutations altérant les acides aminés du côté hydrophile de l'hélice $\alpha 4$ sont beaucoup plus dommageables à l'activité de la toxine que celles portant sur les résidus situés du côté hydrophobe (Chapitre 3, Fig. 6).

Le fait que l'hélice $\alpha 4$ tapisse probablement la lumière des pores (Masson *et al.*, 1999) suggère que la réduction d'activité chez plusieurs mutants cystéine pourrait être le résultat d'un changement des propriétés des pores formés. Cependant, un changement majeur de la sélectivité des pores a été écarté puisque le ratio d'activité de chaque mutant par rapport à la Cry1Aa est similaire lorsque le KCl est remplacé par un sel composé d'un anion (gluconate de potassium) ou d'un cation (hydrochlorure de N-méthyle-D-glucamine) plus volumineux (Chapitre 6, Tableau 2). Il n'y a également aucun changement majeur au niveau de la taille des pores formés puisque l'utilisation de solutés neutres de taille différente (sucrose et raffinose) n'a que des effets relativement mineurs sur le ratio d'activité entre chaque toxine mutante et la Cry1Aa (Chapitre 6, Tableau 2). Puisque les propriétés des pores formés par les mutants et par la Cry1Aa sont pratiquement identiques, la réduction d'activité de certains mutants résulte donc principalement d'une réduction du nombre de pores formés. Les résultats des expériences de cinétique de formation de pores confirment d'ailleurs que le nombre de pores formés par unité de temps est réduit (Chapitre 3, Tableau 2). Ces conclusions permettent donc de généraliser celles qui découlent de l'étude des mutations portant sur les acides aminés chargés de l'hélice $\alpha 4$ (Vachon *et al.*, 2004).

Nos résultats sont également en accord avec l'analyse de certains autres mutants ayant une activité réduite. La mutation N135Q dans la Cry1Ab et la Cry1Ac n'a pas d'effet sur la fixation réversible de la toxine sur les récepteurs, mais le niveau de fixation irréversible (qui donne un indice du niveau d'insertion dans la membrane) du mutant N135Q de la Cry1Ac est diminué (Cooper *et al.*, 1998; Tigue *et al.*, 2001). Pour chacun

de ces deux mutants, la mutation inhibe la formation d'oligomères (Tigue *et al.*, 2001). Par contre, d'autres mutants de la Cry1Ac dont l'hélice $\alpha 4$ a été modifiée et qui ont une activité de formation de pores réduite peuvent former des oligomères de 130 et 200 kDa (Manoj Kumar et Aronson, 1999). Le faible taux de formation de pores pourrait donc s'expliquer par la capacité réduite de la toxine à s'insérer dans la membrane. La conductance du mutant N138C de la Cry1Aa mesurée dans des bicouches lipidiques planes est similaire à celle de la Cry1Aa (Masson *et al.*, 1999) tandis que son activité dans des expériences de gonflement osmotique est négligeable (Chapitre 3, Fig. 2). La probabilité d'ouverture de ce mutant est cependant beaucoup plus faible (12,2% pour N138C et 65,0% pour la Cry1Aa). Il est possible que ce mutant forme bel et bien des pores, mais que la fréquence d'ouverture soit trop faible pour augmenter la perméabilité de la membrane dans les expériences de gonflement osmotique. Ces expériences ne peuvent pas discerner entre des pores qui se forment mais qui ne s'ouvrent pas et un pore qui n'a pas été formé. Les différentes observations de ces études démontrent clairement que l'hélice $\alpha 4$ joue un rôle majeur dans la formation des pores. Une analyse plus poussée de l'ensemble des mutants cystéine de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa a donc été entreprise dans le but de préciser ce rôle.

Tableau 1. Résumé des résultats^a

Toxine	Activité <i>in vitro</i>	Toxicité	Digestion Chymotrypsine ^b	Dichroïsme circulaire ^c	Compétition ^d
Cry1Aa	élevée	élevée	partielle		
L126C	réduite	réduite			
R127C	élevée	élevée			
E128C	réduite	élevée			
E129C	faible	faible	mineure	normal	complète
M130C	élevée	élevée			
R131C	faible	faible	mineure	normal	élevée
I132C	faible	élevée	partielle	réduit	élevée
Q133C	réduite	réduite			
F134C	élevée	élevée			
N135C	faible	faible	mineure	normal	complète
M137C	élevée	élevée			
N138C	faible	réduite	mineure	normal	élevée
S139C	faible	élevée	mineure	réduit	élevée
A140C	faible	réduite	partielle	normal	
L141C	élevée	élevée			
T142C	faible	faible	minelle	normal	élevée
A144C	faible	faible	partielle	normal	élevée
I145C	réduite	élevée			
P146C	réduite	faible			
L147C	faible	faible	mineure	normal	aucune
A149C	élevée	élevée			
V150C	faible	faible	mineure	réduit	élevée

Toxine	Effet du DTT		Conclusion ^g
	Gel ^e	Formation de pores ^f	
Cry1Aa	—	—	
L126C	—	—	insertion et oligomérisation
R127C	++	—	
E128C	++	+	charge négative; ponts disulfure; insertion et oligomérisation
E129C	trace	—	insertion et oligomérisation
M130C	++	—	
R131C	trace	—	insertion et oligomérisation
I132C	—	+	ponts disulfure; insertion et oligomérisation
Q133C	++	—	insertion et oligomérisation
F134C	+	—	
N135C	trace	—	insertion et oligomérisation
M137C	++	—	
N138C	—	—	insertion et oligomérisation
S139C	++	+	ponts disulfure; insertion et oligomérisation
A140C	trace	—	insertion et oligomérisation
L141C	+	—	
T142C	—	+	ponts disulfure; insertion et oligomérisation
A144C	—	—	
I145C	—	+	ponts disulfure; insertion et oligomérisation
P146C	trace	+	ponts disulfure; insertion et oligomérisation
L147C	trace	—	fixation sur les récepteurs
A149C	—	—	
V150C	—	+	ponts disulfure; insertion et oligomérisation

^a Les expériences ont été effectuées pour les mutants indiqués.

^b Quantité apparente de digestion des toxines donnant un fragment de 55 kDa.

^c Comparativement au spectre de la Cry1Aa. «normal» indique que le spectre du mutant est similaire à celui de la Cry1Aa, et «réduit» indique une diminution de la composante en hélices α .

^d Capacité de chaque mutant à inhiber la formation de pores par la Cry1Aa dans les expériences de compétition.

^e Présence d'une bande correspondant à une protéine de 120 kDa caractéristique des homo-dimères sur gel de polyacrylamide, en absence de dithiothréitol, en quantité substantielle (++) , modérée (+) ou uniquement sous forme de trace. L'absence de bande caractéristique des homo-dimères est indiquée par —.

^f Présence de ponts disulfure mise en évidence par l'addition de dithiothréitol dans les expériences de gonflement osmotique. L'addition de dithiothréitol augmente la formation de pores par la toxine (+) ou n'a aucun effet (—).

^g Conclusions atteintes pour expliquer la réduction d'activité de certains mutants. La mention «charge négative» indique que la restitution de cette charge dans les expériences augmente l'activité de la toxine. La mention «ponts disulfure» indique que l'utilisation de dithiothréitol pour briser ces ponts augmente l'activité de la toxine. La mention «insertion et oligomérisation» indique que la réduction d'activité est due à un problème au niveau de ces étapes du mécanisme d'action.

Tableau 2. Tableau comparatif des différents solutés

Toxine	pH 7,5				
	KCl	NMDGCl	KGlu	Suc	Raf
Cry1Aa	100,0 ± 3,6	100,0 ± 7,8	100,0 ± 16,3	100,0 ± 7,0	100,0 ± 30,6
L126C	40,5 ± 1,8	37,9 ± 3,0	31,5 ± 7,3	23,0 ± 3,9	12,6 ± 6,7
R127C	100,0 ± 5,0	113,3 ± 7,5	93,7 ± 31,0	93,5 ± 14,9	63,0 ± 18,6
M130C	98,6 ± 4,0	112,7 ± 6,9	78,1 ± 20,4	101,5 ± 13,3	58,3 ± 12,9
R131C	17,0 ± 5,5	15,1 ± 4,6	30,9 ± 10,6	8,3 ± 6,1	21,1 ± 10,4
I132C	7,8 ± 0,9	2,9 ± 0,4	5,1 ± 1,6	3,4 ± 1,3	14,5 ± 10,1
Q133C	35,8 ± 9,4	29,4 ± 5,0	34,7 ± 15,1	25,8 ± 13,3	9,2 ± 3,3
F134C	84,7 ± 3,1	83,6 ± 5,8	74,4 ± 9,8	51,9 ± 21,5	17,7 ± 10,3
M137C	77,6 ± 6,6	67,3 ± 9,5	76,6 ± 22,7	45,6 ± 8,9	23,6 ± 15,1
N138C	18,2 ± 7,2	2,2 ± 1,1	6,3 ± 1,1	1,9 ± 0,9	12,8 ± 8,4
L141C	85,3 ± 2,3	81,7 ± 4,8	109,4 ± 13,9	101,8 ± 7,8	77,4 ± 55,6
I145C	48,5 ± 5,5	53,2 ± 3,9	52,0 ± 9,0	7,7 ± 2,8	8,1 ± 3,1
P146C	39,6 ± 10,2	27,1 ± 7,8	51,5 ± 8,9	15,5 ± 6,0	5,5 ± 2,0
A149C	92,7 ± 6,1	85,2 ± 6,9	76,4 ± 10,1	25,0 ± 11,2	9,6 ± 3,5

Toxine	pH 10,5			
	KCl	KGlu	Suc	Raf
Cry1Aa	100,0 ± 6,1	100,0 ± 12,0	100,0 ± 7,0	100,0 ± 3,0
L126C	32,2 ± 3,0	11,5 ± 1,6	11,8 ± 3,9	12,2 ± 3,7
R127C	101,9 ± 5,2	97,6 ± 18,2	97,8 ± 11,7	89,9 ± 38,1
M130C	102,9 ± 4,8	72,7 ± 12,0	102,9 ± 11,3	88,2 ± 34,6
R131C	12,4 ± 3,3	7,6 ± 2,4	6,3 ± 1,2	44,0 ± 6,0
I132C	18,1 ± 4,2	3,8 ± 0,6	4,5 ± 2,8	12,4 ± 4,9
Q133C	19,6 ± 1,3	3,1 ± 0,4	6,6 ± 4,9	7,0 ± 2,6
F134C	87,7 ± 8,3	45,9 ± 12,1	30,1 ± 5,0	16,7 ± 5,0
M137C	90,8 ± 4,9	70,6 ± 13,7	50,4 ± 9,8	49,9 ± 20,2
N138C	16,3 ± 7,3	7,0 ± 2,1	6,2 ± 2,7	8,4 ± 3,9
L141C	79,8 ± 3,6	77,1 ± 10,3	67,7 ± 14,4	74,4 ± 29,6
I145C	27,5 ± 1,5	4,4 ± 1,8	4,4 ± 2,9	10,2 ± 3,4
P146C	13,0 ± 6,4	4,9 ± 3,3	7,7 ± 5,0	25,4 ± 6,9
A149C	94,2 ± 6,0	43,9 ± 12,6	28,0 ± 6,9	16,1 ± 0,9

Pour un soluté donné, chacune des valeurs est normalisée par rapport à celle correspondante de la Cry1Aa. Les valeurs sont exprimées en pourcentage. Les solutés testés sont le chlorure de potassium (KCl), l'hydrochlorure de N-méthyle-D-glucamine (NMDGCl), le gluconate de potassium (KGlu), le sucrose (Suc) et le raffinose (Raf).

6.2. Rôle de l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Aa dans la formation des pores

Les mutations peuvent avoir un impact au niveau de diverses étapes de la formation des pores. Des protéases ont été utilisées afin d'examiner la structure des protéines mutantes puisqu'il est possible que les mutations effectuées exposent un site de protéolyse qui est normalement caché dans la toxine. Chaque protoxine est normalement activée avec de la trypsine pendant 90 minutes. Tous les mutants ont une forme activée stable qui est identique à celle de la Cry1Aa. Il n'est donc pas surprenant que la trypsine n'ait pas d'effet supplémentaire après 12 heures d'incubation avec chacun des mutants inactifs (Chapitre 4, Fig. 1A). Cependant, après 12 heures d'incubation, la chymotrypsine digère une partie de la Cry1Aa activée qui forme alors un fragment stable d'environ 55 kDa (Chapitre 4, Fig. 1B et Chapitre 6, Tableau 1). Cette digestion supplémentaire de la Cry1Aa est aussi observée pour chacun des mutants même si pour certains la quantité de protéine digérée est légèrement inférieure à celle de la Cry1Aa. Il a été suggéré qu'une digestion supplémentaire de la toxine activée pourrait être nécessaire à son activité (Miranda *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002b). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases lors de la formation de pores par la Cry1Aa ne l'empêche pas d'agir et démontre qu'une digestion supplémentaire n'est pas nécessaire à l'action de la toxine (Kirouac *et al.*, 2006; Fortier *et al.*, 2007). De plus, la mutation entraînant le retrait du site de protéolyse où devrait se produire le clivage selon cette hypothèse, n'empêche pas la formation de pores (Lebel *et al.*, 2008).

La structure de tous les mutants de l'hélice $\alpha 4$ dont l'activité est nulle ou négligeable, selon les résultats présentés dans le Chapitre 3, a aussi été analysée par dichroïsme circulaire. La structure secondaire des mutants s'est avérée, dans la plupart des cas, similaire à celle de la Cry1Aa. Les spectres de dichroïsme circulaire des mutants I132C, S139C et V150C sont les seuls qui présentent des différences par rapport à celui de la Cry1Aa (Chapitre 4, Fig. 2 et Chapitre 6, Tableau 1). Les différences observées sont situées dans un domaine de longueur d'onde près de 200 nm qui est fortement influencé par la composition en hélice α de la protéine. Pour ces trois mutants, les différences observées sont fort probablement le résultat de la formation de ponts disulfure inter-moléculaires. Cependant, si la formation d'homo-dimères n'a pu

être observée sur un gel de polyacrylamide pour les mutants I132C et V150C (Chapitre 4, Fig. 3 et Chapitre 6, Tableau 1), l'addition de DTT dans les expériences de gonflement osmotique augmente de façon significative leur activité (Chapitre 4, Fig. 4 et Chapitre 6, Tableau 1), ce qui suggère fortement qu'ils forment des ponts disulfure avec d'autres polypeptides de faible poids moléculaire. Par ailleurs, dans le cas du mutant S139C, la formation d'homo-dimères est observée sur gel de polyacrylamide et son activité dans les expériences de gonflement osmotique est fortement augmentée lorsque les expériences sont effectuées en présence de DTT (Chapitre 6, Tableau 1).

Les résultats de dichroïsme circulaire et de protéolyse indiquent que la structure des mutants inactifs est assez comparable à celle de la Cry1Aa. La capacité de ces mutants à se fixer sur les récepteurs a donc été analysée en plaçant la Cry1Aa et l'un ou l'autre des mutants inactifs en compétition dans les expériences de gonflement osmotique. Tous les mutants inactifs, à l'exception de L147C, ont inhibé la formation de pores par la Cry1Aa, démontrant ainsi qu'ils peuvent se fixer sur les récepteurs (Chapitre 4, Fig. 5 et Chapitre 6, Tableau 1).

Le mutant L147C est le seul dont la mutation dans la région de l'hélice $\alpha 4$ empêche la toxine de se fixer sur les récepteurs. Il est cependant peu probable que l'hélice $\alpha 4$ joue un rôle important dans la fixation de la toxine sur les récepteurs. Les résultats des expériences de dichroïsme circulaire et de digestion avec la trypsine et la chymotrypsine, avec ce mutant, sont similaires à ceux obtenus avec la Cry1Aa et aucune formation de ponts disulfure n'a été mise en évidence. D'autres expériences devront être effectuées afin d'expliquer l'incapacité de ce mutant à se fixer sur les récepteurs.

La formation de ponts disulfure inter-moléculaires explique en partie l'inactivité de certains mutants (Chapitre 6, Tableau 1). Dans la plupart des mutants étudiés, le résidu muté est situé du côté hydrophile de l'hélice $\alpha 4$ qui, selon la structure cristalline de la Cry1Aa, est exposé au solvant (Grochulski *et al.*, 1995). Le groupement thiol de ces mutants peut réagir avec d'autres monomères pour former des homo-dimères. Lors de la production de la toxine, il peut également réagir avec d'autres polypeptides qui sont présents avant la purification pour former des hétéro-dimères. Il est aussi possible que ces polypeptides sont digérés à l'étape d'activation de la toxine avec la trypsine puisque peu de protéines sont résistantes à la trypsine comme la Cry1Aa. Étant donné que selon

le modèle d'insertion en parapluie, l'hélice $\alpha 4$ doit s'insérer dans la membrane, interagir avec d'autres monomères et tapisser la lumière du pore, il est fort probable que la formation de ponts disulfure à cet endroit empêche la formation de pores dans la membrane tout simplement en introduisant un encombrement. Deux techniques ont été utilisées afin de mettre en évidence la formation de ponts disulfure : l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non réductrices (Chapitre 4, Fig. 3), et des expériences de gonflement osmotique effectuées en présence et en absence de DTT (Chapitre 4, Fig. 4). Aucune formation de dimères n'a été observée pour les mutants L126C, E129C, R131C, N135C, N138C, A140C, A144C, L147C et A149C, bien que dans certains cas, une trace d'homo-dimères apparaisse sur les gels de polyacrylamide (Chapitre 6, Tableau 1). Les résultats obtenus à l'aide de ces deux techniques ne concordent pas toujours. Pour d'autres mutants, la formation d'homo-dimères a été observée sur gel de polyacrylamide soit de façon prononcée (R127C, M130C, Q133C et M137C) soit plus faiblement (F134C et L141C) (Chapitre 6, Tableau 1). Cependant, le recouvrement de volume de chacun de ces mutants n'a pas augmenté de façon significative en présence de DTT. Il faut noter que pour plusieurs de ces mutants, l'acide aminé qui a été modifié est situé du côté hydrophobe de l'hélice qui, selon la structure cristalline de la Cry1Aa, fait face au cœur de la protéine. Il est donc peu probable que ceux-ci puissent normalement former des dimères. Il serait plus probable que les dimères ce soient formés après que les protéines aient été dénaturées en préparation pour l'électrophorèse.

La situation inverse a été observée pour un autre groupe de mutants (I132C, T142C, I145C, P146C et V150C) (Chapitre 6, Tableau 1). En effet, une augmentation significative de l'activité de ces mutants a été observée dans les expériences de gonflement osmotique en présence de DTT bien qu'aucun ou peu de dimères n'aient été observés sur gel de polyacrylamide. Il est cependant possible que le groupement thiol de ces mutants ait réagi avec des petites molécules qui n'ont pas d'influence majeure sur la migration des toxines sur gel. Il est aussi possible que les mutants aient formé des ponts disulfure avec d'autres protéines lors de la production de ceux-ci et que ces dernières aient été fortement dégradées par la trypsine à l'étape d'activation des toxines. Les mutants E128C et S139C sont les seuls dont l'augmentation d'activité à la suite d'un

ajout de DTT dans les expériences de gonflement osmotique s'explique par la formation d'homo-dimères même s'il demeure toujours possible qu'ils aient aussi réagi avec d'autres molécules (Chapitre 6, Tableau 1).

L'augmentation d'activité de certains mutants due à l'ajout de DTT pourrait expliquer certaines différences entre les résultats des expériences *in vivo* et *in vitro* tel que mentionné précédemment (voir section 6.1.). Cependant, même si l'addition de DTT augmente le niveau de recouvrement de volume dans certains cas, celui-ci demeure toujours inférieur à celui qui est mesuré avec la Cry1Aa. Il est donc clair que la formation de dimères ne peut expliquer à elle seule la faible activité de certains mutants cystéine de l'hélice $\alpha 4$ et que d'autres facteurs doivent être considérés. Ces facteurs pourraient être l'insertion et la formation d'oligomères étant donné que ce sont les seules étapes de la formation de pores qui n'ont pas été écartées dans nos travaux (Chapitre 6, Tableau 1). Il est fort probable que l'hélice $\alpha 4$ joue un rôle clé à l'une ou l'autre de ces étapes. L'insertion et la formation d'oligomères par les mutants cystéine de l'hélice $\alpha 4$ devront être étudiées plus spécifiquement afin de préciser le rôle de cette hélice.

6.3. Modification chimique des mutants cystéine du domaine I

L'introduction, par mutagenèse dirigée, de cystéines dans la Cry1Aa, dont la forme active n'en contient pas, nous donne la possibilité de modifier les résidus mutés à l'aide d'agents chimiques qui réagissent spécifiquement avec leur groupement thiol. Certains agents ont été utilisés afin d'introduire un encombrement stérique de plus en plus important sur la protéine dans le but d'étudier les mécanismes d'insertion de la toxine dans la membrane et la formation d'oligomères. La plupart des mutants cystéine des boucles du domaine I (Lebel *et al.*, 2008) ont été utilisés à cette fin, en plus du mutant R127C de l'hélice $\alpha 4$ (Girard *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, chacun de ces mutants a été modifié avec le MTSEA-biotine, et leur activité suite à cette modification a été mesurée à l'aide de la technique de gonflement osmotique. Sauf pour Y153C et S252C, l'ajout de MTSEA-biotine n'a aucun effet sur la cinétique de gonflement (Chapitre 5, Fig. 2). L'activité du mutant

S252C n'est que légèrement réduite lorsqu'il est modifié avec le MTSEA-biotine tandis que l'activité du mutant Y153C est augmentée. L'augmentation observée pour le mutant Y153C pourrait être due à l'action de la biotine dont la structure offre une certaine ressemblance avec celle du résidu aromatique qui est normalement présent dans la protéine : la tyrosine. Il a déjà été démontré que les résidus aromatiques sont importants pour l'ancrage des protéines membranaires au niveau de l'interface entre les milieux lipidique et aqueux (White et Wimley, 1999). Il est donc possible que la biotine et la tyrosine qui est normalement présente dans la protéine agissent de façon similaire.

L'ajout de streptavidine qui interagit spécifiquement avec la biotine permet d'introduire un encombrement stérique plus important sur chaque résidu muté. Celle-ci entraîne une perte d'activité importante pour les mutants dont le résidu muté est situé dans la boucle reliant les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (P121C et N123C), à l'extrémité de l'hélice $\alpha 4$ (R127C), dans la boucle reliant les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ (Y153C), et dans la boucle reliant les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (W182C) (Chapitre 1, Fig. 11 et Chapitre 5, Fig. 2). Dans le cas du mutant Y153C, cette perte d'activité annule la stimulation introduite par l'addition du groupement biotine. Tous ces résidus mutés sont situés près de la région qui devrait s'insérer dans la membrane selon le modèle en parapluie (Knowles, 1994; Schwartz *et al.*, 1997a; Gerber et Shai, 2000). Il est donc probable que la streptavidine située sur ces résidus interfère avec le processus d'insertion et nuise à la formation de pores en accord avec le modèle d'insertion en parapluie. Cependant, les mutants D120C et T122C dont le résidu muté est aussi situé dans la boucle reliant les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (Chapitre 1, Fig. 11) ne présentent pas de réduction significative d'activité lorsqu'ils sont incubés avec la streptavidine. Quoique le degré de réactivité mesuré après le transfert du mutant D120C sur une membrane de fluorure de polyvinylidène soit faible, le T122C n'est pas beaucoup moins réactif que les mutants P121C et N123C, ce qui semblerait exclure, à première vue, comme explication, une diminution de la réactivité de la cystéine. Cependant, la streptavidine conjuguée à une peroxidase de raifort utilisée afin de détecter les protéines est incubée avec les protéines alors qu'elles ont été dénaturées, et l'accessibilité du résidu pourrait être très différente dans ces conditions. Pour les mutants F50C, D120C et W219C, il est possible qu'aucun effet n'ait été observé parce qu'ils ne pouvaient pas réagir en quantité suffisante avec le MTSEA-

biotine ou interagir avec la streptavidine. Par contre, l'activité du mutant W182C a été réduite suite à l'addition de streptavidine malgré le fait que son degré de réactivité mesuré avec la streptavidine conjuguée soit similaire ou même plus faible que celui de ce groupe de mutants. Il est donc assez probable qu'aucun effet de l'ajout de la streptavidine n'ait été observé pour les mutants F50C, D120C, T122C, W219C et S252C parce que celle-ci n'a aucun impact sur la formation de pores lorsqu'elle est liée.

La nature du résidu en position 153 est importante pour l'activité de la toxine. Il a déjà été démontré que la substitution de la tyrosine à cette position par une cystéine entraîne une réduction de l'activité de la toxine (Lebel *et al.*, 2008). La modification de la cystéine à l'aide du MTSEA-biotine permet à la protéine de regagner une partie de l'activité qu'elle a perdue. Il est probable que la biotine augmente l'activité de la toxine parce qu'elle possède des propriétés similaires à celles du résidu aromatique qui est normalement présent. En accord avec cette hypothèse, la modification de la cystéine avec le MTSHMB, qui attache un groupement chimique très similaire à la chaîne latérale de la tyrosine sur le résidu muté, augmente aussi l'activité de la protéine. Des agents chargés négativement (MTSES) et positivement (MTSEA) ont aussi été utilisés pour modifier le mutant Y153C. Ces deux agents stimulent aussi l'activité de la toxine. Les acides aminés chargés, tout comme les acides aminés aromatiques, sont souvent présents au niveau de l'interface entre le milieu lipidique de la membrane et le milieu aqueux et aident ainsi à ancrer la protéine dans membrane (White et Wimley, 1999). Le MTSEA-biotine semble être celui qui est le plus efficace à stimuler l'activité du mutant Y153C suivi des agents MTSEA, MTSHMB et MTSES. Même si les différences observées entre chacun de ces agents peuvent être dues à des différences au niveau de la quantité de protéine qui a été modifiée, il ne fait pas de doute que ces derniers stimulent l'activité du mutant Y153C. Les résultats de ces modifications du mutant Y153C sont en accord avec le modèle d'insertion en parapluie qui prédit que la boucle située entre les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ (dont le résidu Y153 fait partie) est la seule à se retrouver du côté intracellulaire après l'insertion (Chapitre 1, Fig. 7 et Fig. 11). Peu d'acides aminés sont donc disponibles pour ancrer la protéine de ce côté de la membrane. Des expériences supplémentaires visant à mesurer le degré de liaison irréversible de la protéine pourraient éventuellement confirmer cette hypothèse.

Le modèle d'insertion en parapluie est appuyé par de nombreuses études. Plusieurs peptides synthétiques qui correspondent à diverses hélices du domaine I de la Cry1Ac ou de la Cry3A ont été utilisés afin de déterminer l'orientation de ces hélices dans la membrane et leur tendance à s'associer avec d'autres hélices (Gazit et Shai, 1993, 1995; Gazit *et al.*, 1994, 1998; Gerber et Shai, 2000). Les résultats obtenus sont en excellent accord avec le modèle. Ces résultats ont cependant été obtenus avec des peptides individuels et il est difficile de prédire si cette situation peut avoir un impact sur les conclusions des auteurs. La création de ponts disulfure entre divers segments du domaine I par mutagenèse dirigée afin de restreindre les mouvements du domaine I a aussi été utilisée afin d'étudier l'architecture des pores formés par les toxines (Schwartz *et al.*, 1997a; Alzate *et al.*, 2006). Les résultats obtenus par Schwartz *et al.* (1997a) suggèrent que les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ doivent se séparer du reste de la molécule afin qu'il y ait formation de pores en accord avec le modèle d'insertion en parapluie. Par contre, le groupe d'Alzate *et al.* (2006) qui utilise les mêmes mutants n'observe aucun effet des ponts disulfure sur la formation de pores tant lors d'expériences *in vivo* qu'*in vitro*. Aucune de ces deux études n'a cependant évalué la quantité de ponts disulfure qui ont réellement été formés dans la protéine, ce qui pourrait expliquer les différences entre les résultats de ces deux groupes. Comme il a été discuté précédemment (Chapitre 5), l'oxydation des groupements thiol des cystéines sous forme d'oxyacides de soufre pourrait avoir lieu lors de la production de ces protéines et nuire à la formation des ponts disulfure. En contournant les problèmes causés par l'utilisation de peptides synthétiques ou l'utilisation de protéines contenant un pont disulfure, les résultats de modifications chimiques présentées dans le Chapitre 5 de cette thèse appuient de façon indépendante le modèle d'insertion en parapluie.

7. Perspectives

Les expériences effectuées avec les mutants de la Cry1Aa dont les résidus de l'hélice $\alpha 4$ ont été modifiés, et qui ont été présentées dans les Chapitres 3 et 4, démontrent que cette hélice joue un rôle important dans les étapes qui suivent la fixation de la toxine sur les récepteurs. Ces étapes sont la formation d'oligomères et l'insertion de la protéine dans la membrane. Plusieurs mutations modifiant l'hélice $\alpha 4$ de la Cry1Ac (Q133R, I132S, I132L, I132V, I132N) entraînent une perte importante de l'activité sans pour autant avoir un effet sur la formation d'oligomères (Manoj Kumar et Aronson, 1999). Ainsi, en supposant que la formation d'oligomères précède l'insertion de la toxine dans la membrane, la réduction d'activité observée pour ces mutants résulterait d'une diminution de l'insertion. Par contre, pour les mutants N135Q de la Cry1Ab et de la Cry1Ac, la perte d'activité serait plutôt attribuable à leur incapacité de former des oligomères (Tigue *et al.*, 2001). Pour le mutant N135Q de la Cry1Ac (Cooper *et al.*, 1998; Tigue *et al.*, 2001), une forte diminution de la fixation irréversible est observée. Celle-ci est généralement associée à l'insertion de la toxine dans la membrane. Il est donc probable que l'hélice $\alpha 4$ joue un rôle à chacune de ces deux étapes. Il est aussi possible que la formation d'oligomères et l'insertion soient réalisées par différentes régions de l'hélice. Afin de vérifier toutes ces possibilités, il est donc essentiel que la formation d'oligomères et l'insertion de chacun des mutants cystéine que nous avons étudiés soient évaluées.

Il est possible d'examiner la formation d'oligomères des toxines Cry à l'aide d'une technique inspirée de celle qui a déjà été utilisée pour observer les oligomères de l' α -hémolysine de *Staphylococcus aureus* (Walker et Bayley, 1995). Appliquée aux toxines Cry (Aronson *et al.*, 1999; Tigue *et al.*, 2001), elle consiste à incuber une quantité de toxine non saturante avec des vésicules de la membrane à bordure en brosse dans un volume 50 μ l de tampon de 30 à 60 minutes. Les échantillons sont centrifugés et lavés à plusieurs reprises afin de séparer la toxine libre de celle qui est fixée sur les vésicules. Les oligomères incorporés dans les vésicules sont chauffés à une température de 65 à 70°C avant d'être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transférés sur

une membrane de nitrocellulose ou de fluorure de polyvinylidène. Les molécules de toxines sont ensuite détectées par immunochimie. Les oligomères formés par les toxines parentales ont un poids moléculaire d'environ 130 ou 200 kDa correspondant à celui des dimères ou des trimères.

Une autre technique est aussi utilisée afin d'observer des oligomères (Gómez *et al.*, 2002b). Celle-ci consiste à ajouter un anticorps (scFv73) lors de l'activation de la protoxine avec la trypsine ou du suc intestinal d'insecte, ou même en incubant la protoxine avec des vésicules de la membrane à bordure en brosse. Pour cette technique, les oligomères formés sont extraits de la solution tampon et non de la fraction qui contient les vésicules et ont un poids moléculaire d'environ 120 ou 250 kDa correspondant à celui des dimères ou des tétramères. Ces derniers sont aussi stables lorsqu'ils sont bouillis. Ces deux techniques pourraient être utilisées afin de vérifier si les mutants comportant une altération des résidus de l'hélice $\alpha 4$ dont l'activité est réduite relativement à celle de la Cry1Aa peuvent former des oligomères de façon efficace. Il serait aussi très intéressant de vérifier si ces deux techniques concordent entre-elles.

Soulignons que Gómez *et al.* (2002b) affirment que les tétramères produits par leur technique sont plus efficaces dans la formation de pores que les monomères de toxines qui sont activées simplement avec la trypsine ou du suc intestinal puisque l'hélice $\alpha 1$ est coupée avec leur technique. Notons toutefois que les résultats de cette étude sur la formation de pores ont été obtenus à l'aide d'une technique de fluorescence dont l'interprétation a récemment été remise en question (Kirouac *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant de vérifier leur hypothèse en effectuant des expériences de gonflement osmotique avec les tétramères formés à l'aide de leur technique.

Il serait aussi intéressant de vérifier si les mutations portant sur les résidus de l'hélice $\alpha 4$ qui entraînent une réduction d'activité ont un impact au niveau de la fixation irréversible de la toxine qui est associée à l'insertion dans la membrane. Les résultats permettraient de distinguer une diminution de l'insertion de la toxine dans la membrane d'un défaut de conformation de la toxine insérée qui serait responsable de la diminution de la perméabilité membranaire induite. Une technique consiste à modifier la protéine avec de l'iode radioactif (^{125}I) et d'incuber celle-ci avec des vésicules de la membrane à

bordure en brosse pour une période d'une heure. Par la suite, un excès de toxine non marquée est ajouté à la solution afin de déloger les protéines qui ne se sont pas insérées dans la membrane. Cette dernière incubation est arrêtée à divers moments par centrifugation et rinçage. La quantité de fixation non spécifique peut être évaluée en ajoutant un excès de toxine non marquée dès le début de l'expérience, au même moment que la toxine marquée. Ainsi, l'étude de la formation d'oligomères et de l'insertion dans la membrane des mutants de l'hélice $\alpha 4$ permettront d'identifier précisément à quelle étape de la formation des pores cette hélice joue principalement son rôle.

Il serait aussi intéressant de poursuivre l'étude de la protéolyse supplémentaire de la Cry1Aa par la chymotrypsine présentée dans le Chapitre 4 dans le contexte du modèle proposé par Gómez *et al.* (2002b) pour décrire le mode d'action des protéines Cry. Dans ce modèle, la toxine se fixe en premier sur les récepteurs de type cadhérine, ce qui permet le clivage de la toxine au niveau de l'extrémité C-terminale de l'hélice $\alpha 1$ et la formation d'oligomères ou prépores. Les prépores se fixent ensuite sur les récepteurs de type aminopeptidase N et s'insèrent dans la membrane pour former des pores. Le séquençage du fragment N-terminal provenant de la digestion supplémentaire de la Cry1Aa par la chymotrypsine en un fragment de 55 kDa (Chapitre 4, Fig. 1) pourrait nous permettre de vérifier si la toxine est clivée au niveau de l'hélice $\alpha 1$. Il serait aussi intéressant d'évaluer l'activité de cette nouvelle forme de la toxine à l'aide d'expériences de gonflement osmotique puisqu'il a été suggéré par Gómez *et al.* (2002b) que la digestion de l'hélice $\alpha 1$ est nécessaire à l'activité de la toxine.

Les résultats des modifications chimiques du mutant Y153C présentés dans le Chapitre 5 suggèrent que la tyrosine présente en position 153 dans la Cry1Aa non mutée contribue à l'ancrage de la protéine au niveau de l'interface entre le milieu aqueux et lipidique de la membrane, et que les agents utilisés afin de modifier la cystéine simuleraient l'action de ce résidu aromatique. Cette hypothèse pourrait se vérifier en effectuant des expériences visant à évaluer la fixation irréversible de la toxine, telles que celles mentionnées ci-dessus, avec le mutant Y153C en présence et en absence des agents chimiques utilisés dans les expériences présentées dans le Chapitre 5. L'importance d'autres acides aminés aromatiques situés dans les boucles à l'extrémité du domaine II pour la fixation irréversible de la toxine a déjà été mise en évidence

(Rajamohan *et al.*, 1996a, b; Wu *et al.*, 2000). Ces expériences pourraient être étendues aux autres acides aminés aromatiques de la toxine activée afin d'identifier les régions de la protéine qui interagissent avec la membrane et nous permettre d'établir la topologie du pore. De simples substitutions de ces résidus par une alanine ou par un autre acide aromatique pourraient être suffisantes pour ces expériences.

D'autres expériences de modification chimique portant cette fois sur la cystéine de l'hélice $\alpha 4$ des mutants pourraient aussi être effectuées. L'émission par la sonde fluorescente acrylodan (6-acryloyl-2-diméthylaminonaphthalène), qui se lie spécifiquement aux groupements thiol des cystéines, est fortement influencée par le milieu dans lequel elle se trouve. Il serait donc possible de déterminer si l'acide aminé modifié fait face à la lumière du pore, ou est situé dans la membrane ou même près d'un autre monomère de protéine, de façon similaire à ce qui a déjà été fait pour les toxines Cyt (Promdonkoy et Ellar, 2000). Ces expériences devront bien sûr se limiter aux mutants qui peuvent former des pores dans la membrane.

8. Conclusions

L'objectif de cette thèse était d'étudier le rôle de l'hélice $\alpha 4$ et des boucles inter-hélicales du domaine I dans la formation de pores par la Cry1Aa. À cette fin, des mutations cystéine ont été effectuées sur plusieurs acides aminés situés dans ces régions. En général, les mutations portant sur les acides aminés situés du côté hydrophobe de l'hélice $\alpha 4$ n'ont pas ou peu d'effet sur l'activité de la toxine tandis que celles portant sur les acides aminés du côté hydrophile entraînent une réduction importante de l'activité. La réduction d'activité observée pour certains mutants n'est pas le résultat d'un changement majeur de la sélectivité ionique ou de la taille des pores, mais est plutôt due à une diminution du nombre de pores qui ont été formés.

Rien n'indique que la structure des mutants de l'hélice $\alpha 4$ dont l'activité est négligeable est sensiblement différente de celle de la Cry1Aa. Dans certains cas, la diminution d'activité peut s'expliquer partiellement par la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. La formation d'un tel pont peut aussi expliquer certaines différences observées entre les expériences *in vitro* et *in vivo*, et de faibles différences observées dans le spectre de dichroïsme circulaire de certains mutants. Tous les mutants, à l'exception de L147C, peuvent toujours se fixer sur les récepteurs de la toxine. La réduction d'activité de certains mutants doit donc être attribuable principalement à une diminution de la formation d'oligomères ou de l'insertion de la protéine dans la membrane.

L'introduction d'un encombrement stérique par la modification chimique des mutants cystéine dont la mutation porte sur certains acides aminés des boucles situées près des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ nuit à la formation des pores. La modification chimique du mutant Y153C par des agents possédant une charge ou un groupement semblable à la chaîne latérale de l'acide aminé aromatique normalement présent sur la protéine stimule son activité. Ces agents pourraient permettre d'ancrer la protéine au niveau de l'interface entre le milieu aqueux et le milieu lipidique de la membrane, un rôle qui est souvent joué par les acides aminés chargés et plus particulièrement par les acides aminés aromatiques. Ces résultats indiquent que le segment de la protéine composé des hélices

$\alpha 4$ et $\alpha 5$ ainsi que de la boucle qui les relie joue un rôle crucial dans le processus d'insertion de la toxine dans la membrane, en accord avec le modèle d'insertion en parapluie.

Références

- Abdul-Rauf, M. et D. J. Ellar (1999) Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Curr. Microbiol.* **39**, 94-98.
- Abdullah, M. A., O. Alzate, M. Mohammad, R. J. McNall, M. J. Adang et D. H. Dean (2003) Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5343-5353.
- Abdullah, M. A. et D. H. Dean (2004) Enhancement of Cry19Aa mosquitocidal activity against *Aedes aegypti* by mutations in the putative loop regions of domain II. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3769-3771.
- Abdullah, M. A., A. P. Valaitis et D. H. Dean (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem.* **Volume 7**, Article 16.
- Abrami, L., M. Fivaz, E. Decroly, N. G. Seidah, F. Jean, G. Thomas, S. H. Leppla, J. T. Buckley et F. G. van der Goot (1998) The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J. Biol. Chem.* **273**, 32656-32661.
- Ahmad, W. et D. J. Ellar (1990) Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 97-104.
- Aimanova, K. G., M. Zhuang et S. S. Gill (2006) Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* **92**, 178-187.
- Alcantara, E. P., O. Alzate, M. K. Lee, A. Curtiss et D. H. Dean (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.
- Alzate, O., T. You, M. Claybon, C. Osorio, A. Curtiss et D. H. Dean (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.

- Arnold, S., A. Curtiss, D. H. Dean et O. Alzate (2001) The role of a proline-induced broken-helix motif in α -helix 2 of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *FEBS Lett.* **490**, 70-74.
- Aronson, A. (2000) Incorporation of protease K into larval insect membrane vesicles does not result in disruption of integrity or function of the pore-forming *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4568-4570.
- Aronson, A. I., C. Geng et L. Wu (1999) Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2503-2507.
- Aronson, A. I., E.-S. Han, W. McGaughey et D. Johnson (1991) The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 981-986.
- Aronson, A. I. et Y. Shai (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 1-8.
- Aronson, A. I., D. Wu et C. Zhang (1995) Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177**, 4059-4065.
- Atsumi, S., E. Mizuno, H. Hara, K. Nakanishi, M. Kitami, N. Miura, H. Tabunoki, A. Watanabe et R. Sato (2005) Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3966-3977.
- Avisar, D., M. Keller, E. Gazit, E. Prudovsky, B. Sneh et A. Zilberstein (2004) The role of *Bacillus thuringiensis* Cry1C and Cry1E separate structural domains in the interaction with *Spodoptera littoralis* gut epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 15779-15786.
- Bah, A., K. van Frankenhuyzen, R. Brousseau et L. Masson (2004) The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invertebr. Pathol.* **85**, 120-127.

- Ballester, V., F. Granero, R. A. de Maagd, D. Bosch, J. L. Mensua et J. Ferré (1999) Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1900-1903.
- Beegle, C. C. et T. Yamamoto (1992) History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* **124**, 587-616.
- Bietlot, H. P., P. R. Carey, M. Pozsgay et H. Kaplan (1989) Isolation of carboxyl-terminal peptides from proteins by diagonal electrophoresis: application to the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Anal. Biochem.* **181**, 212-215.
- Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar et J. Li (2005) Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348**, 363-382.
- Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat et J. Lescar (2006) Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188**, 3391-3401.
- Bosch, D., B. Schipper, H. van der Kleij, R. A. de Maagd et W. J. Stiekema (1994) Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Biotechnology* **12**, 915-918.
- Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens et M. Peferoen (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., S. Jansens et M. Peferoen (1992b) Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 237-246.
- Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson et P. C. Fitz-James (1980) Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **8**, 147-204.
- Burton, S. L., D. J. Ellar, J. Li et D. J. Derbyshire (1999) N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* **287**, 1011-1022.

- Carroll, J. et D. J. Ellar (1993) An analysis of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* **214**, 771-778.
- Carroll, J. et D. J. Ellar (1997) Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **245**, 797-804.
- Chang, W. X. Z., L. J. Gahan, B. E. Tabashnik et D. G. Heckel (1999) A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in Lepidoptera. *Insect Mol. Biol.* **8**, 171-177.
- Chen, J., M. R. Brown, G. Hua et M. J. Adang (2005) Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* **321**, 123-129.
- Chen, X. J., A. Curtiss, E. Alcantara et D. H. Dean (1995) Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **270**, 6412-6419.
- Chen, X. J., M. K. Lee et D. H. Dean (1993) Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9041-9045.
- Chestukhina, G. G., L. I. Kostina, A. L. Mikhailova, S. A. Tyurin, F. S. Klepikova et V. M. Stepanov (1982) The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch. Microbiol.* **132**, 159-162.
- Chiron, M. F., C. M. Fryling et D. J. FitzGerald (1994) Cleavage of *Pseudomonas* exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J. Biol. Chem.* **269**, 18167-18176.
- Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay et H. Kaplan (1990) Secondary structure of the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *J. Protein Chem.* **9**, 87-94.

- Choma, C. T., W. K. Surewicz et H. Kaplan (1991) The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 933-938.
- Cioffi, M. (1979) The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue Cell* **11**, 467-479.
- Cooper, M. A., J. Carroll, E. R. Travis, D. H. Williams et D. J. Ellar (1998) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem. J.* **333**, 677-683.
- Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade et R. Frutos (2001) Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* **276**, 35546-35551.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum et D. H. Dean (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807-813.
- Cummings, C. E., G. Armstrong, T. C. Hodgman et D. J. Ellar (1994) Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* **11**, 87-92.
- Daniel, A., D. H. Dean et M. J. Adang (2001) Analyses of the pore forming ability of *Bacillus thuringiensis* Cry1A mutant toxins using a light-scattering technique. *Pest. Biochem. Physiol.* **70**, 7-18.
- Daniel, A., S. Sangadala, D. H. Dean et M. J. Adang (2002) Denaturation of either *Manduca sexta* aminopeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exposes binding epitopes hidden under non-denaturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2106-2112.
- de Maagd, R. A., P. L. Bakker, L. Masson, M. J. Adang, S. Sangadala, W. Stiekema et D. Bosch (1999a) Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **31**, 463-471.

- de Maagd, R. A., P. L. Bakker, N. Staykov, S. Dukiandjiev, W. Stiekema et D. Bosch (1999b) Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4369-4374.
- de Maagd, R. A., M. S. Kwa, H. van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema et D. Bosch (1996a) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1537-1543.
- de Maagd, R. A., H. van der Klei, P. L. Bakker, W. J. Stiekema et D. Bosch (1996b) Different domains of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2753-2757.
- de Maagd, R. A., M. Weemen-Hendriks, J. W. Molthoff et S. Naimov (2003) Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Arch. Microbiol.* **179**, 363-367.
- de Maagd, R. A., M. Weemen-Hendriks, W. Stiekema et D. Bosch (2000) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1559-1563.
- Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S.-J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara et S. R. Hussain (1996) Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis - a minireview. *Gene* **179**, 111-117.
- Deng, W. P. et J. A. Nickoloff (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**, 81-87.
- Denolf, P., K. Hendrickx, J. Van Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele et J. Van Rie (1997) Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **248**, 748-761.

- Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele et J. Van Rie (1993) Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepodoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1828-1837.
- Derbyshire, D. J., D. J. Ellar et J. Li (2001) Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 1938-1944.
- Dorsch, J. A., M. Candas, N. B. Griko, W. S. Maaty, E. G. Midboe, R. K. Vadlamudi et L. A. Bulla, Jr. (2002) Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R₁ in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1025-1036.
- Dow, J. A. T. (1984) Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* **246**, R633-R636.
- Dow, J. A. T. (1992) pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**, 355-375.
- Du, C., P. A. W. Martin et K. W. Nickerson (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3847-3853.
- Estada, U. et J. Ferré (1994) Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3840-3846.
- Estela, A., B. Escriche et J. Ferré (2004) Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1378-1384.
- Feitelson, J. S., J. Payne et L. Kim (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**, 271-275.
- Fernandez, L. E., C. Perez, L. Segovia, M. H. Rodriguez, S. S. Gill, A. Bravo et M. Soberón (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.

- Flannagan, R. D., C. G. Yu, J. P. Mathis, T. E. Meyer, X. Shi, H. A. Siqueira et B. D. Siegfried (2005) Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 33-40.
- Flores, H., X. Soberón, J. Sánchez et A. Bravo (1997) Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* **414**, 313-318.
- Fortier, M., V. Vachon, R. Frutos, J.-L. Schwartz et R. Laprade (2007) Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6208-6213.
- Fortier, M., V. Vachon, M. Kirouac, J.-L. Schwartz et R. Laprade (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.
- Gahan, L. J., F. Gould et D. G. Heckel (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* **293**, 857-860.
- Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn et L. English (2001) Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 1101-1109.
- Garczynski, S. F., J. W. Crim et M. J. Adang (1991) Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2816-2820.
- Garner, K. J., S. Hiremath, K. Lehtoma et A. P. Valaitis (1999) Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 527-535.
- Gazit, E., D. Bach, I. D. Kerr, M. S. P. Sansom, N. Chejanovsky et Y. Shai (1994) The α -5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* **304**, 895-902.
- Gazit, E., P. La Rocca, M. S. P. Sansom et Y. Shai (1998) The structure and organization within the membrane of 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.
- Gazit, E. et Y. Shai (1993) Structural and functional characterization of the $\alpha 5$ segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry* **32**, 3429-3436.
- Gazit, E. et Y. Shai (1995) The assembly and organization of the $\alpha 5$ and $\alpha 7$ helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Relevance to a functional model. *J. Biol. Chem.* **270**, 2571-2578.
- Ge, A. Z., D. Rivers, R. Milne et D. H. Dean (1991) Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* **266**, 17954-17958.
- Ge, A. Z., N. I. Shivarova et D. H. Dean (1989) Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4037-4041.
- Gerber, D. et Y. Shai (2000) Insertion and organization within membranes of the δ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* **275**, 23602-23607.
- Gill, M. et D. Ellar (2002) Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* **11**, 619-625.
- Gill, S. S., E. A. Cowles et V. Francis (1995) Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27277-27282.
- Girard, F., V. Vachon, G. Préfontaine, L. Marceau, Y. Su, G. Larouche, C. Vincent, J.-L. Schwartz, L. Masson et R. Laprade (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., D. H. Dean, A. Bravo et M. Soberón (2003) Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. *Biochemistry* **42**, 10482-10489.

- Gómez, I., J. Miranda-Rios, E. Rudino-Pinera, D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo et M. Soberón (2002a) Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* **277**, 30137-30143.
- Gómez, I., D. I. Oltean, S. S. Gill, A. Bravo et M. Soberón (2001) Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* **276**, 28906-28912.
- Gómez, I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo et M. Soberón (2002b) 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.
- Griffitts, J. S., S. M. Haslam, T. Yang, S. F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P. S. Cremer, A. Dell, M. J. Adang et R. V. Aroian (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**, 922-925.
- Gringorten, J. L. (2001) Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, I. Ishaaya (ed.), pp. 167-207. Springer-Verlag, Berlin.
- Gringorten, J. L., D. N. Crawford et W. R. Harvey (1993) High pH in the ectoperitrophic space of the larval lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **183**, 353-359.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau et M. Cygler (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**, 447-464.
- Guihard, G., V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz (2000) Kinetic properties of the channels formed by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1C in the plasma membrane of Sf9 cells. *J. Membr. Biol.* **175**, 115-122.
- Herrero, S. et J. Ferré (2001) Comparison of different methodologies for binding assays of *Bacillus thuringiensis* toxins to membrane vesicles from insect midguts. *J. Invertebr. Pathol.* **78**, 275-277.
- Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hutter et V. Pliska (1988a) Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* **173**, 85-91.

- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens et H. Van Mellaert (1988b) Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7844-7848.
- Höfte, H. et H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242-255.
- Hua, G., K. Tsukamoto et H. Ikezawa (1998a) Cloning and sequence analysis of the aminopeptidase N isozyme (APN2) from *Bombyx mori* midgut. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **121**, 213-222.
- Hua, G., K. Tsukamoto, M. L. Rasilo et H. Ikezawa (1998b) Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin. *Gene* **214**, 177-185.
- Hua, G., K. Tsukamoto, R. Taguchi, M. Tomita, S. Miyajima et H. Ikezawa (1998c) Characterization of aminopeptidase N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**, 301-310.
- Hussain, S. R., A. I. Aronson et D. H. Dean (1996) Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 8-14.
- Ihara, H., E. Kudora, A. Wadano et M. Himeno (1993) Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 200-204.
- Ihara, H., T. Uemura, M. Masuhara, S. Ikawa, K. Sugimoto, A. Wadano et M. Himeno (1998) Purification and partial amino acid sequences of the binding protein from *Bombyx mori* for CryIAa δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **120**, 197-204.
- Jellis, C., D. Bassand, N. Beerman, C. Dennis, K. Farrell, J. C. Piot, J. Rusche, H. Carson et D. Witt (1989) Molecular biology of *Bacillus thuringiensis* and potential benefits to agriculture. *Israel J. Entomol.* **23**, 189-199.

- Jenkins, J. L., M. K. Lee, S. Sangadala, M. J. Adang et D. H. Dean (1999) Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. *FEBS Lett.* **462**, 373-376.
- Jenkins, J. L., M. K. Lee, A. P. Valaitis, A. Curtiss et D. H. Dean (2000) Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 14423-14431.
- Jurat-Fuentes, J. L. et M. J. Adang (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3127-3135.
- Kanintrankul, Y., I. Sramala, G. Katzenmeier, S. Panyim et C. Angsuthanasombat (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. Biotechnol.* **24**, 11-20.
- Karim, S. et D. H. Dean (2000) Pesticidal and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac δ -endotoxin mutants to *Pectinophora gossypiella* and *Helicoverpa zea*. *Curr. Microbiol.* **41**, 430-440.
- Karlova, R., M. Weemen-Hendriks, S. Naimov, J. Ceron, S. Dukiandjiev et R. A. de Maagd (2005) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1-Cry1Ac hybrids. *J. Invertebr. Pathol.* **88**, 169-172.
- Keeton, T. P. et L. A. Bulla, Jr. (1997) Ligand specificity and affinity of BT-R₁, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3419-3425.
- Kirouac, M., V. Vachon, J.-F. Noël, F. Girard, J.-L. Schwartz et R. Laprade (2002) Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**, 171-179.
- Kirouac, M., V. Vachon, D. Quievy, J.-L. Schwartz et R. Laprade (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., V. Vachon, S. Rivest, J.-L. Schwartz et R. Laprade (2003) Analysis of the properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins using a potential-sensitive fluorescent probe. *J. Membr. Biol.* **196**, 51-59.
- Klimpel, K. R., S. S. Molloy, G. Thomas et S. H. Leppla (1992) Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10277-10281.
- Knight, P. J. K., J. Carroll et D. J. Ellar (2004) Analysis of glycan structures on the 120 kDa aminopeptidase N of *Manduca sexta* and their interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 101-112.
- Knight, P. J. K., N. Crickmore et D. J. Ellar (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**, 429-436.
- Knowles, B. H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**, 275-308.
- Knowles, B. H. et J. A. T. Dow (1993) The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* **15**, 469-476.
- Knowles, B. H. et D. J. Ellar (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **924**, 509-518.
- Kwak, I. S., H. Lu et D. H. Dean (1995) Exploration of receptor binding of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**, 75-79.
- Lacy, D. B. et R. C. Stevens (1998) Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 778-784.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lebel, G. (2003) Rôle des boucles interhélicales du domaine I dans la formation de pores transmembranaires par la toxine insecticide Cry1Aa du bacille de Thuringe. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal. Montréal, Québec. 128 p.

- Lebel, G., V. Vachon, G. Préfontaine, F. Girard, L. Masson, M. Juteau, A. Bah, G. Larouche, C. Vincent, R. Laprade et J.-L. Schwartz (2008) 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. *Soumis à Appl. Environ. Microbiol.*
- Lee, M. K., J. L. Jenkins, T. H. You, A. Curtiss, J. J. Son, M. J. Adang et D. H. Dean (2001) Mutations at the arginine residues in $\alpha 8$ loop of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Lett.* **497**, 108-112.
- Lee, M. K., R. E. Milne, A. Z. Ge et D. H. Dean (1992) Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Biol. Chem.* **267**, 3115-3121.
- Lee, M. K., F. Rajamohan, J. L. Jenkins, A. S. Curtiss et D. H. Dean (2000) Role of two arginine residues in domain II, loop 2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **38**, 289-298.
- Lee, M. K., T. H. You, A. Curtiss et D. H. Dean (1996) Involvement of two amino acid residues in the loop region of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in toxicity and binding to *Lymantria dispar*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 139-146.
- Lee, M. K., T. H. You, F. L. Gould et D. H. Dean (1999) Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4513-4520.
- Lee, M. K., B. A. Young et D. H. Dean (1995) Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 306-312.
- Leetachewa, S., G. Katzenmeier et C. Angsuthanasombat (2006) Novel preparation and characterization of the $\alpha 4$ -loop- $\alpha 5$ membrane-perturbing peptide from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba δ -endotoxin. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 270-277.
- Li, J. (1996) Insecticidal δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In *Protein Toxin Structure*, M. W. Parker (ed.), pp. 49-77. R. G. Landes Co, Georgetown, TX.

- Li, J., J. Carroll et D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**, 815-821.
- Li, J., D. J. Derbyshire, B. Promdonkoy et D. J. Ellar (2001) Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 571-577.
- Liang, Y., S. S. Patel et D. H. Dean (1995) Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**, 24719-24724.
- Lightwood, D. J., D. J. Ellar et P. Jarrett (2000) Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* CryIAC δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5174-5181.
- Lorence, A., A. Darszon, C. Diaz, A. Liévano, R. Quintero et A. Bravo (1995) δ -Endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**, 217-222.
- Loseva, O. I., E. I. Tiktopulo, V. D. Vasiliev, A. D. Nikulin, A. P. Dobritsa et S. A. Potekhin (2001) Structure of Cry3A δ -endotoxin within phospholipid membranes. *Biochemistry* **40**, 14143-14151.
- Lu, H., F. Rajamohan et D. H. Dean (1994) Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* **176**, 5554-5559.
- Luo, K., Y. J. Lu et M. J. Adang (1996) A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 783-791.
- Luo, K., S. Sangadala, L. Masson, A. Mazza, R. Brousseau et M. J. Adang (1997a) The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 735-743.
- Luo, K., B. E. Tabashnik et M. J. Adang (1997b) Binding of *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1024-1027.

- Manoj Kumar, A. S. et A. I. Aronson (1999) Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181**, 6103-6107.
- Masson, L., Y.-J. Lu, A. Mazza, R. Brousseau et M. J. Adang (1995) The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* **270**, 20309-20315.
- Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas et R. Brousseau (1994) Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* **14**, 851-860.
- Masson, L., G. Préfontaine, L. Péloquin, P. C. K. Lau et R. Brousseau (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., B. E. Tabashnik, Y.-B. Liu, R. Brousseau et J.-L. Schwartz (1999) Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**, 31996-32000.
- Masson, L., B. E. Tabashnik, A. Mazza, G. Préfontaine, L. Potvin, R. Brousseau et J.-L. Schwartz (2002) Mutagenic analysis of a conserved region of domain III in the CryIAc toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 194-200.
- McGaughey, W. H. et M. E. Whalon (1992) Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* **258**, 1451-1455.
- Meza, R., M. E. Nuñez-Valdez, J. Sánchez et A. Bravo (1996) Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 333-339.
- Miranda, R., F. Z. Zamudio et A. Bravo (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.
- Morse, R. J., T. Yamamoto et R. M. Stroud (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* **9**, 409-417.

- Nagamatsu, Y., Y. Itai, C. Hatanaka, G. Funatsu et K. Hayashi (1984) A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 611-619.
- Nagamatsu, Y., T. Koike, K. Sasaki, A. Yoshimoto et Y. Furukawa (1999) The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* **460**, 385-390.
- Nagamatsu, Y., S. Toda, T. Koike, Y. Miyoshi, S. Shigematsu et M. Kogure (1998) Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 727-734.
- Nakamura, K., R. Murai-Nishioka, M. Shimizu, K. Oshie, K. Mikitani, K. Oeda et H. Ohkawa (1992) Insecticidal activity and processing in larval gut juices of genetically engineered 130-kDa proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1-7.
- Nakamura, K., K. Oshie, M. Shimizu, Y. Takada, K. Oeda et H. Ohkawa (1990) Construction of chimeric insecticidal proteins between the 130-kDa and 135-kDa proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for analysis of structure-function relationship. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 715-724.
- Nishimoto, T., H. Yoshisue, K. Ihara, H. Sakai et T. Komano (1994) Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEBS Lett.* **348**, 249-254.
- Nuñez-Valdez, M., J. Sánchez, L. Lina, L. Güereca et A. Bravo (2001) Structural and functional studies of α -helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**, 122-131.
- Oltean, D. I., A. K. Pullikuth, H. K. Lee et S. S. Gill (1999) Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4760-4766.
- Oppert, B., K. J. Kramer, D. E. Johnson, S. C. MacIntosh et W. H. McGaughey (1994) Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis*

- resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 940-947.
- Park, H.-W. et B. A. Federici (2004) Effect of specific mutations in helix α 7 of domain I on the stability and crystallization of Cry3A in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Biotechnol.* **27**, 89-100.
- Pérez, C., L. E. Fernandez, J. Sun, J. L. Folch, S. S. Gill, M. Soberón et A. Bravo (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 18303-18308.
- Peyronnet, O., B. Nieman, F. Génèreux, V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz (2002) Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**, 113-122.
- Pigott, C. R. et D. J. Ellar (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 255-281.
- Promdonkoy, B. et D. J. Ellar (2000) Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **350**, 275-282.
- Puntheeranurak, T., S. Leetacheewa, G. Katzenmeier, C. Krittanai, S. Panyim et C. Angsuthanasombat (2001) Expression and biochemical characterization of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B α 1- α 5 pore-forming fragment. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 293-298.
- Puntheeranurak, T., P. Uawithya, L. Potvin, C. Angsuthanasombat et J.-L. Schwartz (2004) Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its α 1- α 5 fragment. *Mol. Membr. Biol.* **21**, 67-74.
- Rajamohan, F., E. Alcantara, M. K. Lee, X. J. Chen, A. Curtiss et D. H. Dean (1995) Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177**, 2276-2282.
- Rajamohan, F., J. A. Cotrill, F. Gould et D. H. Dean (1996a) Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and

- irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* **271**, 2390-2396.
- Rajamohan, F., S. R. Hussain, J. A. Cotrill, F. Gould et D. H. Dean (1996b) Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb δ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts. *J. Biol. Chem.* **271**, 25220-25226.
- Rajamohan, F., M. K. Lee et D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **60**, 1-27.
- Rang, C., V. Vachon, F. Coux, C. Carret, W. J. Moar, R. Brousseau, J.-L. Schwartz, R. Laprade et R. Frutos (2001) Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* CryI toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Curr. Microbiol.* **43**, 1-6.
- Rang, C., V. Vachon, R. A. de Maagd, M. Villalon, J.-L. Schwartz, D. Bosch, R. Frutos et R. Laprade (1999) Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2918-2925.
- Sanchis, V. et D. J. Ellar (1993) Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS Lett.* **316**, 264-268.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler et D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775-806.
- Schnepf, E. H., K. Temezak, J. P. Ortega et H. R. Witheley (1990) Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 20923-20930.
- Schwartz, J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau et E. Rousseau (1993) Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**, 53-62.
- Schwartz, J.-L., M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Préfontaine, R. Brousseau et L. Masson (1997a) Restriction of intramolecular movements within the CryIAa

- toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* **410**, 397-402.
- Schwartz, J.-L. et R. Laprade (2000) Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, J.-F. Charles *et al.* (eds.), pp. 199-217. Kluwer Associate Publishing, Norwell, MA.
- Schwartz, J.-L. et L. Masson (2000) Structure-function analysis of cysteine-engineered entomopathogenic toxins. *Methods Mol. Biol.* **145**, 101-113.
- Schwartz, J.-L., L. Potvin, X. J. Chen, R. Brousseau, R. Laprade et D. H. Dean (1997b) Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3978-3984.
- Siegel, J. P. (2001) The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* **77**, 13-21.
- Slatin, S. L., C. K. Abrams et L. English (1990) Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 765-772.
- Smedley, D. P. et D. J. Ellar (1996) Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* **142**, 1617-1624.
- Smith, G. P. et D. J. Ellar (1994) Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* **302**, 611-616.
- Soberón, M., R. V. Perez, M. E. Nuñez-Valdez, A. Lorence, I. Gómez, J. Sánchez et A. Bravo (2000) Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 221-225.
- Sramala, I., P. Uawithya, U. Chanama, S. Leetachewa, C. Krittanai, G. Katzenmeier, S. Panyim et C. Angsuthanasombat (2000) Single proline substitutions of the selected helices of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin affect inclusion solubility and larvicidal activity. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **4**, 187-193.

- Tapaneeyakorn, S., W. Pornwiroon, G. Katzenmeier et C. Angsuthanasombat (2005) Structural requirements of the unique disulphide bond and the proline-rich motif within the α 4- α 5 loop for larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa δ -endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 519-525.
- Terra, W. R. et C. Ferreira (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**, 1-62.
- Tigue, N. J., J. Jacoby et D. J. Ellar (2001) The α -helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5715-5720.
- Tojo, A. et K. Aizawa (1983) Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 576-580.
- Tomimoto, K., T. Hayakawa et H. Hori (2006) Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa shows that almost the whole activated Cry1Aa molecule penetrates into the membrane. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **144**, 413-422.
- Tran, L. B., V. Vachon, J.-L. Schwartz et R. Laprade (2001) Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4488-4494.
- Tuntitippawan, T., P. Boonserm, G. Katzenmeier et C. Angsuthanasombat (2005) Targeted mutagenesis of loop residues in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin affects larvicidal activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 325-332.
- Vachon, V., G. Préfontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J.-L. Schwartz et R. Laprade (2002) Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* **41**, 6178-6184.
- Vachon, V., G. Préfontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J.-L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade et L. Masson (2004) Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6123-6130.

- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji et L. A. Bulla, Jr. (1993) A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**, 12334-12340.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji et L. A. Bulla, Jr. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 5490-5494.
- Valaitis, A. P., M. K. Lee, F. Rajamohan et D. H. Dean (1995) Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 1143-1151.
- van der Goot, F. G., F. Pattus, K. R. Wong et J. T. Buckley (1993) Oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin precedes insertion into lipid bilayers. *Biochemistry* **32**, 2636-2642.
- Villalon, M., V. Vachon, R. Brousseau, J.-L. Schwartz et R. Laprade (1998) Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**, 27-34.
- Von Tersch, M. A., S. L. Slatin, C. A. Kulesza et L. H. English (1994) Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3711-3717.
- Walker, B. et H. Bayley (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal α -hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J. Biol. Chem.* **270**, 23065-23071.
- Walker, B., M. Krishnasastri, L. Zorn et H. Bayley (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by staphylococcal α -hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 21782-21786.
- Walters, F. S., S. L. Slatin, C. A. Kulesza et L. H. English (1993) Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 921-926.

- White, S. H. et W. C. Wimley (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319-365.
- Widner, W. R. et H. R. Whiteley (1990) Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **172**, 2826-2832.
- Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, V. F. Sacchi, B. Giordana et G. M. Hanozet (1987) Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**, 301-308.
- Wolfersberger, M. G., X. J. Chen et D. H. Dean (1996) Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 279-282.
- Wolfersberger, M. G., C. Hofmann et P. Lüthy (1986) Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. In *Bacterial Protein Toxins*, P. Falmagne *et al.* (eds.), pp. 237-238. Gustav Fisher, Stuttgart.
- Wu, D. et A. I. Aronson (1992) Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**, 2311-2317.
- Wu, S. J. et D. H. Dean (1996) Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255**, 628-640.
- Wu, S. J., C. N. Koller, D. L. Miller, L. S. Bauer et D. H. Dean (2000) Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Lett.* **473**, 227-232.
- Yaoi, K., T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shinkawa, T. Takahashi, H. Iwahana et R. Sato (1997) Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* **246**, 652-657.