



HAL
open science

Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de Bacillus thuringiensis (Bt) dans le sol

Nordine Helassa

► **To cite this version:**

Nordine Helassa. Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de Bacillus thuringiensis (Bt) dans le sol. Biochimie [q-bio.BM]. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (Montpellier SupAgro), 2008. Français. NNT : . tel-00570169

HAL Id: tel-00570169

<https://theses.hal.science/tel-00570169>

Submitted on 27 Feb 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES
EN SCIENCES AGRONOMIQUES
(Montpellier SupAgro)

ECOLE DOCTORALE
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement
(SIBAGHE)

DOCTORAT

Discipline : Sciences Agronomiques

Nordine HELASSA

Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dans le sol

Thèse dirigée par Siobhán STAUNTON et Hervé QUIQUAMPOIX

Soutenue le 17 décembre 2008

Membres du Jury :

Fabrice MARTIN-LAURENT
Pascal SIMONET
Brigitte BRUNEL
Claire CHENU
Hervé QUIQUAMPOIX
Siobhán STAUNTON

Directeur de Recherche, INRA
Directeur de Recherche, CNRS
Professeur, Montpellier SupAgro
Professeur, AgroParisTech
Directeur de Recherche, INRA
Directeur de Recherche, INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Co-directeur de thèse
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Le projet de recherche sur le devenir de la toxine dans le sol a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, programme OGM). Ma bourse de thèse, quant à elle, a été co-financée par la région Languedoc Roussillon et le Département Environnement et Agronomie de l'INRA. Je remercie ces organismes pour m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche sur les OGM, sujet d'actualité à cheval sur la santé publique, l'environnement et aux enjeux sociétaux.

Aussi, je remercie l'action COST 862 (Bacterial toxins for insect control) pour m'avoir accordé une bourse pour une participation au congrès international : 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 9th International Conference on Bacillus thuringiensis (August 3-7, 2008 University of Warwick, Coventry, United Kingdom).

Cette thèse a été co-dirigée par Mme Siobhán Staunton, Directeur de Recherche à l'INRA (Montpellier) et M. Hervé Quiquampoix, Directeur de Recherche à l'INRA (Montpellier). Je vous remercie infiniment pour votre disponibilité, votre écoute, la qualité de votre encadrement et vos conseils scientifiques précieux. Je tiens à insister sur le fait que ces 3 ans de doctorat ont été particulièrement agréables et que c'est en grande partie grâce à vous. Vos qualités scientifiques et humaines ont très largement facilité mon travail. Je souhaite à tout futur doctorant d'être encadré par des personnes comme vous.

Je remercie vivement Fabrice Martin-Laurent, Directeur de Recherche à l'INRA (Dijon) et Pascal Simonet, Directeur de Recherche au CNRS (Lyon) d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et des remarques pertinentes qu'ils ont pu fournir. Aussi, je suis très reconnaissant envers Claire Chenu, Professeur (AgroParisTech) et Brigitte Brunel, Professeur (Montpellier SupAgro) d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse. Brigitte, j'en profite pour te remercier de m'avoir permis de participer à l'animation de travaux pratiques. Cette expérience fut très enrichissante.

Pour la partie plus technique de ma thèse, je tiens à remercier ...

... François Xavier Sauvage, Ingénieur d'Etude à l'INRA (Montpellier) pour ton aide précieuse en protéomique. Tes conseils avisés ont été fort utiles au bon déroulement de ce travail de recherche.

... Wojciech Szponarski, Ingénieur de Recherche à l'INRA (Montpellier) pour toutes les techniques de purifications d'anticorps et de protéines que tu as pu mettre à notre disposition.

... Gabrielle Daudin, Technicienne de Recherche à l'INRA (Montpellier) et Arij M'Charek, Doctorante (Faculté des Sciences de Tunis) pour leur aide précieuse notamment dans les expériences de FRAP et les études de persistance de la toxine dans le sol. Gabrielle, si seulement tu avais pu arriver au sein de notre unité au début de ma thèse... ça m'aurait énormément facilité le travail ! Ton aide fut précieuse aussi bien au niveau technique que gastronomique (merci pour tes petits encas de l'après midi qui ont pu me fournir assez d'énergie pour tenir le coup !)

... Josiane Abadie, Technicienne de Recherche à l'INRA (Montpellier) pour ton aide ponctuelle mais forte utile (souviens toi des passionnantes pesées de sol !) et ton soutien. Je retiendrai les passionnantes réunions dans ton bureau avec Gabrielle fournissant les chocolats et toi le thé à la menthe !

... Peggy Rigou, Ingénieur de Recherche à l'INRA (Montpellier) pour avoir partagé les secrets de la technique d'électroéluion que tu as mis au point sur le prion.

... Human Rezaei, Chargé de Recherche à l'INRA (Jouy-en-Josas) pour ton accueil chaleureux dans ton laboratoire, ta disponibilité et ton aide aux développements des techniques de purification de la toxine Bt. Ce cours stage au sein de ton unité a fait énormément avancer le travail de purification. Je t'en remercie.

... Christine Leguernevé Ingénieur de Recherche à l'INRA (Montpellier) pour les mesures d'étalement de la toxine sur les surfaces par RMN. Même si la technique s'est révélée incompatible avec les conditions de conservation de la toxine, je tiens à te remercier pour ta disponibilité et ton écoute.

... Béatrice Chabi, Chargé de Recherche à l'INRA (Montpellier) et Julien Cau, Ingénieur de Recherche au CNRS (Montpellier) pour l'initiation à la microscopie confocale et à la technique de FRAP. Béatrice, je tiens à te remercier pour ta disponibilité et du temps que tu as pu passer à me former sur le microscope confocal.

... Arnaud Martin-Garin, Chargé de Recherche à l'IRSN (Cadarache) pour la γ -stérilisation des sols.

... Céline Poncet-Legrand, Chargé de Recherche à l'INRA (Montpellier) et Aude Vernhet Professeur (Montpellier SupAgro) pour m'avoir formé et pour avoir mis à ma disposition l'appareil de diffusion dynamique de la lumière.

Je tiens aussi à remercier vivement les partenaires ANR de ce projet de recherche : Sylvie Noinville, Chargé de Recherche au CNRS (Thiais), Philippe Déjardin, Directeur de Recherche au CNRS (Montpellier) et Jean-Marc Janot, Chargé de Recherche au CNRS (Montpellier). Je vous remercie tous pour les précieux conseils et l'intérêt que vous avez pu porter à mon travail. Sylvie, je te remercie au même titre qu'Human pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire à Jouy-en-Josas, et notamment pour ta disponibilité. Je me souviens de nos réunions avec l'éternel question : la toxine est-elle sous forme monomère avant la manip mais surtout pendant la manip ??? Je pense que seule la toxine a réellement la réponse à cette question ;-)... Je garde aussi en mémoire les longs discours de Jean Marc sur la physique des lasers et les présentations colorées de Sylvie.

Je te suis très reconnaissant Roger Frutos, Directeur de Recherche au CIRAD (Montpellier) pour ta disponibilité, tes conseils et surtout ton optimisme. Dès que le moral baissait, il suffisait d'une entrevue avec toi pour être remonté à bloc ! Je te remercie alors pour tes conseils scientifiques mais je retiendrai surtout tes qualités humaines et ta capacité à positiver.

Enfin, je remercie M. Benoît Jaillard, Directeur de Recherche à l'INRA (Montpellier) d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, ainsi que le secrétariat et tout le personnel de l'UMR Eco&Sols pour avoir fait en sorte que je regrette de quitter le laboratoire au terme de ces 3 ans.

Je voudrai remercier ma femme, Marie pour son soutien, et la patience dont elle a fait preuve au cours de ces 3 années. Tu m'as remonté le moral quand il était au plus bas mais tu m'as aidé aussi à la rédaction des tableaux de ma thèse ;-) Tu te souviendra sûrement des soirées que nous avons passé au téléphone : toi à la maison, et moi au laboratoire.

Soumaya, ma petite fille de 2 ans, est née en plein milieu de ma thèse. Je te remercie d'avoir fait tes nuits dès la première semaine, de faire des grasses matinées et d'être sage comme une image. Tu es la petite fille parfaite, j'espère juste que ce n'est pas temporaire ;-)

Aussi, un grand merci à ma mère, sans qui je ne serai jamais arrivé où je suis maintenant. Je te remercie de m'avoir poussé et soutenu à faire des études. Je t'en suis aujourd'hui très reconnaissant. Tes sacrifices sont maintenant récompensés par le meilleur des cadeaux, la réussite scolaire de ton fils unique.

Maman, je t'aime et je te dédie cette thèse.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ALP-GPI	ALkaline Phosphatase – GlycosylPhosphatidyl-Inositol
APN-GPI	AminoPeptidase N – GlycosylPhosphatidyl-Inositol
BBMV	Brush Border Membrane Vesicles
BSA	Bovine Serum Albumin
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bta</i>	<i>Bacillus thuringiensis aizawai</i>
<i>Bte</i>	<i>Bacillus thuringiensis entomocidus</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
<i>Btt</i>	<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>
CADR	CADherin-like Receptor
CAPS	3-(CyclohexylAmino)-1-PropaneSulfonic acid
CHAPS	3-[(3-CHolamidopropyl)dimethylAmmonio]-1-PropaneSulfonate
CL ₅₀	Concentration Létale 50
Cry	Protéine cristale
Cyt	Protéine cytolytique
DTT	DiThioThreitol
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTIR	Fourier Transformed. InfraRed spectroscopy
GalNAc	N-Acétyl-galactosamine
GCR	GlycoConjugate Receptor
GM	Genetically Modified
<i>H. virescens</i>	<i>Heliothis virescens</i>
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	HorseRadish peroxidase
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence
ICP	Insecticidal Crystal Protein
IEP	IsoElectric Point
IF	Intensité de Fluorescence
ISAAA Applications	International Service for the Acquisition of Agri-biotech
kDa	Kilo Dalton
LMW	Low Molecular Weight standard
<i>M. sexta</i>	<i>Manduca sexta</i>
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
Mha	Million d'hectares
MOPS	4-MOrpholinePropaneSulfonic acid
<i>O. nubilalis</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
<i>P. interpunctella</i>	<i>Plodia interpunctella</i>
<i>P. xylostella</i>	<i>Plutella xylostella</i>

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDMS	Poly(DiMethylSiloxane)
PFT	Pore-Forming Toxin
PGM	Plante Génétiquement Modifiée
PMSF	PhenylMethaneSulfonyl Fluoride
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
ssp.	subspecies
TR-FRET	Time Resolved- Fluorescence Resonance Energy Transfer
var.	Variété
UV	Ultra violet

RESUME

Depuis leur commercialisation en 1996, les surfaces de cultures de plantes transgéniques Bt ont considérablement augmentées, représentant en 2007 près de 42 millions d'hectares. Ces plantes produisent en continu une protéine insecticide (issue de *Bacillus thuringiensis*) leur permettant de lutter contre les insectes ravageurs tels que la pyrale du maïs. La toxine est introduite dans les sols par exsudation racinaire et dégradation des tissus végétaux. Les interactions de la toxine avec les particules de sol peuvent modifier sa mobilité, sa biodisponibilité, sa persistance et sa toxicité. Il est donc important d'étudier le rôle du sol dans le devenir de cette toxine.

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre les interactions physicochimiques entre la toxine et les composantes du sol et en particulier avec les argiles, surfaces très réactives. L'adsorption de la toxine sur les argiles est une interaction de faible affinité, fortement dépendante du pH et difficilement réversible. La différence de quantité maximale de toxine adsorbée sur la montmorillonite et sur la kaolinite était fortement liée à leurs surfaces spécifiques respectives, plutôt qu'à leur charge de surface spécifique. Une analyse de la mobilité de la toxine à l'état adsorbé sur la montmorillonite par Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) a montré que cette protéine est immobilisée par son adsorption sur l'argile. Ces résultats suggèrent que le risque de transfert de la toxine dans le sol se limite aux transports facilités par les colloïdes et aux processus de bioturbation. Par ailleurs, des études de persistance de la toxine dans le sol ont montré que plus de 50 % de l'immuno-réactivité de la toxine est perdue en moins d'une semaine. Les processus biotiques (dégradations microbiennes) semblent peu impliqués dans ce phénomène. Il semblerait que la toxine ne soit pas dégradée mais plutôt inactivée par des changements de conformations suite à son interaction avec les composants du sol. Les processus abiotiques (interactions physicochimiques) sont donc fortement impliqués dans la persistance de la toxine dans le sol, avec une contribution significative des interactions hydrophobes. Dans ce travail de thèse, un effort important a été consacré à l'élaboration d'une méthode de détection *in situ* de la toxine dans le sol. Deux stratégies ont été envisagées, basées à la fois sur la spectroscopie de fluorescence et l'immunologie, mettant en jeu la reconnaissance soit de deux épitopes de la toxine par deux anticorps marqués (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET), soit la reconnaissance d'un épitope par un anticorps marqué après présaturation des surfaces (sites protéiques). Les résultats, encore préliminaires, sont encourageants et nécessitent d'être poursuivis.

Mots clés : organismes génétiquement modifiés (OGM); *Bacillus thuringiensis* (Bt); sol; adsorption; extraction; détection immunologique; persistance ; mobilité de surfaces.

SUMMARY

Since their commercialisation in 1996, the area of cultures of Bt transgenic plants has increased considerably, representing nearly 42 million hectares in 2007. These plants produce an insecticidal protein (from *Bacillus thuringiensis*) enabling them to resist devastating insects such as the European corn borer. The toxin is introduced into soil by root exudation and the breakdown of plant residues. The interactions of toxin with soil particles can influence its mobility, its bioavailability, its persistence and its toxicity. It is thus important to study the role of soil in the fate of this toxin. This doctoral study has improved our understanding of the physico-chemical interactions between toxin and the soil components and in particular the very reactive surfaces of clays. The adsorption of toxin on clays is weak affinity, strongly pH-dependent and not easily reversible. The difference in maximum quantity of toxin adsorbed on montmorillonite and kaolinite was in agreement with their respective specific surface areas, rather than with their specific surface charge. An analysis of the mobility of toxin in an adsorbed state on montmorillonite by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) showed that the protein is immobilized by its adsorption on the clay. These results suggest that the risk of transfer of toxin in soil will be limited to colloid facilitated transfer and bioturbation. Moreover, studies of persistence of toxin in soil showed that more than 50 % of the immuno-reactivity of toxin was lost in less than one week. The biotic processes (microbial degradation) do not seem to determine this phenomenon. The toxin appears to be inactivated by conformation changes following its interaction with soil constituents. Abiotic processes (physico-chemical interactions) thus are strongly implicated in persistence of toxin in soil, with a significant contribution of hydrophobic interactions. In this work, a considerable effort was devoted to the development of a method of *in situ* detection of toxin in soil. Two strategies were adopted, based both on fluorescence spectroscopy and immunology, involving the recognition of two epitopes of toxin by two marked antibodies (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) or the recognition of an epitope by a marked antibody after presaturation of the reactive surface (protein binding sites). The results, although preliminary, are encouraging and should be pursued.

Keywords: genetically modified organisms (GMO); *Bacillus thuringiensis* (Bt); soil; adsorption; extraction; immunological detection; persistence; surface mobility

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. Caractéristiques générales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2. Les δ -endotoxines de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
3. Mécanisme d'action des protéines de la famille des Cry1 chez les Lépidoptères	13
4. Utilisation de Bt et de ses dérivés en tant que biopesticide	18
5. Résistance des insectes à Bt.....	24
6. Impact des toxines Bt sur l'environnement.....	28
CHAPITRE 2. INTERACTIONS DE LA TOXINE BT AVEC LES ARGILES	39
doi:10.1016/j.soilbio.2008.12.008Abstract	41
1. Introduction.....	45
2. Materials and Methods.....	46
3. Results	48
4. Discussion	52
Acknowledgments	55
CHAPITRE 3. MOBILITE DE LA TOXINE BT A L'ETAT ADSORBE.....	59
Abstract.....	63
1. Introduction.....	65
2. Materials and Methods.....	65
3. Results and Discussion.....	66
4. Conclusion	70
Acknowledgments	70
CHAPITRE 4. PERSISTANCE DE LA TOXINE BT DANS LE SOL	73
Abstract.....	77
1. Introduction.....	79
2. Experimental	80
3. Results and Discussion.....	81
Acknowledgments	89
Supporting Information	90
CHAPITRE 5. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DE LA TOXINE BT EN PRESENCE DE SOL.....	99
1. Introduction.....	99

2. Matériels et Méthodes	101
3. Résultats et Discussion.....	108
4. Conclusions et perspectives.....	116
Annexe.....	117
CONCLUSION GENERALE	121
1. Interaction de la toxine avec les argiles : adsorption, désorption et mobilité 121	
2. Persistance de la toxine dans le sol et les mécanismes mis en jeu.....	122
3. Détection de la toxine à l'état adsorbé, des méthodes prometteuses.....	123
LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	135

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Sans lutte contre les insectes, les maladies et les mauvaises herbes, les pertes de récoltes peuvent être très importantes. Au niveau mondial, selon une estimation de Oerke et Dehne (1997), elles seraient de l'ordre de 400 milliards de dollars avec 80 % de perte pour le cotonnier, le riz et la pomme de terre, et de l'ordre 60 % pour le maïs. Les méthodes de cultures actuelles (protection et désherbage manuel), permettent de réduire ces pertes à 40 % pour le cotonnier et maïs et 50 % pour le riz et la pomme de terre (Oerke and Dehne, 1997).

Les insectes phytophages participent grandement à cette diminution de productivité agricole. Leur gestion repose en grande partie sur l'utilisation de pesticides chimiques qui apportent des bénéfices certains mais au détriment parfois de l'environnement et de la santé humaine (Rice et al., 2007). Aussi, l'utilisation massive et systématique de ces produits, comme toute pression de sélection qui devient constante, a conduit à l'émergence de génotypes résistants (Kranthi et al., 2001; Pray et al., 2002; Shelton et al., 2002). Ainsi, depuis le premier cas enregistré (résistance du pou de San José aux polysulfures dans les vergers de l'Illinois en 1905), les cas de résistance aux pesticides chimiques tels que le lindane, le malathion et les pyréthrinoïdes, ont augmenté de manière exponentielle. De plus, ces pesticides sont coûteux et présentent une efficacité limitée probablement parce qu'ils ne sont pas toujours appliqués au moment adéquat. De ce fait, il s'est révélé nécessaire d'établir de nouvelles stratégies visant à diminuer l'impact des produits phytosanitaires sur la santé publique et l'environnement, tout en permettant la protection des cultures.

Un fort intérêt pour les biopesticides s'est alors développé (Watkinson, 1994). Plus de 250 biopesticides sont vendus dans le monde (seulement 1 % du marché des pesticides) dont 80 % sont à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Mark E. Whalon, 2003). *Bacillus thuringiensis*, utilisé comme alternative ou en complément des pesticides synthétiques chimiques en agriculture, est maintenant l'agent de lutte biologique le plus utilisé dans le monde. Cette bactérie a la capacité, durant sa phase de sporulation, de produire des corps d'inclusions protéiques possédant une activité entomotoxiques majoritairement contre les Lépidoptères, Diptères et Coléoptères. Contrairement aux pesticides chimiques, ces δ -endotoxines sont très spécifiques de l'insecte cible. Elles nécessitent tout d'abord une solubilisation ainsi qu'une activation en toxine par les enzymes protéolytiques de l'insecte. Ensuite, elles se fixent spécifiquement sur des récepteurs membranaires situés au niveau des cellules intestinales. Enfin, cette toxine s'oligomérisse et forme un pore membranaire, induisant une paralysie intestinale puis la mort de l'insecte (Bravo et al., 2007; Mark E. Whalon, 2003). Ces toxines ont une faible persistance dans le sol avec des temps de demi-vie en moyenne inférieurs à 20 jours (Icoz and Stotzky, 2008). Ainsi, les risques potentiels pour l'environnement et la santé humaine semblent limités. Cependant, les formulations commerciales de Bt utilisées en lutte biologique, sont rapidement dégradées (Ultra-Violets et microorganismes) (Crecchio and Stotzky, 1998; Griego and Spence, 1978; Icoz and Stotzky, 2008; Koskella and Stotzky, 1997; Roush, 1994), et ne sont pas efficaces contre les insectes foreurs tels que la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. Cet insecte est le ravageur principal du maïs en Europe et en Amérique du Nord (où elle est appelée *European Corn Borer*, le « foreur européen du maïs ») et cause des pertes de 50 millions de dollars par an ne serait-ce que dans l'Etat de l'Illinois. Cet insecte se nourrit

en perforant les tiges et les épis des plantes et est donc très peu sensible aux épandages classiques de biopesticides.

Alors, pour faire face à ce nouveau fléau, des plantes génétiquement modifiées (PGM) pour produire la toxine insecticide Bt ont été développées. Ces plantes présentent l'avantage d'une production continue de la toxine dans toutes les cellules de la plante, permettant d'atteindre une plus grande diversité d'insectes tels que les insectes suceurs, piqueurs et les nématodes, qui n'étaient pas atteints lors d'un traitement biologique simple. Ainsi, les dégâts causés par la pyrale du maïs ont pu être maîtrisés. Aussi, de plus légères applications d'autres insecticides en complément suffisent, réduisant les coûts de production et les effets nocifs pour la santé humaine et l'environnement (Shelton et al., 2002). Par exemple, le coton transgénique Bt a permis de diminuer le nombre moyen d'applications d'insecticides foliaires aux Etats-Unis de 80 % et en Chine de 60 à 80 %, de 1995 à 2001 (Romeis et al., 2006). Ces avantages certains que présentent les PGM dans la productivité agricole ont conduit à un développement rapide de ces cultures dans le monde, et notamment sur les continents américain et asiatique. En effet, les surfaces de cultures transgéniques Bt sont passées de moins de 1 Mha en 1996 à plus de 40 Mha en 2007 (James, 2007). Cependant, la culture de plantes transgéniques à l'échelle commerciale reste quasi inexistante en Europe, par respect du principe de précaution. En effet, les effets à long terme des PGM sur l'environnement et la santé humaine ne sont pas encore clairement établis.

Le rôle du sol dans cette problématique environnementale est très important, mais assez peu étudié. La protéine Bt est introduite dans le sol par exsudation racinaire, par renouvellement des racines, par la litière et l'enfouissement des résidus de culture (Saxena et al., 1999; Saxena et al., 2004; Saxena and Stotzky, 2000). Comme pour d'autres protéines, elle s'adsorbe fortement et en partie irréversiblement sur les composants du sol. La minéralogie, la teneur en argile et le pH sont des propriétés du sol influant fortement sur l'adsorption des protéines et la réversibilité de cette adsorption par le biais d'interactions de nature aussi bien électrostatiques qu'hydrophobes (Quiquampoix and Ratcliffe, 1992; Quiquampoix et al., 2002; Staunton and Quiquampoix, 1994). Ces interactions avec les composants du sol peuvent avoir des conséquences sur la mobilité et la persistance de la toxine dans le sol. D'après Saxena et al. (2002), la mobilité verticale de la toxine semble limitée et donc ne poserait pas de risque de contamination des eaux souterraines (Saxena et al., 2002b). Cependant, les transferts horizontaux n'ont pas été étudiés. De même, de nombreuses équipes ont étudié la persistance de la toxine dans le sol sans pour autant mettre clairement en évidence les mécanismes impliqués. Il s'avère donc nécessaire, pour mieux évaluer l'impact environnemental quant à l'utilisation des PGM, de combler ces lacunes.

Dans cette optique, une compréhension des phénomènes d'adsorption/désorption est indispensable. Comme toute protéine, la toxine Bt s'adsorbe fortement sur les argiles et ces interactions sont fortement dépendantes des surfaces et des conditions de pH. L'objet du premier chapitre de ce travail de thèse sera alors, d'étudier les interactions physicochimiques entre la toxine et deux argiles modèles, en fonction du pH.

La mobilité des protéines dans le sol est un phénomène très peu étudié et il n'existe aucune information sur la mobilité à l'état adsorbé. Dans ce deuxième chapitre, une méthode de microscopie par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) habituellement utilisée pour suivre les dynamiques cellulaires sera adaptée à l'étude de la mobilité résiduelle de la toxine adsorbée sur une argile.

Par ailleurs, la persistance de la toxine dans le sol a fait l'objet de nombreuses études au champ et en laboratoire. Il semblerait que la toxine ne persiste pas dans le sol et que son temps de demi-vie est en général inférieur à 20 jours (Icoz and Stotzky, 2008). Cependant, les mécanismes biotiques et/ou abiotiques impliqués ne sont pas clairement établis. Une étude détaillée de la persistance de cette toxine dans le sol, présentée dans le troisième chapitre, permettra de mettre en avant certaines hypothèses sur les processus impliqués dans cette persistance.

A ce jour, il n'existe pas de méthode de détection des protéines dans le sol. Les méthodes de détection actuelles sont basées sur des biotests, qui sont coûteux, longs et peu reproductibles ; ou sur du dosage immunologique de type ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) qui sont très sensibles et reproductibles mais qui nécessitent une extraction chimique préalable, dont l'efficacité dépend fortement des caractéristiques physicochimiques des sols (Clark et al., 2005). L'élaboration d'une méthode de détection de la toxine *in situ* serait alors une grande avancée technologique, qui pourrait, à terme être appliquée à d'autres molécules d'intérêt. Cet objectif sera l'objet du quatrième et dernier chapitre.

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler avec la toxine Cry1Aa. Contrairement aux toxines Cry1Ab et Cry1Ac très répandues dans les PGM, la toxine Cry1Aa est encore peu utilisée. Cependant, Cry1Aa présente l'avantage d'avoir sa structure tridimensionnelle connue, facilitant les éventuelles interprétations structurales. Aussi, compte tenu du fort développement des surfaces de cultures transgéniques et pour éviter les risques d'apparition de phénomènes de résistance, elle pourrait, dans un futur proche, être fortement sollicitée.

Par ailleurs, nous n'avons pas produit la toxine en PGM mais en bactérie recombinante pour augmenter les rendements de production de la protéine. Les toxines Bt issues de PGM et de bactéries sont apparemment identiques puisque plusieurs études portant sur des toxines telles que la Cry1Ab, Cry3A, Cry34Ab1, Cry35Ab1 et Cry1F ont montré que leurs caractéristiques biochimiques (poids moléculaires, séquence en acides aminés et immuno-réactivité) étaient similaires. Aussi, aucune modification post-traductionnelle (glycosylation) par la plante n'a été observée (Gao et al., 2006; Gao et al., 2004; Hodgson, 2001).

C'est au regard de ces résultats que l'Environmental Protection Agency (EPA) et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) justifient l'utilisation des toxines microbiennes pour les études toxicologiques avant la mise sur le marché de nouvelles PGM.

CHAPITRE 1.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractéristiques générales de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie aérobie facultative, ubiquiste, Gram positive, caractérisée par l'activité entomopathogène des corps d'inclusions qu'elle produit lors de sa sporulation. Elle fait partie d'un groupe de six bacilles, rassemblés sous le terme « groupe *Bacillus cereus* » : *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus thuringiensis*. À l'état végétatif, *Bacillus thuringiensis* a la forme d'un bâtonnet de 5 µm de long sur 1 µm de large, et est pourvu de flagelles (**Figure 1-1**). Elle se distingue des autres bacilles du groupe par sa capacité à synthétiser des cristaux protéiques (**Figure 1-2**).

Elle a été isolée au Japon par Ishiwata (Ishiwata, 1901) dans des larves de vers à soie malades (*Bombyx mori*) et décrite par Berliner en 1911 en Thuringe (Allemagne). Depuis, différentes souches ont été isolées dans divers habitats tels que le sol (Carozzi et al., 1991; DeLucca et al., 1979; Hastowo et al., 1992; Martin and Travers, 1989; Smith and Couche, 1991), les insectes (Carozzi et al., 1991), la poussière de papillons (Burges and Hurst, 1977; DeLucca et al., 1979; Meadows et al., 1992), et des feuilles de conifères (Kaelin et al., 1994; Smith and Couche, 1991).

La plupart des Lépidoptères sont sensibles aux cristaux produits par les souches *kurstaki* et *aizawai* et plus récemment *tenebrionis* (ou *san diego*) (Drummond and Pinnock, 1994). Depuis la découverte de la souche *israelensis*, spécifique des Diptères, le spectre d'hôtes de *Bacillus thuringiensis* s'est vu augmenté de plus de 100 espèces de moustiques et simules.

Les propriétés entomotoxiques de *Bacillus thuringiensis* ont tout l'intérêt commercial. Les premiers essais de lutte biologique avec Bt ont été réalisés en Hongrie dans les années 1920 et en Yougoslavie dans les années 1930 pour contrôler principalement les Lépidoptères (Beegle and Yamamoto, 1992). Les résultats prometteurs de ces essais ont conduit à la production du premier produit commercial en France en 1938 par les laboratoires Libec, la Sporéine. Par la suite, un nouveau produit, le Thuricide apparut au début des années 1960 (Lord, 2005). En 1976, la découverte des sérotypes *israelensis* (*Bti*) et *tenebrionis* (*Btt*) a permis l'ouverture de nouveaux marchés, grâce à une action larvicide sur les moustiques, les simules et les coléoptères. Cependant, l'utilisation de Bt en lutte contre les ravageurs ne représente à ce jour que moins de 2 % du marché mondial des insecticides.

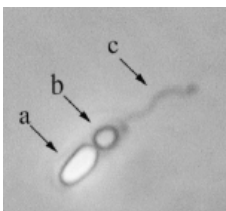


Figure 1-2. Image de *Bacillus thuringiensis* en microscopie en contraste de phase ; a : spore ; b : inclusion parasporale contenant les cristaux de protéines ; c : filament (Rampersad et al., 2003).

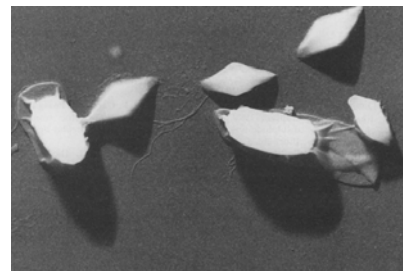


Figure 1-1. Cristaux de Bt observés en microscopie électronique à transmission (Du et al., 1994).

2. Les δ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis*

Lors de la sporulation, Bt synthétise des inclusions de cristaux essentiellement composés de une ou plusieurs protéines cristales (Cry) et cytolytiques (Cyt). Elles sont aussi appelées δ -endotoxines, et peuvent représenter 20 à 30 % du poids sec des cellules sporulées (Agaisse and Lereclus, 1995; Baum and Malvar, 1995). Les protéines Cry sont synthétisées sous forme de protoxines d'environ 70 kDa ou 130 kDa dont la forme toxique est de 66-67 kDa (moitié N-terminale du précurseur). Elles appartiennent à la classe des PFT (Pore-Forming Toxin) dans la catégorie des toxines en hélices- α , pour lesquelles les hélices forment un pore transmembranaire (Parker and Feil, 2005). Ces toxines sont excrétées par la bactérie productrice, activées par les protéases de l'hôte puis se lient aux récepteurs membranaires de la cellule cible par la formation d'un oligomère capable de s'insérer dans la membrane cellulaire.

Plus de 150 protéines Cry ont été découvertes chez *B. thuringiensis* et *cereus* (Schnepf et al., 1998) ciblant des insectes différents tels que les Lépidoptères, les Diptères, les Coléoptères mais aussi les Hyménoptères, les Homoptères, les Orthoptères, les Mallophages, les nématodes, les mites et les protozoaires (Beegle and Yamamoto, 1992; Feitelson et al., 1992).

2.1. Classification des gènes des protéines Cry

La classification proposée par Höfte et Whiteley est basée sur la structure primaire des protéines et leur spectre d'hôtes (Höfte and Whiteley, 1989). Plus de 14 gènes distincts de protéines cristales (*cry*) ont été décrits permettant une répartition en quatre classes majeures : *cryI* dirigé contre les Lépidoptères, *cryII* contre les Lépidoptères et les Diptères, *cryIII* contre les Coléoptères et *cryIV* contre les Diptères. Une classe supplémentaire a été ajoutée ultérieurement, *cryV*, dirigé contre les Lépidoptères et les Coléoptères (Höfte and Whiteley, 1989). Par ailleurs, ce spectre d'hôtes évolue constamment puisque de nouvelles souches sont produites régulièrement en laboratoire. Le plus souvent, elles produisent plus d'un groupe de protéines comme par exemple la souche HD-1 de *Bt kurstaki* qui produit les toxines CryIAa, CryIAb et CryIAC. Cette coexpression de plusieurs toxines permet d'élargir le spectre d'hôtes d'une souche donnée (Jarrett and Stephenson, 1990).

Devant l'évolution permanente dans la découverte de nouveaux gènes, une nouvelle classification a alors été proposée (Crickmore et al., 1998). Cette classification est basée uniquement sur les similarités de séquences en acides aminés avec une syntaxe variant légèrement de celle proposée par Höfte et Whiteley (1989). Ainsi, un nouveau numéro de groupe en chiffre arabe est attribué lorsqu'une protéine possède < 45 % d'homologie avec une protéine connue, une nouvelle lettre majuscule lorsqu'elle présente entre 45 % et 75 % d'homologie et enfin une nouvelle lettre minuscule pour 75 % à 95 % d'homologie (Crickmore et al., 1998). A ce jour, plus de 50 gènes sont séquencés et répartis en 15 groupes.

2.2. Relation structure-fonction

A ce jour, la structure tridimensionnelle de 6 protéines cristales a été décrite par cristallographie aux rayons X : Cry1Aa, Cry3Aa, Cry4Aa, Cry2Aa, Cry3Bb, Cry4Ba (Boonserm et al., 2005; Galitsky et al., 2001; Grochulski et al., 1995; Li et al., 1991; Morse et al., 2001) (**Figures 1-3 et 1-4**).

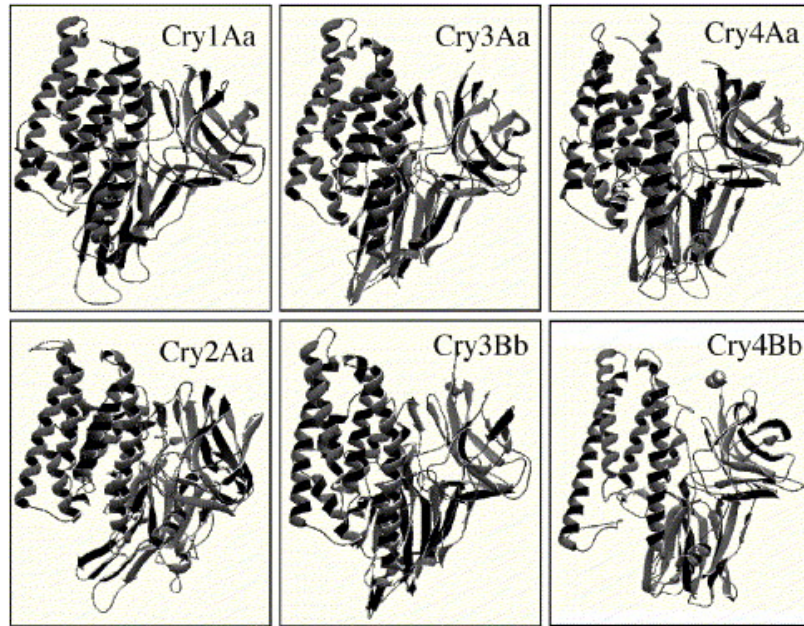


Figure 1-3. Structure tridimensionnelle des protéines cristales Cry1Aa, Cry3Aa, Cry4Aa, Cry2Aa, Cry3Bb, Cry4Ba (Bravo et al., 2007).
NB : il y a une erreur typographique dans la Figure, la sixième structure correspond à la Cry4Ba et non pas à la Cry4Bb.

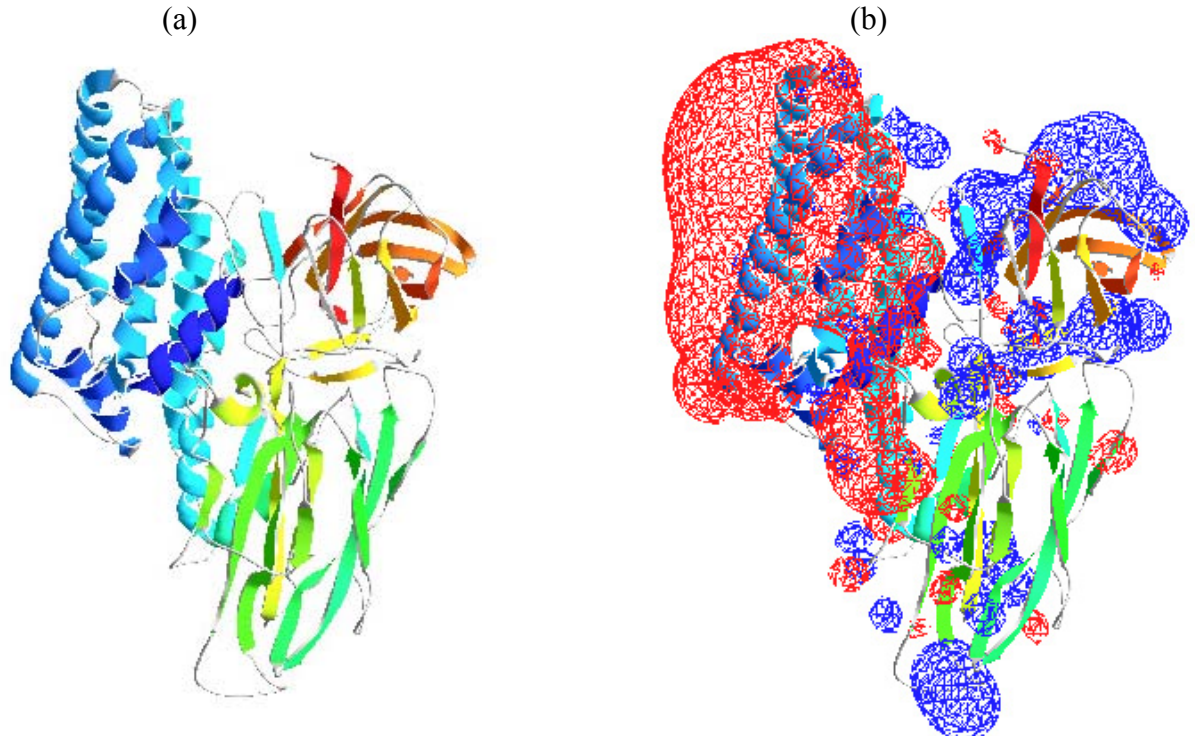


Figure 1-4. (a) Structure tridimensionnelle et (b) potentiel électrostatique de la toxine Cry1Aa (en bleu les charges positives et en rouge les charges négatives), modélisés par Swiss-PDB Viewer.

Bien qu'il y ait une grande variation de séquences génétiques entre les différentes classes de toxines Cry, la comparaison des structures tridimensionnelles des Cry1, Cry2 et Cry3 montre un haut degré de similarité de structure et donc probablement de fonctionnalité (de Maagd et al., 2001). Les similarités de structure sont de 50 à 90 % dans une même classe et de 20 à 30 % entre les classes (**Tableau 1-1**) (Crickmore et al., 1998; Höfte and Whiteley, 1989). Les structures des Cry3A et Cry1Aa sont très similaires même si elles ne possèdent que 36 % de similarité de séquences protéiques. Les principales différences se situent au niveau du domaine II de la protéine, impliqué de la reconnaissance du récepteur. Aussi, une comparaison de la structure du cristal de Cry1Aa et Cry1Ac montre que les différences majeures se situent au niveau des domaines II et III (Li et al., 2001b). Ces changements reflètent la différence de spécificité de ces 2 toxines.

Cry2A ne possède que 20 % de similarité de séquences en acides aminés avec les toxines Cry3A et Cry1Aa, du fait d'un domaine N-terminal très différent (propeptide). Cependant, leur structure tridimensionnelle reste très similaire, suggérant que ce domaine N-terminal ne joue pas un rôle majeur dans la conformation de la protéine (Parker and Feil, 2005).

Alors, ces différences de séquences qu'il existe entre les toxines Cry sont probablement responsables de leur spécificité vis-à-vis de l'insecte cible.

Tableau 1-1. Pourcentage de similarité de séquences en acides aminés entre différentes protéines Cry (Crickmore et al., 1998; Höfte and Whiteley, 1989).

	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ba	Cry1Ca	Cry1Da	Cry3A	Cry4A	Cry4B	Cry4C
Cry1Aa	90	82	55	67	71	25	27	27	22
Cry1Ab		86	56	66	71	28	27	27	23
Cry1Ac			55	67	70	23	28	24	24
Cry1Ba				58	56	34	26	28	22
Cry1Ca					70	31	26	30	21
Cry1Da						23	28	28	22
Cry3A							23	19	26
Cry4A								54	29
Cry4B									29

Les cristaux protéiques sont initialement sous forme de protoxines avant leur activation en toxines par l'insecte cible. Ces protoxines peuvent être décomposées en deux fragments :

- Un fragment dit « structural » (C-terminal), responsable de la formation et la stabilité du cristal par la présence de ponts disulfures (fragment riche en cystéines) (Bietlot et al., 1990; Höfte and Whiteley, 1989). Cette première moitié C-terminale est très conservée pour les gènes *cry* suggérant qu'elle ne joue pas un rôle majeur dans la toxicité mais plutôt dans le maintien et la solubilité des toxines.
- Un fragment dit « toxique » (N-terminal), responsable de l'activité insecticide proprement dite (Choma and Kaplan, 1990; de Maagd et al., 2001). Ce fragment peut être à son tour décomposé en 3 domaines distincts (de Maagd et al., 2001; Schnepf et al., 1998) (**Figure 1-5**) :
 - Le domaine I (partie N-terminale), contenant 7 hélices- α organisées en 3 paires d'hélices amphipathiques autour d'une hélice centrale

hydrophobe, impliqué dans l'insertion dans la membrane et donc dans la formation des pores dans l'épithélium intestinal de l'organisme cible.

- Le domaine II, formé de 3 feuillets- β et impliqué dans la reconnaissance et la fixation de la toxine sur le récepteur.
- Le domaine III (partie C-terminale), structuré en β -sandwichs impliqués à la fois dans la reconnaissance et la liaison de la protéine aux récepteurs membranaire des cellules épithéliales (Allured et al., 1986; Choe et al., 1992; Ge et al., 1991; Schnepf et al., 1990). Ce domaine est aussi impliqué dans la formation du pore membranaire (Ojcius and Young, 1991) et le fonctionnement du canal ionique (MacKinnon and Miller, 1989; MacKinnon and Yellen, 1990; Yool, 1994). Cette partie C-terminale contrôle la spécificité vis-à-vis de l'insecte cible si bien qu'une mutation dans ce domaine permet de modifier le spectre d'hôtes (de Maagd et al., 2001).

Aussi, il existe des ponts salins intra et intermoléculaires présents dans les domaines II et III qui sont responsables du maintien de la protéine sous sa forme globulaire durant la solubilisation et l'activation (Grochulski et al., 1995; Li et al., 1991).

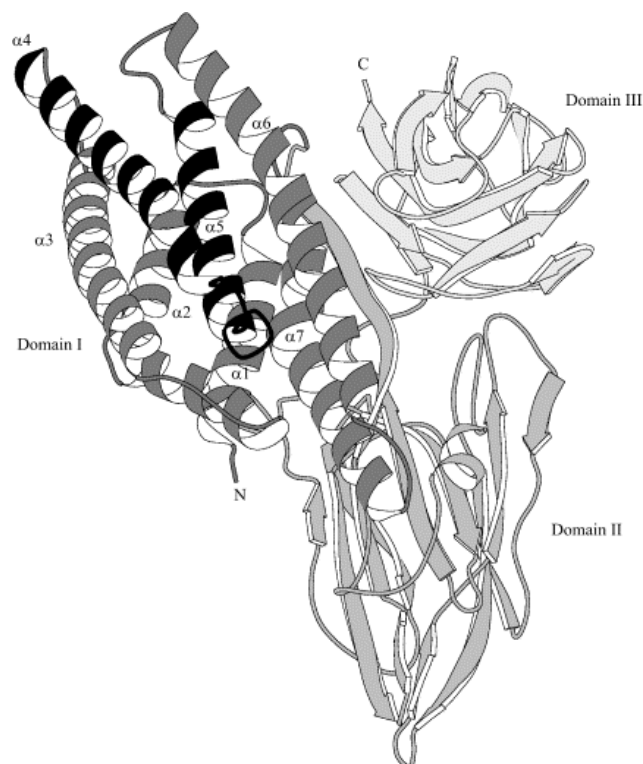


Figure 1-5. Représentation d'une protéine insecticide Cry avec la mise en évidence des 3 domaines structuraux de la toxine (domaines I, II et III). La région transmembranaire apparaît en noir (Parker and Feil, 2005).

Par ailleurs, à l'intérieur de ces 3 domaines, 5 blocs d'acides aminés sont très conservés entre la majeure partie des différentes toxines Cry, suggérant une structure tertiaire assez conservée (Höfte and Whiteley, 1989) (**Figure 1-6**).

- Le bloc 1, comprenant l'hélice $\alpha 5$ du domaine I, hélice impliquée dans la formation du pore membranaire, expliquant sa grande conservation. Sa situation centrale peut influencer sur le maintien structural des autres hélices.
- Le bloc 2, comprenant l'hélice $\alpha 7$ du domaine I et le premier feuillet- β du domaine II correspondant à la région de contact entre le domaine I et II.
- Les blocs 3, 4 et 5, comprenant le dernier feuillet- β du domaine II et les feuillets- β du domaine III.

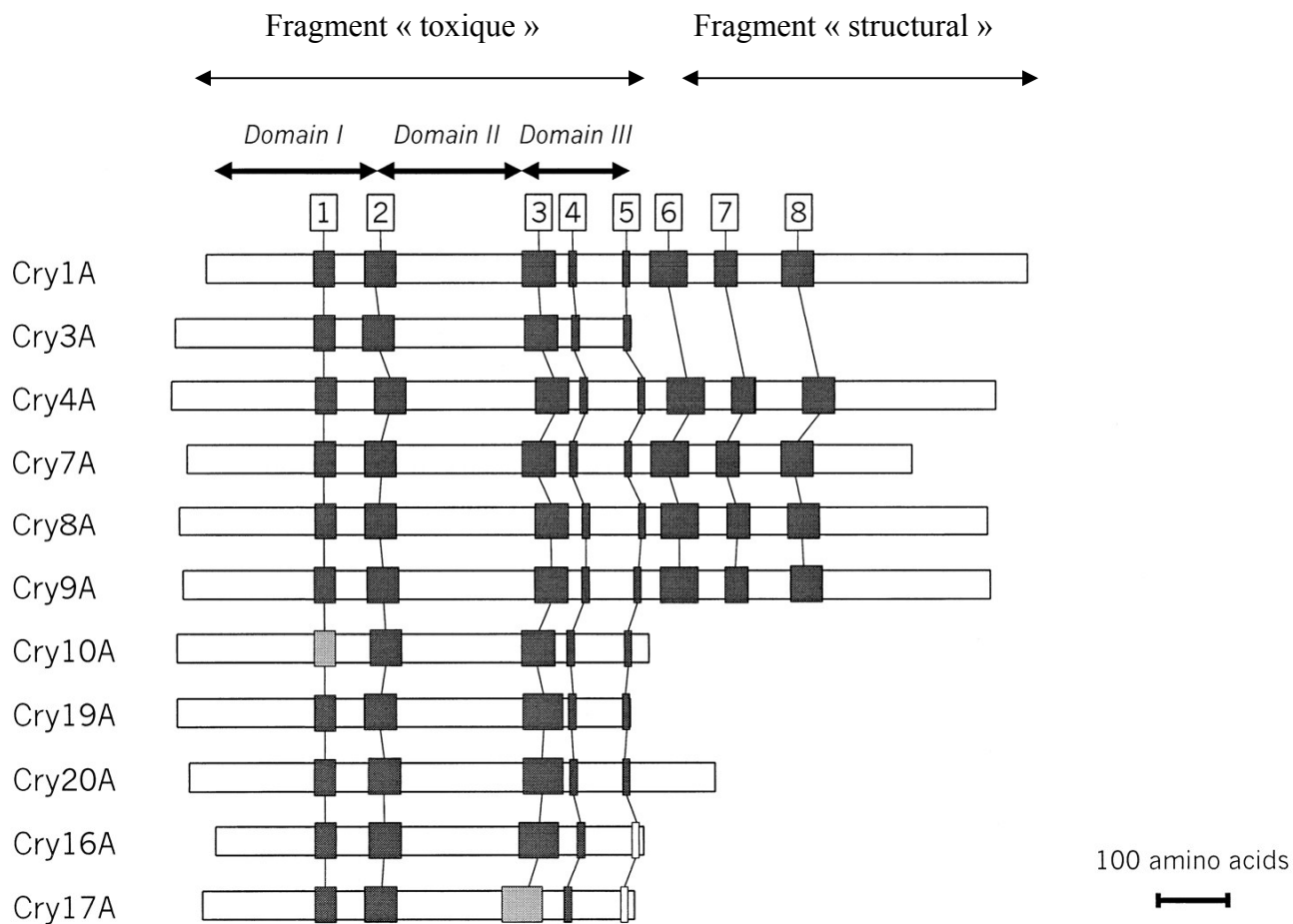


Figure 1-6. Positions des blocs conservés sur différentes protéines Cry. Les blocs sont représentés en noir, gris ou blanc indiquant un important, modéré ou faible degré de similarité, respectivement (Schnepf et al., 1998).

3. Mécanisme d'action des protéines de la famille des Cry1 chez les Lépidoptères

Pour que *Bacillus thuringiensis* puisse attaquer et coloniser une larve, différentes étapes sont nécessaires : les cristaux protéiques doivent être solubilisés dans l'intestin de l'insecte et activés par les enzymes protéolytiques de l'hôte. Dès lors, la liaison de la toxine aux récepteurs des cellules épithéliales, et l'insertion dans la membrane apicale permettent la formation de pores membranaires conduisant à la mort de l'insecte (Jenkins et al., 2000) (Figure 1-7).

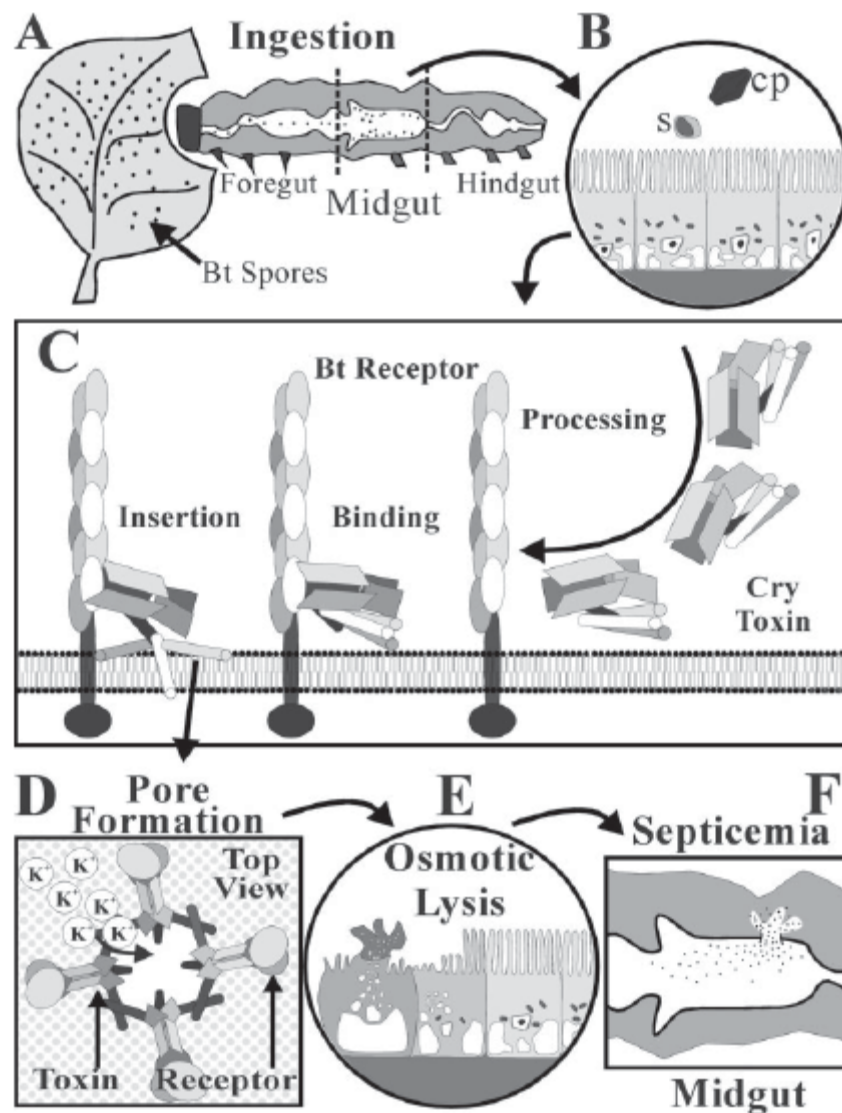


Figure 1-7. Mécanisme d'action des protéines insecticides Cry1

A : ingestion des cristaux par la larve, B : solubilisation dans l'intestin, C : activation protéolytique par les enzymes intestinales de l'insecte, D : Liaison des toxines activées aux récepteurs membranaires après polymérisation et insertion dans la membrane, E : Formation du pore membranaire induisant une lyse osmotique, F : et la mort de l'insecte (Mark E. Whalon, 2003).

3.1. Solubilisation des cristaux de protoxines et activation sous forme de toxine

Les inclusions de cristaux formés par les protéines Cry peuvent avoir différentes formes en fonction de leur composition en protoxines : bipyramidal (Cry1), cuboïdal (Cry2), rectangulaire plat (Cry3A), irrégulier (Cry3B), sphérique (Cry4A et Cry4B) et rhomboïdal (Cry11A). Pour devenir biologiquement actif, ces cristaux doivent être rapidement et efficacement solubilisés dans l'intestin de la larve d'insecte (Schnepf et al., 1998). Pour la plupart des Lépidoptères, les cristaux de protoxines sont solubilisés par le pH alcalin (10-11) de l'intestin de l'insecte (Hofmann et al., 1988a), détruisant les ponts disulfures intermoléculaires (Li et al., 1991) et libérant ainsi les protoxines dans la lumière intestinale.

Dès lors, ces protoxines sont susceptibles d'être digérées par les enzymes protéolytiques intestinales de l'insecte (Lecadet and Dedonder, 1967; Tojo and Aizawa, 1983) pour donner naissance à des toxines actives. La plupart des protéases intestinales des Lépidoptères sont de type trypsine (Milne and Kaplan, 1993) ou chymotrypsine (Johnston et al., 1995; Novillo et al., 1997; Peterson et al., 1995). Les protoxines sont digérées en un fragment toxique de 65-70 kDa en commençant par l'extrémité C-terminale (Chestukhina et al., 1982; Choma et al., 1990; Choma et al., 1991) et sont clivées au niveau des 25-30 acides aminés du côté N-terminal (Bravo et al., 2007; Nagamatsu et al., 1984) (**Figure 1-8**). Ce fragment toxique peut alors reconnaître spécifiquement les récepteurs situés sur la membrane apicale des cellules intestinales de la larve d'insecte et former un pore par l'insertion de son domaine I, induisant la mort de l'insecte infecté.

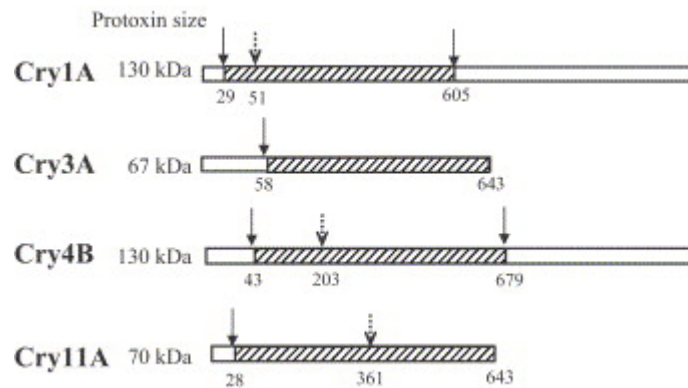


Figure 1-8. Longueurs relatives des protoxines Cry ainsi que les positions des digestions par les protéases (flèches pleines). Les flèches en pointillés représentent les clivages intramoléculaires. Les parties hachurées correspondent au fragment toxique (Bravo et al., 2007).

3.2. Liaison au récepteur

Une fois activées, les toxines se fixent à des récepteurs spécifiques des microvillosités intestinales des insectes susceptibles (Hofmann and Luthy, 1986; Hofmann et al., 1988a; Hofmann et al., 1988b), permettant l'insertion dans la membrane apicale (Cooper et al., 1998). Pour les toxines Cry1A, au moins 4 types de récepteurs ont été décrits : Cadherin-like (CADR) (Dorsch et al., 2002; Xie et al., 2005), aminopeptidase

N – glycosylphosphatidyl-inositol (APN-GPI) (Knight et al., 1994; Luo et al., 1997), alkaline phosphatase – glycosylphosphatidyl-inositol (ALP-GPI), glycoconjugué (GCR) de 270 kDa (Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Knight et al., 1994; McNall and Adang, 2003; Vadlamudi et al., 1995; Valaitis et al., 2001) (**Figure 1-9**).

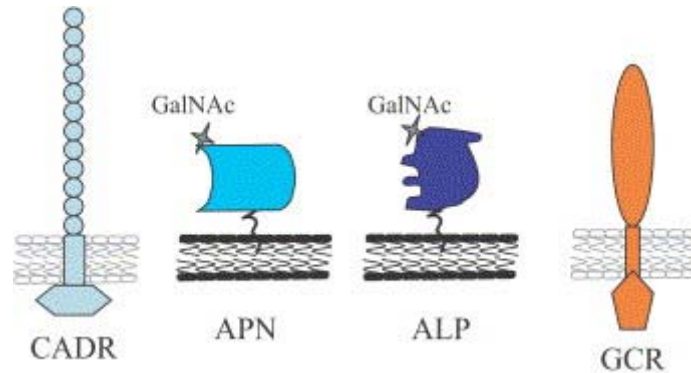


Figure 1-9. Récepteurs des protéines Cry1A : CADR, récepteur cadherin-like; APN, aminopeptidase N ; ALP, alkaline phosphatase ; GCR, glycoconjugué de 270 kDa (Bravo et al., 2007).

(GalNAc, N-Acétyle-galactosamine)

Le mécanisme de reconnaissance toxine-récepteur a été très décrit chez *Manduca sexta* pour lequel il existe au moins 2 types de récepteurs : CADR (Bt-R1) (Francis and Bulla, 1997; Keeton and Bulla, 1997; Vadlamudi et al., 1993), et APN (Knight et al., 1994; Luo et al., 1996; Sangadala et al., 1994; Vadlamudi et al., 1995) :

Les récepteurs CADR : Des expériences en résonance plasmon de surface (SPR) ont montré une affinité de liaison de Cry1A pour Bt-R1 d'environ 1 nM (Vadlamudi et al., 1995). L'interaction des protéines Cry1A avec Bt-R1 met en jeu au moins 3 épitopes de liaisons : 2 situés dans le domaine II de la toxine et 1 situé sur le récepteur CADR (Gomez et al., 2003; Gomez et al., 2002a; Gomez et al., 2001).

Les récepteurs APN : Les toxines Cry1A se lie à l'APN avec une affinité d'environ 100 nM (Atsumi et al., 2005; Jenkins and Dean, 2000). Suivant les toxines Cry1A, les épitopes impliqués sont différents. Cry1Ac fixe l'APN par son domaine III qui reconnaît spécifiquement la partie GalNAc, (Masson et al., 1995) alors que l'épitope de Cry1Ab se situe au niveau du domaine II (Jenkins and Dean, 2000). Ce même type de configuration de double récepteur a été observé chez *Heliothis virescens* (Luo et al., 1997) et *Lymantria dispar* (Valaitis et al., 1995; Valaitis et al., 1997). Dans le cas de *L. dispar*, un modèle séquentiel de la reconnaissance de Cry1Ac et APN-GalNAc a été proposé (Jenkins et al., 2000) (**Figure 1-10**), dans lequel l'interaction du domaine III avec APN-GalNAc facilite celle du domaine II avec une autre région de ce récepteur.

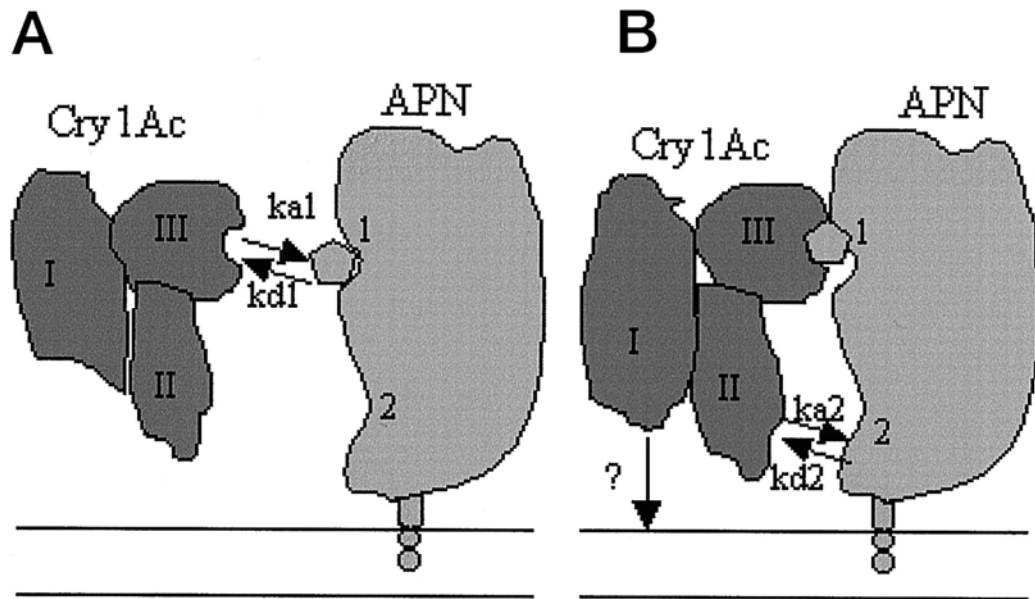


Figure 1-10. Modèle séquentiel de la liaison de la toxine Cry1Ac à l'APN de *L. dispar*. A : La reconnaissance entre le domaine III de la toxine et la partie GalNAc de l'APN, B : facilite la reconnaissance entre le domaine II et l'APN, induisant l'insertion potentielle du domaine I dans la membrane (Jenkins et al., 2000).

3.3. Formation du pore membranaire et mort cellulaire

Avant leur insertion dans la membrane, de nombreuses PFT (Pore-Forming Toxins) forment une structure oligomérique soluble (**Figure 1-11**).

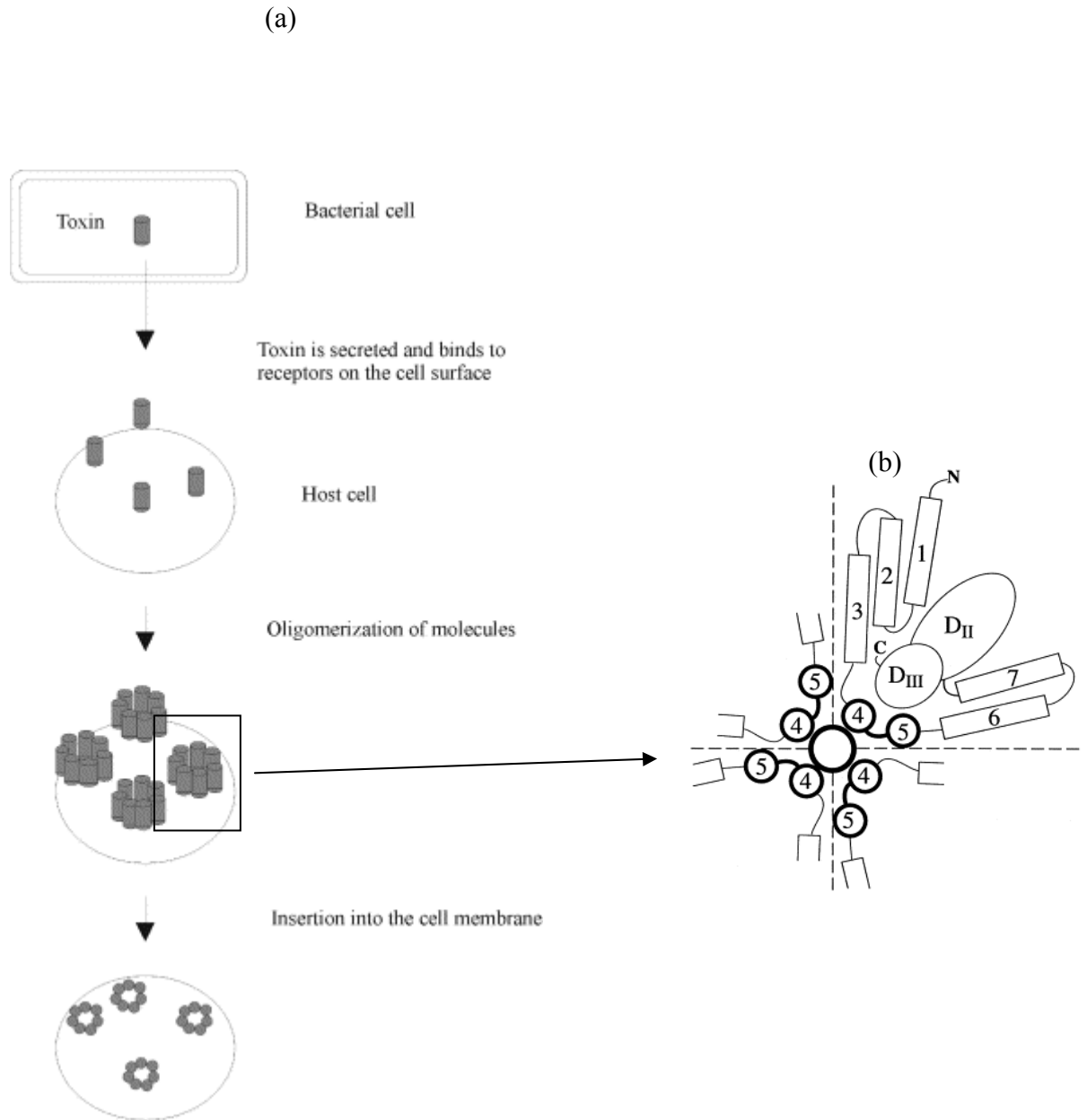


Figure 1-11. (a) Principales étapes de la formation du pore membranaire par les PFT (b) avec une représentation vue de dessus du modèle tétramérique pour la toxine Cry1Aa. Les rectangles et les cercles numérotés correspondent au domaine I et le cercle central au pore transmembranaire. DII et DIII représentent les domaines II et III (Parker and Feil, 2005; Schwartz et al., 1997a).

Le passage par une structure oligomérique est une étape très importante dans le mécanisme d'action de la toxine et surtout dans la formation du pore transmembranaire. La formation de ce type de structure a été démontrée pour de nombreuses toxines Cry telles que Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa et Cry3 (Gomez et al., 2002b; Munoz-Garay et al., 2006; Rausell et al., 2004a; Rausell et al., 2004b). Dans le cas de la toxine Cry1Ab, sa liaison à Bt-R1 induit un clivage supplémentaire en N-terminal, facilitant la formation d'un oligomère d'environ 250 kDa dépourvu de l'hélice $\alpha 1$ du domaine I, important pour l'insertion dans la membrane et la toxicité (Gomez et

al., 2003; Gomez et al., 2002b; Rausell et al., 2004b). Il a été reporté pour Cry1Ab et Cry1Ac que ces structures oligomériques augmentent de 100 à 200 fois leur affinité pour le récepteur APN (Gomez et al., 2003; Pardo-Lopez et al., 2006). Quant au monomère de 60 kDa, il n'est pas capable de s'insérer dans la membrane et de former des pores stables, contrairement à l'oligomère. Cette observation conforte l'hypothèse que la formation de l'oligomère est une étape essentielle dans le mécanisme d'action des toxines Cry (Rausell et al., 2004b).

Un modèle de l'interaction des toxines Cry1A avec les récepteurs APN a été proposé (Bravo et al., 2007; Bravo et al., 2004) : Dans un premier temps, le monomère interagit avec Bt-R1 pour former une structure oligomérique avec une forte affinité pour le récepteur APN. Alors, la toxine fixe ce récepteur, induisant une modification conformationnelle puis son insertion dans la membrane et la formation du pore membranaire.

Deux modèles ont été proposés pour décrire la formation de ce pore membranaire (Knowles, 1994):

- Un modèle « canif » dans lequel les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ s'ouvrent comme un canif et s'insère dans la membrane (Hodgman and Ellar, 1990).
- Un modèle « parapluie » dans lequel les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ s'insère dans la membrane alors que le reste du domaine I reste en surface de la membrane (Li et al., 1991; Schwartz et al., 1997a).

Les domaines I et III participent à la formation du canal ionique (Schwartz et al., 1997b; Wolfersberger et al., 1996). La taille de ces canaux est toxine-dépendante (Carroll and Ellar, 1997; Lorence et al., 1995; Martin and Wolfersberger, 1995), pH dépendante (Martin and Wolfersberger, 1995), pression-dépendante (Carroll and Ellar, 1997). En moyenne, ces pores ont un diamètre de 1 à 2 nm suggérant que le pore serait formé de 4 à 6 monomères (Guereca and Bravo, 1999; Mark E. Whalon, 2003). Cry1Ac et Cry3A forment des canaux cationiques à pH alcalin prenant avantage de la grande quantité d'ions K^+ présent dans l'intestin de l'insecte alors qu'en condition acide ils sont de types anioniques (Crawford and Harvey, 1988; Slatin et al., 1990). Après formation du canal, il y a dans un premier temps rupture du gradient de K^+ dans les cellules épithéliales provoquant une augmentation de la concentration en K^+ et du pH dans l'hémolymphe ainsi qu'une diminution du pH dans l'intestin moyen. Alors, les cellules affectées sont détruites par choc osmotique du fait du haut pH dans l'intestin. Les spores trouvent alors à la fois un pH proche de la neutralité et du matériel cellulaire pour pouvoir germer (de Maagd et al., 2001). Enfin, l'insecte intoxiqué se trouve dans l'incapacité de se nourrir et meurt de faim ou de septicémie (Mark E. Whalon, 2003).

4. Utilisation de Bt et de ses dérivés en tant que biopesticide

4.1. Bt en lutte biologique

L'intérêt pour les pesticides biologiques s'est développé dans le milieu des années 1970 du fait de l'augmentation de la résistance des insectes aux pesticides chimiques (pyréthrinoides) (Watkinson, 1994). Depuis plus de 20 ans, l'une des applications les plus réussies de Bt est le contrôle des Lépidoptères dans les forêts du Canada et des Etats-Unis, par la souche HD-1 capable de produire les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2A, réduisant significativement l'utilisation d'insecticides chimiques (Bauce et al., 2004). En effet, plusieurs millions d'hectares de forêt sont pulvérisés tous les ans par des produits issus de *Btk* (*kurstaki*) pour le traitement contre la spongieuse (*Lymantria dispar*) et la ordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura*

fumiferana). Un avantage significatif des produits dérivés de Bt est leur capacité à contrôler cette résistance chimique des insectes. Par exemple, en Australie, aux États-Unis et en Extrême Orient, ils ont été utilisés pour le traitement contre les *Heliothis* ssp. et papillons nocturnes résistants aux pyréthrinoides. Ainsi, en diminuant la pression des insecticides chimiques, le risque de résistance est diminué et ces produits peuvent alors continuer à être utilisés (Watkinson, 1994). Cependant, des cas de résistance ont été observés chez certains insectes.

Aussi, *Bti* (*israelensis*) est utilisé pour 80 % du contrôle des Diptères tels que la simulie et le moustique, vecteurs de nombreuses maladies dans les pays africains à cause de leur résistance aux organophosphates (Bravo et al., 2007). Cette souche native est très active puisque les différentes toxines de ses inclusions de cristaux fonctionnent de façon synergiques (Angsuthanasombat et al., 1992; Chang et al., 1993; Crickmore et al., 1995; Delecluse et al., 1993; Poncet et al., 1995; Wu et al., 1994). Il existe des actions synergiques du même type entre certaines toxines (Ravoahangimalala et al., 1993; Van Frankenhuyzen et al., 1991), entre certaines toxines et bactéries (Dubois and Dean, 1995) et entre certaines toxines et spores (Delecluse et al., 1993; Dubois and Dean, 1995; Johnson and McGaughey, 1996; Miyasono et al., 1994; Moar et al., 1995; Moar et al., 1989; Tang et al., 1996). En effet, les spores peuvent induire une septicémie, augmentant ainsi les risques de mortalité de l'insecte. C'est pourquoi, les produits commerciaux contenant des spores sont supposés être plus efficaces sur le terrain (Watkinson, 1994).

En 1982, une nouvelle souche de Bt a été développée, *Btt* (*tenebrionis*) par les compagnies Mycogen et Ecogen pour le contrôle du doryphore aux États-Unis et en Europe (*Leptinotarsa decemlineata*). En 1992, *Bta* (*aizawai*) a été développée par les laboratoires Abbott pour le contrôle du papillon nocturne (*Plutella xylostella*), résistant aux pesticides chimiques (Watkinson, 1994). Les formulations de Bt sont diverses : poudres, granules, briquettes ou suspensions organiques, donnant à l'agriculteur plus de flexibilité quant à l'utilisation du produit, notamment s'il envisage de faire des mélanges (Watkinson, 1994). Les plus connus sont le Dipel, le Thuricide et le Delfin mais leur utilisation reste limitée à cause de leur faible persistance sur le terrain (rapidement dégradées par les rayonnements Ultra-Violet et les microorganismes) et de leur coût élevé (Roush, 1994).

Des laboratoires de biotechnologies ont alors développé différentes souches de bactéries transformées pour exprimer les gènes insecticides *cry*. La première bactérie dans laquelle des gènes de protéines Bt ont été clonés est *Escherichia coli*, bactérie facilement manipulable génétiquement. Cependant, cette dernière présente de faibles rendements d'expression à cause de divers facteurs de régulation (Broadwell, 1994). Alors, la société Mycogen aux États-Unis a développé à des fins agricoles, une souche de *Pseudomonas* dans laquelle un gène de *Btk* a été incorporé de façon stable (Watkinson, 1994). Lorsqu'elle meurt, cette souche conserve sa membrane cellulaire intacte ce qui protège les cristaux des rayonnements solaires. Ainsi, les performances sur le terrain sont accrues (Watkinson, 1994). Une autre approche, développée par Crop Genetics International, consiste à transformer par un gène de Bt une bactérie endophyte, *Clavibacter xyli* ssp. *cynodontis*. L'imprégnation des graines de maïs par cette bactérie permet la colonisation du système vasculaire de la plante adulte, la protégeant alors contre la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) (Watkinson, 1994). Aussi, des gènes de Bt ont été incorporés dans des algues pour le contrôle des moustiques et dans des virus d'insectes tirant parti du haut niveau d'infectivité des virus (Watkinson, 1994).

Cependant, les meilleurs hôtes pour ces gènes restent les *Bacillus*. Donc, en clonant ces gènes dans d'autres espèces de *Bacillus* comme *Bacillus sphaericus*, le spectre d'hôtes

peut être augmenté avec des possibles actions synergiques entre les toxines et les spores (Broadwell, 1994). Aussi, de nouvelles approches de formulation sont proposées, notamment l'utilisation de la toxine à l'état adsorbée, plus efficace chez les larves de moustiques se nourrissant par filtration (Lee et al., 2003).

Bt, utilisé comme alternative ou en complément des pesticides synthétiques chimiques en agriculture, est maintenant l'agent de lutte biologique le plus utilisé dans le monde. Plus de 250 biopesticides sont vendus dans le monde (1 % du marché des pesticides) et Bt représentent environ 80 % des biopesticides vendus (Mark E. Whalon, 2003). Même si l'utilisation des agents biologiques reste à la traîne derrière les pesticides chimiques, les bénéfices environnementaux font que les produits à base de Bt sont en plein essor.

La stratégie commerciale d'application de Bt prend en compte 3 paramètres majeurs (Bryant, 1994) :

- Les caractéristiques physico-chimiques de Bt : la toxine ne devient active que dans l'intestin des insectes cibles donc tout processus interférant avec la nutrition des insectes diminue l'efficacité. Aussi, la persistance est fortement altérée par l'action des rayonnements Ultra-Violets (UV) et le lessivage par les pluies (Crecchio and Stotzky, 1998; Koskella and Stotzky, 1997). Pour aider à l'efficacité de Bt, des composés ont été développés permettant une meilleure pénétration de la surface foliaire, un meilleur dépôt limitant les lessivages par la pluie et des « UV-protectants » comme de l'amidon ou d'autres polymères (Brar et al., 2006; Cökmüs et al., 2000; McGuire et al., 1990).
- Le mode d'application : il faut soit appliquer une dose létale de Bt, soit appliquer une exposition chronique plus faible. Par ailleurs, la zone de contact doit être ciblée en fonction de la façon dont se nourrit l'insecte.
- Le comportement des espèces cibles : La dose à appliquer est fonction de la taille de la larve, une grosse larve nécessitant une dose plus forte (McGaughey, 1978).

4.2. Expression des protéines insecticides de Bt dans les plantes : plantes génétiquement modifiées

L'incorporation des gènes Bt dans les plantes pour conférer une résistance aux insectes semble être la solution idéale pour lutter contre ces ravageurs. Plusieurs gènes *cry* ont été introduits dans les plantes, en commençant par le tabac (Barton et al., 1987) et beaucoup d'autres cultures comme la pomme de terre, le riz, le maïs et le coton (Adang et al., 1993; Fujimoto et al., 1993; Koziel et al., 1993; Nayak et al., 1997; Perlak et al., 1990; Perlak et al., 1993; Salm et al., 1994). La première plante génétiquement modifiée a été un tabac produit en 1983 à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, l'agent responsable de la maladie de la galle du collet pour produire les premiers OGM virus-résistant, herbicide-tolérant et insecte-résistant (Llewellyn et al., 1994; Zambryski et al., 1983). Plus récemment des techniques telles que la micro-injection ou le bombardement cellulaire ont été développées, mais l'utilisation d'*Agrobacterium* reste préférable pour l'introduction des gènes codant les protéines Cry (Finer and McMullen, 1990). Les gènes *cry* insérés produisent la protéine directement sous sa forme toxique car ils se sont avérés plus efficaces que les gènes entiers (Barton et al., 1987). Cependant, il reste difficile d'avoir un haut niveau d'expression de Bt dans les plantes transgéniques (Llewellyn et al., 1994).

Comme les cultures de maïs, de coton et de pomme de terre sont d'une grande importance économique, les larves d'insectes ravageurs de ces cultures ont fait l'objet d'une grande attention. C'est pourquoi, les OGM actuellement les plus répandus (MONSANTO) expriment les toxines Cry1A et Cry3A (Shelton et al., 2002). Les

variétés les plus répandues sont le maïs (MON810, Bt11, Event176) avec 85 % du maïs Bt planté dans le monde correspondant à MON810 ; le coton (531, GK) et la pomme de terre (Russet Burbank) (**Tableau 1-2**). Le maïs Bt est la plus importante culture de plantes Bt dans le monde avec 11,3 millions d'hectares (James, 2005). Le maïs MON810 exprimant Cry1Ab, toxine dirigée contre la pyrale du maïs, est la plante Bt la plus cultivée à ce jour (Benedict and Ring, 2004). Les niveaux de Cry1Ab dans Bt11 et MON810 sont de 3 à 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles et de 0,2 à 1,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les graines, avec les valeurs les plus hautes pour Bt11 (Icoz and Stotzky, 2008). En ce qui concerne les cotons Bt exprimant Cry1Ac, ils sont principalement dirigés contre *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella* et *Heliothis virescens* (Benedict and Altman, 2001 ; James, 2002a, b ; Benedict and Ring, 2004). La quantité de Cry1Ac produit par les cotons Bt est de 1,56 à 12,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles et de 0,86 à 12,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les graines, en fonction des transformations (Icoz and Stotzky, 2008).

Tableau 1-2. Cultures de plantes Bt autorisées pour la production en date de juillet 2001, classées par pays et par date (Shelton et al., 2002).

Plante / Compagnie	Événement de transformation	Pays	Année d'approbation
Maïs YieldGard® / Monsanto	MON810	Argentine	1998
	MON810	Bulgarie	2000
	MON810	Canada	1997
	MON810	Union Européenne	1998
	MON810	Afrique du Sud	1999
	MON810	Etats-Unis	1996
Maïs Bt NK Brand avec YieldGard® / Syngenta	Bt11	Canada	1996
	Bt11	Etats-Unis	1996
Maïs Knockout® / Syngenta	Event 176	Argentine	1998
	Event 176	Canada	1996
	Event 176	Union Européenne	2001
	Event 176	Etats-Unis	1995
Coton Bollgard® / Monsanto	531	Argentine	1998
	531	Australie	1996
	531	Chine	1997
	531	Indonésie	2001
	531	Mexique	1996
	531	Afrique du Sud	1997
	531	Etats-Unis	1995
Coton Bt / Chinese Academy of Agricultural Sciences	GK	Chine	1997
	sGK	Chine	1999
Pomme de terre New Leaf / Monsanto	Russet Burbank, Atlantic, Superior	Etats-Unis	1995
	Russet Burbank	Canada	1995
	Russet Burbank, Superior	Roumanie	1999
New Leaf Plus / Monsanto	Russet Burbank 350, 129	Etats-Unis	1998
New Leaf Y / Monsanto	Russet Burbank, Shepody	Etats-Unis	1999
	Russet Burbank, Shepody	Canada	1999

En 1996, les premières graines de pomme de terre, de coton et de maïs transgéniques ont été vendues aux agriculteurs avec pour avantages principaux une production continue de la toxine et une persistance plus longue dans les tissus de la plante (Sims and Holden, 1996a; Sims and Ream, 1997). Ainsi, ces PGM permettent d'atteindre une plus grande diversité d'insectes tels que les insectes suceurs, piqueurs et les nématodes, qui n'étaient pas atteints lors d'un traitement biologique simple. De ce fait, de plus légères applications d'autres insecticides en complément suffisent, réduisant les coûts de production et les effets nocifs pour la santé humaine et l'environnement (Shelton et al., 2002). Par exemple, le coton Bt a permis de diminuer le nombre moyen d'applications d'insecticides foliaires aux Etats-Unis de 80 % et en Chine de 60 à 80 %, de 1995 à 2001 (Romeis et al., 2006). C'est pourquoi, les surfaces d'OGM cultivées ont fortement augmenté. En effet, de 1996 à 2007, elles sont passées de moins d'un million d'hectares à 114.3 millions d'hectares. Parmi ces PGM, 37 % sont transformées par Bt pour conférer une résistance aux insectes, avec 53 % de coton et 46 % de maïs (**Figure 1-12**).

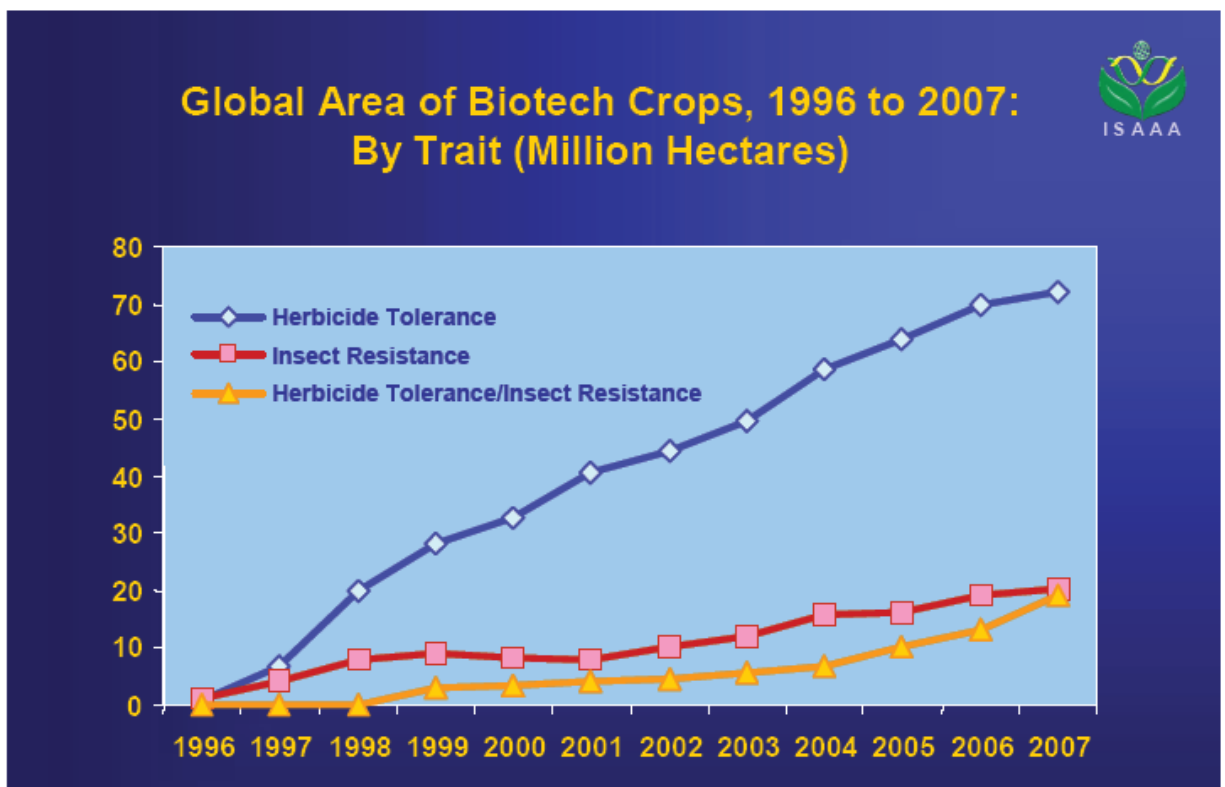


Figure 1-12. Surface occupée en millions d'hectares par les cultures OGM résistantes aux insectes, tolérantes aux herbicides, et aux deux (James, 2007).

Cependant, une exposition continue peut engendrer un rapide développement de résistance. Pour limiter l'apparition de ce phénomène, plusieurs gènes bénéfiques (herbicides, insecticides) ont été introduits dans le génome des plantes.

5. Résistance des insectes à Bt

A partir du moment où les insectes et la bactérie ont coévolué, la résistance aux toxines de *Bacillus thuringiensis* devrait être moins importante que pour les pesticides chimiques de synthèse. Cependant, au début des années 1980, plusieurs espèces d'insectes avec différents niveaux de résistances aux cristaux protéiques de *Bacillus thuringiensis* ont été obtenues par sélection en laboratoire (Ferre et al., 1995; Tabashnik, 1994).

En théorie, les mécanismes de résistance à Bt peuvent être localisés à chaque étape du processus d'action de la toxine : solubilisation, activation protéolytique, passage à travers la membrane péritrophique, liaison au récepteur, insertion dans la membrane, formation du pore et lyse osmotique des cellules intestinales (Ferre and Van Rie, 2002). Les plus observés impliquent une altération de la liaison de la toxine au récepteur (prédominant), une altération de l'activation protéolytique ou une rapide régénération de l'épithélium intestinal (Ferre and Van Rie, 2002).

Le premier cas de résistance a été observé pour le Dipel (Abbott Laboratories), une formulation de spores et de cristaux commerciale de *Btk* HD-1, chez *Plodia interpunctella*, un Lépidoptère des grains (McGaughey, 1985). Lorsque l'insecte est nourri par de la nourriture contenant du Dipel à une dose capable de produire 70 à 90 % de mortalité larvaire, l'insecte développe une résistance à la toxine. En seulement 2 générations, la résistance augmente d'un facteur 30 et au bout de 15 générations d'un facteur 100. Cette résistance reste stable en absence de pression sélective. Cependant, l'insecte reste sensible aux autres souches de Bt ce qui suggère qu'il acquiert seulement la résistance des Cry contenus dans le Dipel.

5.1. Résistance liée à l'activation de la toxine

Les phénomènes de résistance liés à un défaut d'activation des toxines ont été décrits chez *P. interpunctella* et *H. virescens*.

La colonie *P. interpunctella* 198r, résistante à diverses toxines purifiées incluant Cry1Ac, a montré des extraits gastriques avec une activité protéolytique inférieure à une souche sauvage. Cette souche possède alors une capacité moindre à activer la protoxine Cry1Ac, lui permettant donc de résister à des doses plus élevées de toxines (Oppert et al., 1996). Des analyses complémentaires ont révélé que l'une des deux enzymes impliquées dans l'activation était absente chez le mutant. Le même type de résultats a été observé pour la toxine Cry1Ab (Herrero et al., 2001) et *Plutella xylostella* (Jin et al., 2000).

Par ailleurs, dans la larve de la colonie *H. virescens* CP73-3, une plus faible activation de la protoxine Cry1Ab et une dégradation plus rapide de la toxine dans les fluides intestinaux par rapport à la souche sauvage, ont été observées (Forcada et al., 1996).

5.2. Résistance liée aux récepteurs des cellules cibles

Le mécanisme de résistance aux toxines Cry le plus fréquent consiste en une modification dans le site de liaison du récepteur intestinal, empêchant sa reconnaissance par la toxine et donc la formation du pore membranaire (Ferre and Van Rie, 2002). Une étude sur des BBMV (Brush Border Membrane Vesicles) fabriquées à partir de cellules intestinales d'une larve de *P. interpunctella* 343-R résistante à Cry1Ab a montré une affinité de liaison 50 fois inférieure à celle de l'insecte sauvage (Van Rie et al., 1990). Le nombre de récepteurs restant inchangé, ce sont des altérations du site de fixation qui sont responsables de la résistance. Aussi, le même type de résistance a été observé chez la colonie Dpl^r *P. interpunctella*, pour laquelle l'affinité de la toxine pour le récepteur est réduite d'un facteur 60 (Herrero et al., 2001).

Dans le cas d'une souche sélectionnée en laboratoire de *H. virescens* résistant à Cry1Ac (lignée YHD2), une simple altération de la glycosylation du récepteur CADR est responsable de 40 à 80 % des niveaux de résistance (Gahan et al., 2001; Gould et al., 1995; Jurat-Fuentes et al., 2002). D'autres études ont montré l'importance des hydrates de carbone dans les mécanismes de résistance (Burton et al., 1999; Ferre and Van Rie, 2002; Jenkins et al., 1999). Un modèle a alors été proposé dans lequel il existe différents sites de fixation pour différentes toxines. Le modèle suggère que Cry1Aa se lie au récepteur A, Cry1Ab au récepteur A et B et Cry1Ac aux récepteurs A, B et C (Lee et al., 1995; Van Rie et al., 1989). Ainsi, une altération du site A induit une résistance croisée aux 3 toxines (Lee et al., 1995). Aussi, d'autres phénomènes de ce type ont été observés à la fois en laboratoire et sur le terrain pour *Pectinophora gossypiella* (ver rose) et *Helicoverpa armigera* (Morin et al., 2003; Xu et al., 2005). La résistance de la colonie *P. xylostella* NO-QA à la toxine Cry1Ac est due à une réduction de liaison de la toxine sur le récepteur cible (Tabashnik et al., 1994). Des résistances croisées ont été mises en évidence pour Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Fa et Cry1Ja (Tabashnik et al., 1997) (**Figure 1-13**). Cry1Aa se fixe sur le site 1 ; Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa et Cry1Ja se partagent le site 2, et deux autres sites pour Cry1B et Cry1C. Cependant, comme la toxine Cry1Aa se fixe à la fois sur les insectes résistants et susceptibles, ce site ne semble pas directement lié à la toxicité et seuls les sites 2, 3 et 4 seraient fonctionnellement actifs (Tabashnik et al., 1997). D'autres souches de *P. xylostella* montrent des phénomènes de résistances croisées assez similaires tels que les colonies PEN, Loxa, BL, PHI, SERD3 (Ferre et al., 1991; Tabashnik et al., 1997; Tang et al., 1996; Wright et al., 1997). A partir des différentes données sur ces colonies, il a été établi 2 types d'altération de sites sur le modèle proposé : Type I dans lequel un changement dans le site 2 altère la fixation de Cry1Ab mais pas Cry1Aa et Cry1Ac (colonie PHI) ; et un type II dans lequel une modification du site 2 affecte la fixation de Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac mais l'effet sur Cry1Aa est masqué par le fait qu'il se fixe sur le site 1 (NO-QA et PEN) (**Figure 1-13**).

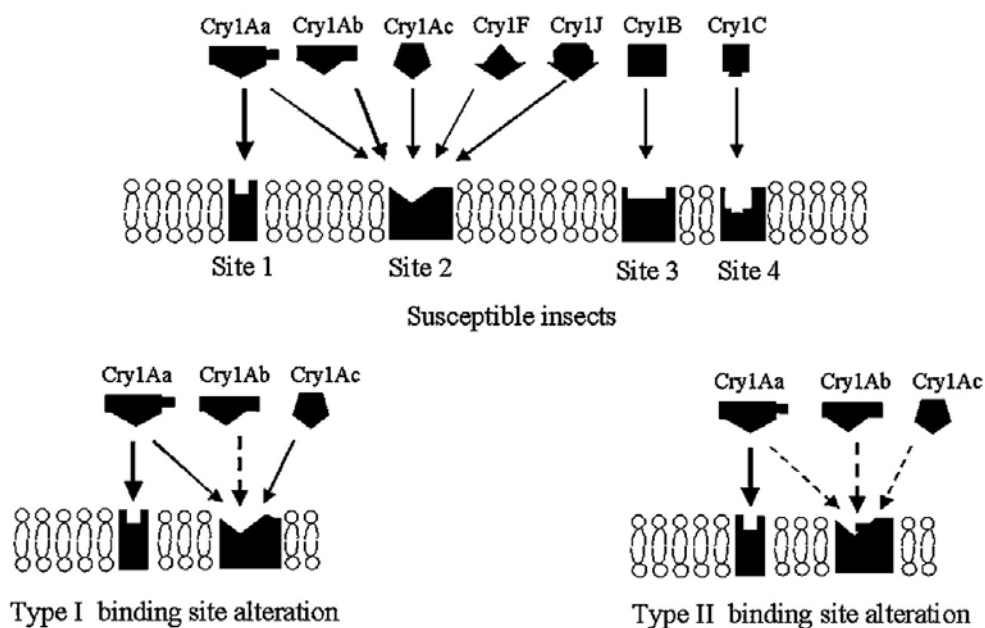


Figure 1-13. Modèle proposé pour la liaison des protéines Cry aux BBMV des cellules intestinales des larves de *P. xylostella* (Ferre and Van Rie, 2002).

5.3. Autres mécanismes

Des ingestions de doses sublétales de toxine pour les souches *H. virescens* CP73-3 et KCB, ont montré des dégâts histologiques identiques chez la souche résistante et la souche sauvage (Forcada et al., 1999; Martinez-Ramirez et al., 1999). Il semblerait donc que la résistance soit due à une réparation ou un remplacement des cellules intestinales lésées.

D'autres mécanismes ont été proposés, incluant l'augmentation de l'activité des protéases (Loseva et al., 2002) et la réduction de la solubilisation (McGaughey and Whalon, 1992).

Le **Tableau 1-3** résume les différentes espèces d'insectes ayant développé une résistance aux toxines Bt sur le terrain et en laboratoire.

Tableau 1-3. Bilan des espèces d'insectes ayant développé une résistance aux toxines issues de Bt (Ferre and Van Rie, 2002).

Agent de sélection						
Espèces	Origine	Type	Formulation	Environnement sélectif	Souche résistante	Résistance
<i>P. interpunctella</i>	Oklahoma	Dipel	SC	Laboratoire	343-R	Dipel Cry1Ab
<i>P. interpunctella</i>	Kansas	<i>Bte</i> HD-198	SC	Laboratoire	198 ^r	HD-198 Cry1Ac (PT) Cry1Ab Cry1Ac
<i>P. interpunctella</i>	Kansas	Dipel	SC	Laboratoire	Dpl ^f	Dipel Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Philippines	<i>Btk</i>	SC	Terrain	BL	Dipel Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Philippines	<i>Btk</i>	SC	Terrain		Dipel Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Above colony	Cry1Ab/ Cry1Ac-1Ab	T/CC	Laboratoire	PHI	Cry1Aa, Cry1Ac Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Hawaï	<i>Btk</i> /Dipel	SC	Terrain / Laboratoire	NO-QA	Dipel Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac
<i>P. xylostella</i>	Hawaï	<i>Btk</i> / <i>Bta</i> /Cry1Ca	SC/CC/T	Terrain / Laboratoire	NO-95C	Cry1Ca Cry1Ca (PT)
<i>P. xylostella</i>	Floride	<i>Btk</i>	FSC	Terrain	Loxa A	Javelin Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Caroline du Sud	<i>Btk</i> / <i>Bta</i> /Cry1Ca	SC/PT/Cry1C-broccoli	Terrain / Laboratoire	Cry1C-Sel	Cry1Ca Cry1Aa
<i>P. xylostella</i>	Pennsylvanie	<i>Btk</i> /Cry1Ac, Cry1Ca	SC	Terrain / Laboratoire	PEN	Cry1Ab, Cry1Ac Dipel Florbac Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Malaisie	<i>Btk</i> / <i>Bta</i>	SC	Terrain	SERD3	Cry1Aa, Cry1Ac Cry1Ac Cry1Ab
<i>P. xylostella</i>	Malaisie	<i>Btk</i> /Cry1Ac	SC/T	Terrain / Laboratoire	1AcSEL-MEL	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac
<i>H. virescens</i>	Caroline du Nord	Cry1Ac/Cry1Ac	T/CC	Laboratoire	YHD2	Cry1Ab Cry1Ac Cry1Fa (CC)
<i>H. virescens</i>	Caroline du Nord	Cry1Ab/Dipel	CC/SC	Laboratoire	SEL	Cry1Ab (CC) Cry1Ac
<i>H. virescens</i>	Caroline du Nord	Cry1Ac	T	Laboratoire	CP73-3	Cry1Ab Cry1Ac
<i>S. exigua</i>	Alabama	Cry1Ca	IB/T	Laboratoire		Cry1Ca

Bta = *Bt* var. *aizawai**Btk* = *Bt* var. *kurstaki**Bte* = *Bt* var. *entomocidus*.Dipel, Javelin et Florbac sont des noms commerciaux pour des formulations de *Btk*

SC : formulation à base de spores et de cristaux

CC : cellules de *P. fluorescens* microencapsulées exprimant un gène *cry*

IB : corps d'inclusions provenant d' *Escherichia coli* recombinant, transformé pour exprimer un gène *cry*

PT : protoxine

T : toxine activée

Diverses stratégies ont été proposées pour diminuer l'apparition d'insectes résistants. La combinaison de toxines à mode d'action différents, la rotation des cultures, des très hauts dosages et des refuges spatiaux ou temporels, limiteraient l'émergence d'insecte homozygotes résistants (McGaughey and Whalon, 1992; Roush, 1994; Tabashnik, 1994). La stratégie de refuge est à l'heure actuelle la stratégie de management utilisée. Pour ce faire, il faut que la fréquence des allèles résistants et la survie des hétérozygotes soit faible. Ce refuge permet de conserver les allèles susceptibles à l'intérieur de la population. Cependant, reste le débat de savoir quelle est la taille nécessaire de ces refuges et si cela est économiquement envisageable par les utilisateurs ou les vendeurs de semences Bt (Shelton et al., 2000). Des modèles théoriques ont suggéré que l'utilisation de deux toxines différentes dans une même plante retarderait davantage l'apparition de phénomènes de résistance que si on utilisait une seule toxine, et nécessiterait de plus petit refuges (Roush, 1998). Ce modèle a été confirmé pour le coton et le tabac transgéniques (Greenplate et al., 2000; Zhao et al., 2000; Zhao et al., 1999).

6. Impact des toxines Bt sur l'environnement

Un des plus sérieux effets négatifs quant à l'utilisation des herbicides chimiques à spectre large est leur toxicité envers les mammifères. L'adoption des cultures Bt permettrait de réduire ce risque d'empoisonnement (Hossain et al., 2004).

En effet, le mécanisme d'action de Bt nécessite diverses étapes spécifiques et essentielles à la toxicité des protéines telles que la solubilisation, l'activation et la reconnaissance des récepteurs des cellules intestinales de l'insecte cible. De ce fait, le risque d'atteinte des insectes non cibles semble être mineur. Par exemple, une concentration de Cry1Ac 100 fois supérieure à ce qu'on peut retrouver dans les cotons transgéniques a été appliquée sur 14 espèces d'insectes (Coléoptères, Diptères, Homoptères, Hyménoptères, Lépidoptères, Neuroptères, Orthoptères); et seuls les Lépidoptères ont montré plus de 50 % de mortalité. Les autres espèces n'ont pas montré de mortalité significative, indiquant que Cry1Ac exprimé dans les plants de coton transgéniques a une activité biologique spécifique des Lépidoptères et que le risque d'effets indésirables sur d'autres espèces est négligeable (Sims, 1995).

Cependant, les différentes études menées afin d'évaluer l'innocuité de Bt envers les autres organismes ont montré des résultats contrastés.

6.1. Effets sur les organismes non cibles

6.1.1. Vers de terre

Les vers de terre sont des organismes importants impliqués dans différents processus dans le sol tels que la décomposition de la matière organique et le brassage du sol. Les différentes études portant sur les effets des protéines Cry sur ces organismes ont récemment été résumées (Icoz and Stotzky, 2008) et ne montrent généralement que peu ou pas d'effet significatif. La toxine Cry1Ab issue de maïs Bt n'a pas d'effet sur les vers

de terre *Lumbricus terrestris*, les nématodes, les protozoaires et les bactéries après 40 jours d'incubation dans des sols plantés ou amendés par du matériel de maïs Bt (Saxena and Stotzky, 2001a). Ces résultats sont en accord avec de récentes études (Clark and Coats, 2006; Vercesi et al., 2006; Zwahlen et al., 2003b).

6.1.2. Micro- et macroarthropodes

Les microarthropodes sont des espèces clés indicatrices de la santé et de la fertilité d'un sol. Elles sont souvent présentes dans la rhizosphère et sont donc très exposées aux protéines Cry exsudées par les plantes Bt. Cependant, les protéines Cry n'ont pas d'effets négatifs sur la reproduction et la survie des collemboles du type *Folsomia candida* (Al-Deeb et al., 2003; Clark and Coats, 2006; Sims and Martin, 1997; Yu et al., 1997), et sur les mites du sol *Oppia nitens* (Al-Deeb et al., 2003; Yu et al., 1997).

En ce qui concerne les macroarthropodes, le modèle d'étude est *Porcellio scaber*, important dans la décomposition des plantes mortes. Ce décomposeur ne semble pas affecté par les protéines Bt (Escher et al., 2000).

6.1.3. Nématodes

Les nématodes, organismes importants pour l'activité métabolique des sols comme la minéralisation des éléments, sont de précieux indicateurs de la qualité d'un sol. Des études d'impact n'ont mis en évidence aucun effet significatif sur la biodiversité et le nombre de nématodes dans la rhizosphère (Manachini and Lozzia, 2002; Saxena and Stotzky, 2001a). Cependant, les proportions de nématodes bactériophages, mycophages et phytophages varient sur les sols plantés avec Bt ou non (Icoz and Stotzky, 2008).

Par ailleurs, les quelques études portant sur seulement une seule espèce de nématodes montrent généralement des effets négatifs des protéines Cry sur leur croissance et leur reproduction (Icoz and Stotzky, 2008).

6.1.4. Microorganismes et activités microbiennes

Les microorganismes sont les organismes dominants du sol en termes de biomasse et d'activité, et sont impliqués dans divers processus tels que la décomposition de la matière organique et la minéralisation des éléments. Ils comptent pour plus de 80 % de la biomasse totale du sol (Kowalchuk et al., 2003) et sont majoritairement contenus dans la rhizosphère (10 fois plus que dans le sol non rhizosphérique) (Icoz and Stotzky, 2008). De ce fait, une modification des composés exsudés par les plantes pourrait induire un changement de structure et d'activité de ces microorganismes. Cependant, la plupart des études ne montrent que peu ou pas d'effets significatifs des plantes Bt sur la structure des communautés microbiennes et leur croissance (Blackwood and Buyer, 2004; Brusetti et al., 2004; Devare et al., 2007; Devare et al., 2004; Donegan et al., 1995; Ferreira et al., 2003; Flores et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Koskella and Stotzky, 2002; Naef et al., 2006; Saxena and Stotzky, 2001a; Shen et al., 2006; Wu et al., 2004a). Il semblerait plutôt que l'âge, la variété de la plante ainsi que les variations saisonnières et environnementales soient les facteurs majeurs affectant la diversité bactérienne (Baumgarte and Tebbe, 2005; Blackwood and Buyer, 2004; Donegan et al., 1995; Fang et al., 2005; Griffiths et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Naef et al., 2006).

Cependant, ces résultats contrastent avec ceux d'autres auteurs qui ont montré que les exsudats de Bt change la structure des communautés bactériennes (Brusetti et al., 2004; Castaldini et al., 2005; Rui et al., 2005; Xue et al., 2005) et réduisent significativement la croissance d'un champignon symbiotique *Glomus mosseae* (Turrini et al., 2004).

En ce qui concerne les activités microbiennes, certaines activités comme l'activité phosphatase, déshydrogénase et la méthanogénèse mais aussi les uréases, acides

phosphomonoesterases, invertases, cellulases et arylsulfatases, semblent être affectées par la présence des toxines Bt (Sun et al., 2007; Wu et al., 2004b; Wu et al., 2004c). Cependant, aucun effet significatif de Bt sur de nombreuses autres enzymes, la biomasse microbienne ainsi que sur divers processus tels que la minéralisation potentielle de l'azote, la nitrification et la respiration n'a été observé (Cortet et al., 2006; Devare et al., 2004; Flores et al., 2005; Shen et al., 2006).

A partir de ces résultats, l'Environmental Protection Agency (EPA) conclut que les toxines Bt n'ont aucun effet sur la biomasse totale, les bactéries, les nématodes, les champignons, les mammifères, les organismes non cibles et l'environnement. Aussi, aucun effet spécifique des variétés transgéniques commercialisées n'a pu être mis en évidence à ce jour (Cry1Ab, Cry1Ac) (Shelton et al., 2002).

6.2. Devenir dans le sol : interactions avec les particules de sol et persistance

Les plantes Bt relâchent des toxines dans le sol par exsudation racinaire (Saxena et al., 1999; Saxena et al., 2004; Saxena and Stotzky, 2000), par leur pollen (Losey et al., 1999; Obrycki et al., 2001) et par les résidus de plantes (Stotzky, 2004; Zwahlen et al., 2003a), conduisant à l'accumulation potentielle de la toxine dans les sols. Par ailleurs, ces toxines ont été retrouvées dans le tractus intestinal et les excréments de vaches (Einspanier et al., 2004), du décomposeur *Porcellio scaber* (Pont and Nentwig, 2005) et dans les vers de terre (Saxena and Stotzky, 2001a).

6.2.1. Interactions avec les composants du sol

Les protéines sont des macromolécules avec une grande affinité pour les surfaces fortement dépendante de leur charge nette. De ce fait, le point isoélectrique de la protéine et le pH sont des facteurs clés qui régulent cette adsorption. Le point isoélectrique des toxines Bt varie entre 4,4 et 5,5 (Bietlot et al., 1989; Venkateswerlu and Stotzky, 1992). Au voisinage du point isoélectrique, la charge nette neutre de la protéine engendre un minimum de forces répulsives donc un contact maximum avec les surfaces chargées des argiles. L'adsorption est alors maximale au niveau de ces valeurs de pH. Pour des pH supérieurs à cette valeur, les forces répulsives entre l'argile chargée négativement et la protéine aussi chargée négativement, réduisent l'adsorption. Aussi, lorsque le pH est inférieur au point isoélectrique, la protéine subit des modifications intramoléculaires (étalement sur la surface) réduisant fortement la quantité adsorbée (Quiquampoix, 2008; Quiquampoix and Ratcliffe, 1992; Quiquampoix et al., 1993).

Acides humiques

Les toxines de Bt s'adsorbent rapidement (quelques heures) sur les acides humiques et les complexes formés restent toxiques avec une concentration létale CL₅₀ comparable à celle de la toxine libre. Ces résultats indiquent que la fixation sur les acides humiques n'altère pas les propriétés insecticides de la toxine (la taille et la structure de la toxine sont conservées). Aussi, le complexe semble protégé contre la biodégradation et donc pourrait persister et s'accumuler dans les sols (Crecchio and Stotzky, 1998). Après lavages à l'eau, 45 à 80 % de la toxine reste adsorbée aux acides humiques, la quantité de complexe dissocié étant fonction de la composition en groupes fonctionnels des acides humiques (Crecchio and Stotzky, 1998).

Complexe organo-minéraux

L'interaction des toxines Bt avec des complexes organo-minéraux de montmorillonite, est de faible affinité (type L) (Giles et al., 1974) avec 70 % de l'adsorption totale dans la première heure (Crecchio and Stotzky, 2001). L'adsorption est maximale à pH 5-6 et diminue quand le pH augmente. Les valeurs en dessous de pH 5 n'ont pas été étudiées pour des problèmes de solubilité et de précipitation aux pH trop acides (Crecchio and Stotzky, 2001). Aucune désorption n'a été observée après lavages à l'eau et au NaCl 1M suggérant une forte affinité de la toxine pour ces complexes. Aussi, la toxine adsorbée conserve son activité insecticide et résiste à la dégradation par les microorganismes et la pronase E. (Crecchio and Stotzky, 2001).

Argiles pures et extraites de sol

L'adsorption des toxines insecticides de Bt sur des argiles de référence telles que la montmorillonite et la kaolinite homoioniques pour divers cations (Tapp et al., 1994; Venkateswerlu and Stotzky, 1992), sur des fractions argileuses de sols, et des sols (Chevallier et al., 2003; Muchaonyerwa et al., 2002; Sundaram, 1996; Tapp and Stotzky, 1995a), est rapide (moins d'une heure), indépendante de la température et généralement de faible affinité (type L). Elle est significativement inférieure sur la kaolinite en relation avec sa surface spécifique et sa capacité d'échange cationique et est fonction de la valence du cation pour lequel l'argile est homoionique (Tapp et al., 1994; Tapp and Stotzky, 1995b). Cette adsorption augmente avec le pH en lien avec les forces répulsives entre la toxine et la surface, et la polycondensation de la toxine par la formation de ponts disulfures (Venkateswerlu and Stotzky, 1992; Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2007).

L'adsorption protège les toxines contre la dégradation microbienne (Chevallier et al., 2003; Crecchio and Stotzky, 1998; Crecchio and Stotzky, 2001; Koskella and Stotzky, 1997) tout en conservant l'activité insecticide (Crecchio and Stotzky, 1998; Crecchio and Stotzky, 2001; Koskella and Stotzky, 1997; Lee et al., 2003; Stotzky, 2000; Tapp and Stotzky, 1995b; Venkateswerlu and Stotzky, 1992; Zhou et al., 2007).

Seulement 10 à 30 % de la protéine adsorbée sur les argiles est désorbée par des lavages à l'eau, indiquant que la toxine est fortement liée aux argiles (Lee et al., 2003; Muchaonyerwa et al., 2006; Tapp et al., 1994; Tapp and Stotzky, 1995b; Venkateswerlu and Stotzky, 1992; Zhou et al., 2005). Aussi, plusieurs lavages successifs au tampon MOPS pH 7,8 montrent que 92 ± 4 % de la toxine est adsorbée irréversiblement (Chevallier et al., 2003). La désorption est inférieure à celle observée par Tapp et al. (1994) (30 %) sur des argiles pures. Cette différence est alors probablement liée à la présence de matières organiques, favorisant l'adsorption de la protéine.

Cependant, l'ajout de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) et de β -mercaptoéthanol permet de désorber la toxine de la montmorillonite (Venkateswerlu and Stotzky, 1992).

Dans le cas des argiles complexées par des métaux, l'élimination des oxydes de métaux augmente l'adsorption de la protéine car ils utilisent les groupes fonctionnels nécessaires à l'adsorption de la toxine (Crecchio and Stotzky, 2001; Muchaonyerwa et al., 2006). Cependant, cette adsorption diminue après suppression de la matière organique et dépend de la composition et de la quantité de cette dernière (Muchaonyerwa et al., 2006).

6.2.2. Persistence

Si toute la masse de la plante est incorporée dans le sol, la concentration de Bt dans le sol serait de $1,58 \mu\text{g Cry1Ac kg}^{-1}$ de sol pour un coton transgénique, $284 \mu\text{g Cry1Ab kg}^{-1}$

¹ pour un maïs Bt11 et 208 µg Cry1Ab kg⁻¹ de sol pour un maïs MON810 (Clark et al., 2005).

Le maïs Bt se décompose moins dans les sols que des maïs non modifiés du fait de sa plus haute teneur en lignine procurant une meilleure résistance contre la pyrale du maïs et retardant la dégradation et la décomposition par les microbes (Saxena and Stotzky, 2001b). Ce phénomène peut alors augmenter le temps d'exposition de la toxine constituant un risque pour les organismes non cible et la sélection d'insectes résistants.

Des études précédentes ont montré que la dissipation de Bt dans le sol est généralement biphasique (Herman et al., 2002; Palm et al., 1994; Tapp and Stotzky, 1998; West et al., 1984) caractérisée par une courte phase de latence, suivie d'une phase de dégradation rapide avec 10 % de la toxine finale lentement dégradée. Cette chute rapide durant les 7 premiers jours a été attribuée à la métabolisation de la toxine par les microorganismes, et la phase de stabilisation par l'immobilisation et la protection de la toxine par les argiles et la matière organique (Palm et al., 1996).

La toxine libre est rapidement utilisée comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes du sol, contrairement à la toxine adsorbée. La persistance de la protéine est attribuée à son adsorption rapide sur les composants du sol. La toxine adsorbée est alors protégée contre la dégradation microbienne par l'inaccessibilité de ses résidus nécessaires au clivage de la protéine par les peptidases (Chevallier et al., 2003; Crecchio and Stotzky, 2001; Koskella and Stotzky, 1997; Tapp and Stotzky, 1995a, b). Cependant, les toxines libre et liée sont toutes deux toxiques pour les larves de *M. sexta* (Crecchio and Stotzky, 2001) suggérant que l'adsorption ne modifie pas la structure de la protéine.

Les toxines Cry1A peuvent persister dans le sol pendant plus de 200 jours (Crecchio and Stotzky, 2001; Saxena et al., 2002a; Saxena and Stotzky, 2001a; Sims and Holden, 1996a; Tapp and Stotzky, 1998) avec des temps de demi-vie variant de 1.6 à 22 jours en moyenne mais pouvant aller jusqu'à 46 jours (Shelton et al., 2002). Saxena et Stotzky ont montré que les toxines issues de plantes transgéniques persistent dans les sols et conservent leur activité insecticide pendant 3 ans (Saxena and Stotzky, 2001c, 2002) (**Tableau 1-4**).

Tableau 1-4. Persistance de la protéine Bt dans l'environnement (Clark et al., 2005).

Persistance	Protéine	Source	Dosage	Référence
DT50 <1 jour	Cry1F	Microbienne	Biotest	(Herman et al., 2002)
DT50 <30 jours	Cry1Ab et Cry1Ac	Microbienne et tissus de coton	ELISA	(Palm et al., 1994)
DT50 = 2.2 ; 22 ; 40 et 46 jours	Cry1Ab et Cry1Ac	Microbienne et tissus de coton	ELISA	(Palm et al., 1996)
DT50 = 1.6 jours	Cry1Ab	Tissus de maïs	Biotest	(Sims and Holden, 1996b)
DT50 = 15.5 jours en laboratoire et 31.7 jours sur le terrain ; activité insecticide persiste après 120 jours	Cry2A	Tissus de coton	Biotest	(Sims and Ream, 1997)
Activité insecticide persiste pendant plus de 6 mois	<i>Btk</i> (Cry1)	Dipel	Biotest	(Tapp and Stotzky, 1998)
Activité insecticide persiste après 28 jours (Cry1Ab) et 56 jours (Cry1Ac)	Cry1Ab et Cry1Ac	Tissu de coton	Biotest et ELISA	(Donegan et al., 1995)
Détection pendant plusieurs mois	Cry1Ab	Tissus de maïs	ELISA	(Zwahlen et al., 2003a)

Les temps de demi-vie des protéines Cry sont fortement dépendants de l'activité microbienne, qui est elle-même dépendante du pH. La rapide dégradation dans les sols au pH élevé est le résultat de l'activation des activités microbiennes et la baisse de

l'adsorption des toxines sur les argiles quand on s'éloigne de leur point isoélectrique (IEP) (Crecchio and Stotzky, 2001; Lee et al., 2003; Tapp et al., 1994; Tapp and Stotzky, 1998; Venkateswerlu and Stotzky, 1992).

La toxine Cry1Ab issue de riz Bt se dégrade avec un temps de demi-vie de 11,5 jours en sol alcalin et 34,3 jours en sol acide (Wang et al., 2006). Les auteurs expliquent cette différence par une variation de l'activité microbienne à ces pH extrêmes. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car les sols acides et alcalins utilisés lors de cette étude ne différaient pas seulement par leur pH mais aussi par leur texture et leur capacité d'échange cationique.

Ces résultats de persistance dans les sols contrastent avec d'autres études, dans lesquelles les toxines issues du maïs Bt sont très biodisponibles et donc ne s'accumulent pas dans les sols du fait de leur dégradation par les microorganismes (Dubelman et al., 2005; Hopkins and Gregorich, 2003).

Les différents temps de dégradation des protéines Cry observés dans le sol peuvent être le résultat de différence au niveau des plantes cultivées, de la quantité d'éléments nutritifs, de la température, du pH et du type et de la quantité d'argile et matière organique présents dans le sol (Icoz and Stotzky, 2008). Aussi, la persistance de ces toxines insecticides est dépendante de la concentration initiale, du taux de consommation par les larves d'insectes et du taux d'inactivation et de dégradation rapides par les microbes et les UV (Crecchio and Stotzky, 1998; Koskella and Stotzky, 1997; Stotzky, 2000).

Comme nous avons pu le remarquer dans ce paragraphe, il est admis que la persistance de la toxine Bt est contrôlée par l'activité microbienne des sols. Cependant, seules deux études se sont réellement intéressées aux processus de dégradation et de minéralisation de la toxine, avec des résultats plus ou moins explicites (Accinelli et al., 2008; Palm et al., 1996). Devant ce manque évident d'informations et l'importance de ce phénomène dans l'impact environnemental de l'utilisation des PGM, il est important de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

6.3. Conservation et détection des toxines Bt

6.3.1. Polydispersité de la toxine

Les faibles concentrations de toxines Cry retrouvées dans les sols suggèrent que la forme monomère est prédominante. Ce n'est qu'après contact avec les récepteurs membranaires des cellules intestinales des insectes cibles qu'elles s'oligomériseraient. Cependant, certaines techniques d'analyse et de dosage nécessitent des concentrations élevées de protéine, favorisant la polymérisation. Il est donc essentiel, pour étudier la toxine sous la forme susceptible de se retrouver dans les sols, de prêter grandement attention à son oligomérisation.

Une concentration en sel élevée permet de conserver cet état monomère pendant au moins 24 heures (Masson et al., 2002). Par contre, une concentration en sel insuffisante engendre une oligomérisation rapide sous forme dimère et trimère (**Tableau 1-5**).

Tableau 1-5. Solubilisation de la toxine Cry1Ac dans du tampon carbonate 40 mM (pH 10.5) (Masson et al., 2002).

NaCl (mM)	% polydispersité	
	0 h	24 h
0	96.3 (0.5) M, 3.7P	95.6 (1.3) DT, 4.4P
50	96.2 (2.9) M, 3.8P	95.3 (1.2) DT, 4.7P
150	94.1 (2.2) M, 5.9P	92.9 (2.8) MD, 7.1P
400	93.1 (3.4) M, 6.9P	93.5 (2.9) M, 6.5P

Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard
M, monomère; D, dimère; T, trimère; P, polydisperse

Le CAPS semble aussi être un tampon optimal pour la conservation de cette protéine puisqu'en l'absence de sel, l'état de dispersité de la toxine ne varie pas. Du fait de sa structure biochimique, le CAPS permet de figer la structure de la toxine, empêchant ainsi son oligomérisation (**Tableau 1-6**).

Tableau 1-6. Solubilisation de la toxine Cry1Ac dans du tampon CAPS 50 mM (pH 11) (Masson et al., 2002).

NaCl (mM)	% polydispersité	
	0 h	24 h
0	75.5 (5.4) M, 24.5 P	76.9 (7.4) M, 23.1 P

Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard
M, monomère; D, dimère; T, trimère; P, polydisperse

Par ailleurs, cette polymérisation rapide observée en l'absence de sels, s'avère irréversible puisque l'ajout d'une forte concentration de sel après apparition des oligomères ne permet pas de revenir à l'état initial monomérique (**Tableau 1-7**).

Tableau 1-7. Effet de la concentration en sel sur les oligomères de la toxine Cry1Ac (Masson et al., 2002)

Temps (h)	NaCl (mM)	Niveau d'agrégation
0	0	90.8 (4.6) M, 9.2 P
24	0	95.9 (2.3) D, 4.1 P
48	400	96.0 (2.4) D, 4.0 P
72	400	99.6 (0.2) D, 1.4 P

Les nombres entre parenthèses représentent l'erreur standard
M, monomère; D, dimère; T, trimère; P, polydisperse

Le NaCl est rajouté après l'apparition de la forme polymère dans du tampon carbonate (pH 10.5)

A l'issue de ce paragraphe, il est important de mentionner que lors des études d'interactions de la toxine Bt avec les composants du sol (paragraphe 6.2), l'état de polydispersité des toxines n'a pas été évalué. Les préparations de toxines utilisées sont

des suspensions de protéines centrifugées juste avant usage. De ce fait, la toxine est probablement sous forme oligomérique, du fait de sa forte concentration. Or, les PGM relâchent de très faibles concentrations de toxine, qui se trouveraient alors sous forme monomérique, avec des propriétés d'adsorption probablement différentes.

6.3.2. Méthodes de détection de la protéine Bt dans les sols

Les deux principales méthodes utilisées pour détecter la protéine Bt dans les sols sont les bioessais et les dosages après extraction chimique.

Les bioessais ne requièrent pas d'extraction préalable de la toxine puisque les insectes peuvent l'ingérer à l'état adsorbé et cette technique permet de quantifier les protéines actives (Sims et al., 1996; Sims and Holden, 1996b). Cependant, cette méthode est difficilement normalisable car certains auteurs se basent sur la mortalité (Tapp and Stotzky, 1998), d'autres sur la croissance (Herman et al., 2002; Sims and Holden, 1996a; Sims and Ream, 1997) et d'autres sur les deux (Herman et al., 2002). De plus, la variabilité biologique intrinsèque aux larves d'insectes est telle qu'il est très difficile d'obtenir des résultats reproductibles intra-et interlaboratoires. Par ailleurs, cette méthode peut difficilement être appliquée directement sur le terrain car les sols comportent d'autres toxines qui pourraient fausser les résultats, avec des tests qui restent chers, longs et dépendent de la matrice sol.

Les méthodes alternatives pour détecter la toxine Bt dans les sols nécessitent une extraction chimique préalable. La méthode d'extraction « classique » décrite par Palm et al. (1994) combine un haut pH, une forte concentration en sels et un surfactant : ces conditions semblent mimer les conditions de solubilisation dans les intestins des insectes cibles. Différentes méthodes de dosage telles que la cytométrie en flux, l'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ou ELISA ont été proposées. La cytométrie en flux ne permet pas de détecter les protéines Bt dans les concentrations environnementales et ne peut, de ce fait, n'être utilisée qu'à but qualitatif (Tapp and Stotzky, 1995a, 1997). La HPLC, quant à elle, est souvent suivie d'une détection UV, sensible aux interférences (Clark et al., 2005). Beaucoup d'auteurs sont alors passés aux techniques d'extraction suivies de détection immunologique de type western blot (Sims et al., 1996) ou ELISA (Palm et al., 1994; Palm et al., 1996; Sims and Berberich, 1996). L'ELISA est une méthode sensible (limite de détection de 0.5 ng de toxine / gramme de sol), quantitative, peu sensible aux interférences compte tenu de la dilution nécessaire avant le dosage. Cependant, comme cette méthode est basée sur une reconnaissance immunologique, il est nécessaire de conserver au maximum la structure native de la protéine et donc d'éviter l'utilisation de détergents trop agressifs tels que le SDS. De plus, au même titre que les autres techniques de dosage, l'ELISA reste dépendant des rendements d'extraction, généralement compris entre 27 et 60 % (Clark et al., 2005).

A ce jour, il n'existe donc pas de méthode de détection *in situ* (en présence de sol) qui soit à la fois fiable, spécifique et reproductible.

CHAPITRE 2.

INTERACTIONS DE LA TOXINE BT AVEC LES ARGILES

CHAPITRE 2. INTERACTIONS DE LA TOXINE BT AVEC LES ARGILES

Avant propos

Les toxines Bt issues des PGM sont introduites dans le sol par exsudation racinaire et dégradation des tissus végétaux. Une fois dans le sol, ces toxines, comme d'autres protéines, interagissent fortement avec les composants du sol et notamment avec les argiles qui sont des surfaces très réactives. L'adsorption de ces toxines influe sur leur toxicité, leur persistance et leur mobilité. De ce fait, afin d'évaluer l'impact de l'introduction des PGM dans l'environnement, il est nécessaire de mieux comprendre les interactions physicochimiques entre la toxine et les argiles. La synthèse bibliographique (Chapitre 1) montre qu'un certain nombre d'études se sont intéressées à l'adsorption des toxines Bt sur les composants du sol. Cependant, elles comportent certaines lacunes que ce chapitre tentera de combler.

Les toxines Bt sont des protéines qui s'oligomérisent rapidement à forte concentration. Compte tenu de la faible concentration de toxine relâchée par les PGM, la forme monomérique devrait être prépondérante dans les sols. Cependant, les précédentes études qui se sont intéressées aux interactions des toxines Bt avec les surfaces de sol n'ont pas pris ce facteur en considération. Les toxines utilisées provenaient généralement de suspensions concentrées de toxines centrifugées avant utilisation. De ce fait, les toxines employées se trouvaient probablement à l'état de polymères, avec des propriétés d'adsorption sûrement différentes.

Par ailleurs, les interactions entre les protéines et les argiles sont majoritairement de natures électrostatiques et hydrophobes. De ce fait, le pH joue un rôle déterminant, du moins en ce qui concerne les interactions électrostatiques. Cependant, l'adsorption en fonction du pH est très peu étudiée.

Enfin, outre les phénomènes d'adsorption proprement dits, la réversibilité de l'adsorption de la toxine est un facteur important. En effet, ce dernier permet d'évaluer les risques de transferts de la toxine dans la solution de sol, des transports horizontaux et verticaux avec éventuellement une contamination des nappes phréatiques. Cependant, il existe très peu d'informations sur la réversibilité des interactions physicochimiques entre la toxine et les argiles.

L'objectif de ce deuxième chapitre est de mieux comprendre les interactions physicochimiques entre la toxine Bt et les argiles. Pour ce faire, l'étude des phénomènes d'adsorption et de désorption de la toxine en contact avec deux argiles modèles aux propriétés contrastées, sera réalisée. Il s'agit dans un premier temps de déterminer les conditions de pH et de force ionique nécessaire au maintien de la toxine sous forme monomérique et de réaliser les isothermes d'adsorption sur une gamme de pH. Enfin l'évaluation de la désorption de la protéine au moyen d'une série de tampons et de détergents, permet de renseigner sur la réversibilité de l'interaction et sur les conditions optimales d'extraction pour la détection de la toxine dans le sol.

Soil Biology and Biochemistry 41 (2009) 498-504

Received 2 June 2008

Received in revised form 4 December 2008

Accepted 11 December 2008

Available online 9 January 2009

**Adsorption and desorption of monomeric Bt (*Bacillus thuringiensis*)
Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite**

N. Helassa^a, H. Quiquampoix^a, S. Noinville^b, W. Szponarski^c, S. Staunton^{a,*}

¹INRA-UMR 1222, Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-SupAgro, place Viala, 34060 Montpellier, France

²CNRS-UMR 7075, Laboratoire de Dynamique, Interactions et Réactivité, CNRS, 2 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

³INRA-UMR 386 Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

*Corresponding author: Tel.: +33 (0) 4 99 61 23 31
E-mail address: staunton@montpellier.inra.fr (S. Staunton)

doi:10.1016/j.soilbio.2008.12.008

Abstract

Genetically modified crops, which produce pesticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, release the toxins into soils through root exudates and upon decomposition of crop residues. Although the phenomena of gene transfer and emergence of resistance have been well documented, the fate of these toxins in soil has not yet been clearly elucidated. The aim of this study was to elucidate the adsorption and the desorbability of the Cry1Aa Bt insecticidal protein in contact with two sodium-saturated clays: montmorillonite and kaolinite. Because the toxin is released into soil in small quantities, it was assumed that it will be in a monomeric state in solution until it oligomerized on cell membranes. The originality of this study was to focus on the monomeric form of the protein. Specific sample conditions were required to avoid polymerization. A pH above 6.5 and an ionic strength of at least 150 mM (NaCl) were necessary to keep the protein in solution and in a monomeric state. The adsorption isotherms obtained were of the L-type (low affinity) for both clays and fitted the Langmuir equation. The adsorption maximum of the toxin, calculated by the Langmuir nonlinear regression, decreased with increasing pH from 6.5, which was close to the isoelectric point, to 9. At pH 6.5, the calculated adsorption was 1.7 g g^{-1} on montmorillonite and 0.04 g g^{-1} on kaolinite. Desorbability measurements showed that a small fraction of toxin could be desorbed by water (up to 14%) and more by alkaline pH buffers ($36 \pm 7\%$), indicating that it was not tightly bound. Numerous surfactants were evaluated and the toxin was found to be easily desorbed from both clays when using zwitterionic and nonionic surfactants such as CHAPS, Triton-X-100, and Tween 20. This finding has important implications for the optimization of detection methods for Bt toxin in soil.

Keywords: Bacillus thuringiensis, adsorption, insecticidal protein, Cry1Aa, desorption, montmorillonite, kaolinite, surfactant, detergent

1. Introduction

Bacillus thuringiensis (Bt) is a gram positive, aerobic, spore-forming parasporal bacterium, that produces insecticidal crystal proteins (ICP) (Höfte and Whiteley, 1989). When ingested by target insect larvae, they are solubilized at high pH (9 to 11) and enzymatically cleaved in the midgut to produce toxins that induce death by osmotic lysis (Wolfersberger, 1990). Currently, Bt formulations are the most widely used commercial biopesticide, especially in organic farming. However, crystal preparations are easily inactivated by sunlight and degraded by microorganisms (Crecchio and Stotzky, 1998), and spores decrease rapidly in number under most natural soil conditions. To improve performance, toxin genes have been incorporated into the genome of some commercial agricultural plants. These Bt-transformed plants produce Bt toxins directly in a toxic form, not requiring any activation by specific proteases. Commercial cultivation of genetically modified (GM) plants began in the USA slightly more than a decade ago and has expanded rapidly with 20.3 millions hectares of Bt-transformed crops worldwide in 2007, which represents 37% of total GM crops (James, 2007). One of the major advantages of GM insecticidal plants, in comparison to the application of a biopesticide, is that the insecticidal properties are directly associated with the crop to be protected and throughout its growth. Given the very rapid expansion of these commercial crops, their environmental consequences cannot be completely assessed. Bt toxin is released into soil through root exudates and the recycling of crop residues (Icoz and Stotzky, 2007; Saxena et al., 1999; Tapp and Stotzky, 1998). Both controlled microcosm experiments and field studies have shown that the toxins persist in soil for a long time, up to 8 months (Saxena and Stotzky, 2002; Tapp and Stotzky, 1998; Zwahlen et al., 2003a), while maintaining their insecticidal activity (Lee et al., 2003).

In general, proteins are strongly, often quasi-irreversibly, adsorbed on soil constituents, particularly clay minerals. Adsorption has many consequences: mobility is severely restricted, biological properties may be modified due to conformational changes (Servagent-Noinville et al., 2000) and orientation (Baron et al., 1999) on the surface, and various degrees of protection against microbial breakdown may be gained (Kleber et al., 2007). Both the extent of adsorption and the resulting conformation changes are often strongly dependent on pH (Quiquampoix, 2008; Quiquampoix and Burns, 2007).

Studies of Bt toxins in contact with soil and soil constituents confirm that the toxins are readily adsorbed on homoionic reference clay minerals (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2007), soil fractions (Chevallier et al., 2003; Muchaonyerwa et al., 2002; Muchaonyerwa et al., 2006; Tapp et al., 1994; Tapp and Stotzky, 1995b; Venkateswerlu and Stotzky, 1992), and humic acids (Crecchio and Stotzky, 1998; Crecchio and Stotzky, 2001). However, previous studies have reported different types of adsorption isotherms for similar minerals and differences in the measured or extrapolated values of maximum adsorption. Part of the reason for these differences may be related to the pH-dependence of adsorption and contrasting adsorption properties of different Cry proteins. However, a major reason may be the polydispersity of toxins in some studies. Because of the small concentrations of proteins present in contaminated soils (up to 100 ng of toxin g⁻¹ soil) (Hopkins and Gregorich, 2003; Tapp and Stotzky, 1995a), the protein would probably be present as monomers, regardless of the pH and salt concentration (Kodaka, 2004; Powers and Powers, 2006; Stradner et al., 2004). In contrast, at larger concentrations high pH and high salt concentration (Guereca and

Bravo, 1999) are required to inhibit polymerization. Although some reports indicated that turbid stock solutions of toxins were filtered immediately before use to remove insoluble polymers, a range of oligomers with different adsorption properties could remain, or evolve during the experiment.

It is also essential to understand the reversibility of adsorption, not only because desorbability determines mobility and decreases the protection against microbial breakdown, but also because immunological detection of the Bt toxins requires prior desorption from soil. Only a few studies have investigated the desorption of Bt toxins adsorbed on soils or soil minerals. In most cases, no desorption was observed after washing with either water or buffer (Chevallier et al., 2003; Crecchio and Stotzky, 2001; Fu et al., 2007; Tapp et al., 1994). In contrast, some authors reported (Crecchio and Stotzky, 1998; Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2007) a considerable proportion of Bt toxin to be desorbed from soils and soil components by resuspension in water. The efficiency of extraction may differ markedly between soils, depending in particular on their mineralogy and clay content, potentially creating experimental bias when comparing the fate of Bt toxins in different soils.

The objective of this study was to investigate the interaction between Cry1Aa (the protein produced in Bt-transformed rice) and two contrasting clay minerals: montmorillonite and kaolinite. Both adsorption and desorption were measured. The protein was always in a monomeric form, despite the high concentration of protein. Adsorption isotherms were determined on sodium-saturated clays at pH values between 6.5 and 9. The lower pH limit was imposed by the oligomerization of the protein at acid pH. Desorption was measured using three desorption buffers combined with five different surfactants (Triton-X-100, CHAPS, Tween 20, Sarkosyl, and SDS), which included ionic, nonionic and zwitterionic surfactants. Moreover, this analysis was designed to improve upon the extraction step proposed for commercial detection kits, usually based on Tween 20 desorption. Desorption by electroelution (based on a combination of SDS and an electric field) was also performed. Another aim was to optimize extraction methods and assess their dependence on soil mineralogy, to optimize Bt detection methods.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Cry1Aa toxin

A genetically modified strain (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 provided by CIRAD, Montpellier) producing Cry1Aa ICP was cultivated in a fermentor (Inceltech) containing 8 l of liquid medium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ at 500 μM , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ at 10 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ at 50 μM , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ at 50 μM , CaCl_2 at 1 mM, KH_2PO_4 at 50 mM, H_2SO_4 at 30 $\mu\text{l l}^{-1}$, Bactopeptone at 7.5 g l^{-1} , Glucose 1%, Erythromycin at 50 mg l^{-1} , pH adjusted to 7.4) (R. Frutos and M. Royer, personal communication, CIRAD, Montpellier). 250 ml of a 24 h Bt culture was inoculated to the fermentor and placed in a water bath at 30°C with constant aeration (8 l min^{-1}). After 48 h of incubation, the medium was centrifuged at 8 000 g for 15 min and the pellets, containing crystals and spores, were resuspended in 1 M NaCl to eliminate spores. Next, the suspension was centrifuged at 8 000 g for 15 min and the pellets of crystals washed with ultra-pure water and ultrasonicated at 100 W for 5 min.

The protoxin thus obtained was solubilized in 50 mM Na_2CO_3 containing 10 mM DL-Dithiothreitol (DTT), for 1 h at 37°C, centrifuged at 23 000 g for 30 min and the solution was filtered at 0.45 μm . The protoxin was activated by trypsin digestion (Sigma, T8003) at pH 8 (trypsin/protein ratio (w/w) = 1/10) and the reaction was

stopped by addition of 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). The toxin thus obtained was centrifuged at 15 000 *g* for 30 min and the solution was filtered at 0.2 μm before purification on an anion exchanger (Q-HP Sepharose, Amersham) on an AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech) at pH 10.4, and the toxin was eluted by an NaCl gradient ranging from 0 to 1 M.

The yield of purified toxin was about 200 mg. The stock solution of purified toxin in CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) 10 mM, NaCl 350 mM, pH 10.4, was stored at 4°C until required. Its concentration was determined at 277 nm using an extinction coefficient obtained by the Edelhoch method ($\epsilon = 82\,280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) (Pace et al., 1995).

The molecular mass of the protein (about 66 kDa) was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The identity of the protein was confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) (Ultraflex II, Bruker), and the monomeric state was determined by dynamic light scattering (Zetasizer HS3000).

2.2. Preparation of clays

The clay-sized fraction ($\phi < 2\ \mu\text{m}$) of Wyoming montmorillonite and St Austell kaolinite was obtained by sedimentation, Na-saturation by three washings with 1M NaCl, and water washing until salt-free. The suspensions of homoionic clays were stored at 4°C at respectively 5 g l⁻¹ and 65.3 g l⁻¹. The specific surface area of the montmorillonite is 800 m² g⁻¹ and that of the kaolinite 20 m² g⁻¹.

2.3. Adsorption isotherms

Adsorption isotherms were obtained in 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), 20 mM, NaH₂PO₄, 10 mM, buffer at pH values of 6.5, 7, 8, and 9. The total volume was 1.2 ml with a final clay concentration of 0.1 g l⁻¹ for the montmorillonite and 1.63 g l⁻¹ for the kaolinite. The experiments were performed in a water bath at 25°C for 1.5 h. After incubation, the suspensions were centrifuged at 23 000 *g* for 30 min. The amount of toxin adsorbed (g toxin g⁻¹ clay) was calculated from the difference in concentration before and after centrifugation by UV spectrophotometry, as described above. Control experiments were performed in the absence of toxin.

All adsorption and desorption experiments were performed at an ionic strength of 150 mM to maintain the toxin soluble and in a monomeric state.

2.4. Desorbability

The desorption experiments were carried out after an adsorption step at pH 7 as described above. After adsorption and phase separation by centrifugation the supernatant solutions were discarded. Volume of solution remaining in the pellets was calculated by weight and the amount of nonadsorbed toxin calculated. Account was taken of the toxin remaining in the solution of the moist clay pellet in calculations of the fraction desorbed.

2.4.1. Desorption using buffers and surfactants

The pellet containing the protein adsorbed on the clay (0.12 mg montmorillonite or 2 mg kaolinite) was washed with 1 ml of one of three desorption buffers mixed with one of five surfactants. The standard solutions were (i) water, (ii) 20 mM MOPS, 10 mM NaH₂PO₄ at pH 8, and (iii) 10 mM CAPS at pH 11.5. The surfactants, added to give a final concentration of 0.1%, were Triton-X-100 (nonionic), 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) (zwitterionic),

Tween 20 (nonionic), Sarkosyl (anionic), and SDS (anionic). The contact time was 2 h at 25°C in a water bath. Then, the suspension was centrifuged at 23 000 g for 30 min and the concentration of toxin desorbed in the resulting supernatant was determined. The concentration was too dilute to be measured using nonspecific protein determinations, and a commercial ELISA kit was used (Qualiplate Cry1Ab/1Ac, Envirologix). This kit, initially designed for Cry1Ab and Cry1Ac proteins, was successfully applied to Cry1Aa protein in this study. Moreover, a calibration curve with Cry1Aa protein allowed the results to be quantified. Preliminary experiments using contrasting dilution schemes (Rouxhet et al., 2005) ensured that there was no significant adsorption of the toxin on the plastics used, and that the enzyme response of the ELISA test was linear for each sample at the final dilution.

2.4.2. Desorption by electroelution

The pellets containing the protein adsorbed on the clays were resuspended with 500 µl of Laemmli buffer 1x (62.5 mM Tris pH 6.8, 1.25% SDS, 25 mM DTT), and the protocol of desorption by electroelution established by Rigou et al. (2006) was performed. The amount of protein desorbed was measured using the ELISA kit as described above.

3. Results

3.1. Preliminary study: polydispersity of the toxin

The solubility of the protein was investigated to determine optimal sample conditions. Analysis by light scattering showed that a pH lower than 6.5 involved aggregation, even at high ionic strength (350 mM) (**Table 2-1**). The minimal ionic strength required to keep the toxin in a monomeric state was 150 mM. Therefore, specific sample conditions (pH above 6.5 and ionic strength of 150 mM) were used in all subsequent experiments.

Table 2-1. Hydrodynamic diameters (d_H) of the toxin Cry1Aa and dispersity in solution obtained by Dynamic Light Scattering as a function of pH and ionic strength (NaCl).

pH	Ionic strength (mM)	d_H (nm)	Percentage in volume (%)	Dispersity state	
10	350	7.8	99.9	Monomeric	
9		7.2	97.4		
7		9	99.2		
6.5		8	95.9		
6	80	precipitation		Polymeric	
6.5		100			
		150	7.2		99.9

3.2. Adsorption isotherms

The adsorption isotherms of the Cry1Aa toxin from *B. thuringiensis* on the montmorillonite and the kaolinite were L-type (low affinity interaction) (Giles, 1974), showing a gradual increase to a flat plateau for both clays (**Figures 2-1 and 2-2**). The data could be fitted to a Langmuir isotherm and the fitting parameters are presented in **Table 2-2**. The maximum amounts of toxin adsorbed were estimated by the Langmuir

equation using a nonlinear regression, as it gave best fits. For both clays, the adsorption maximum was greatest at pH 6.5 and decreased with increasing pH (**Figure 2-3**). The maximum amount of toxin adsorbed on montmorillonite was 1.7 g g^{-1} clay at pH 6.5 and decreased to 0.6 g g^{-1} at pH 9. On kaolinite, the calculated adsorption maximum amount was 0.039 g g^{-1} clay at pH 6.5 and decreased to 0.009 g g^{-1} at pH 9.

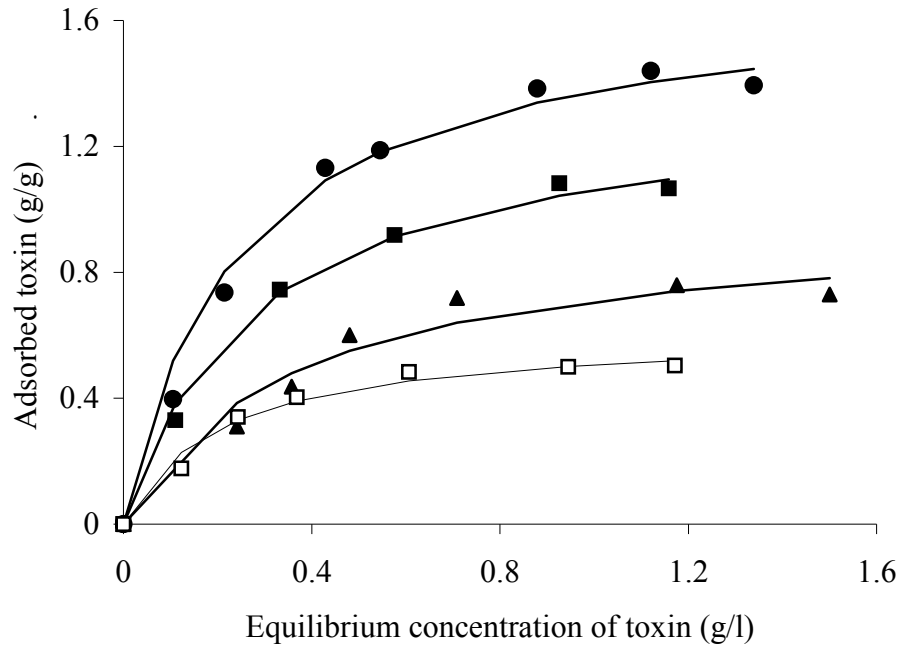


Figure 2-1. Adsorption isotherms of Cry1Aa toxin on montmorillonite at various pH values: 6.5 (●); 7 (■); 8 (▲) and 9 (□). Lines represent nonlinear regression fits (Schulthess & Dey, 1996) to Langmuir adsorption isotherm.

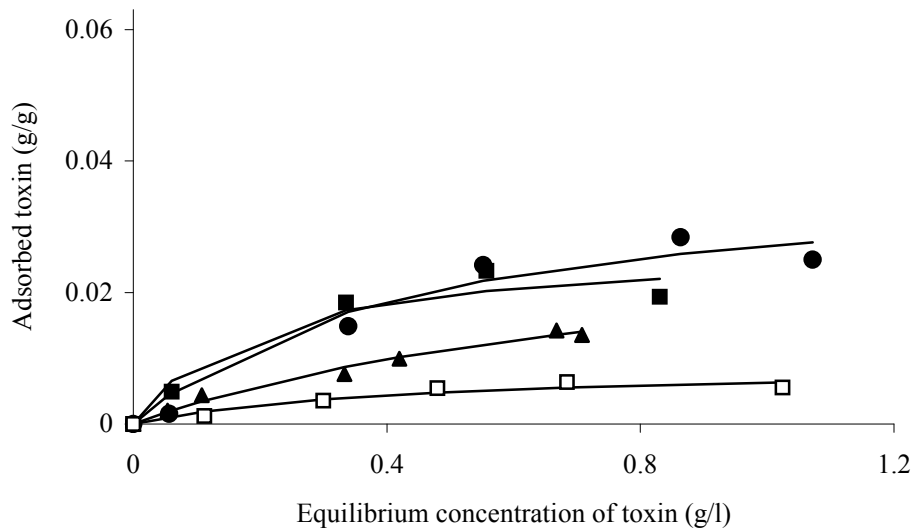


Figure 2-2. Adsorption isotherms of Cry1Aa toxin on kaolinite at various pH: 6.5 (●); 7 (■); 8 (▲) and 9 (□). Lines represent non-linear regression fits (Schulthess & Dey, 1996) to Langmuir adsorption isotherm.

Table 2-2. Langmuir parameters for the adsorption of the Cry1Aa toxin on clays using a nonlinear regression as a function of pH.

The equation is: $\Gamma = \Gamma_{max}KC/(1 + KC)$, where Γ is the amount of toxin adsorbed per unit mass of clay; Γ_{max} is the maximum amount of toxin adsorbed; C is the equilibrium concentration of the toxin; and K is the Langmuir equilibrium constant.

Clay	pH	Γ_{max}	K	Correlation coefficient
Montmorillonite	6.5	1.71	4.14	0.991
	7	1.36	3.57	0.993
	8	0.97	2.72	0.913
	9	0.61	4.84	0.973
Kaolinite	6.5	0.039	2.31	0.762
	7	0.027	5.26	0.891
	8	0.031	1.17	0.977
	9	0.009	2.41	0.866

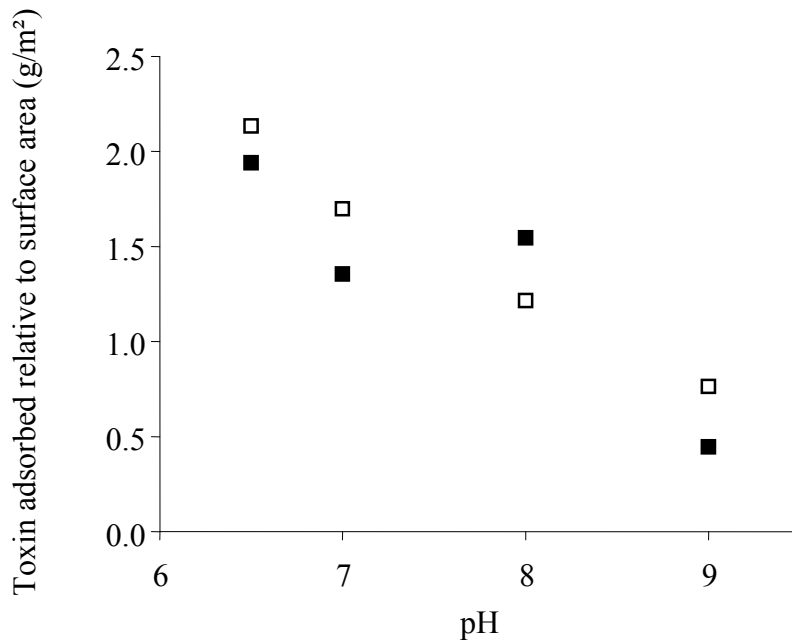


Figure 2-3. Effect of pH on the maximum amount of toxin adsorbed calculated by Langmuir regression, normalized to the specific surface area for the montmorillonite (\square) and the kaolinite (\blacksquare).

3.3. Desorbability

Two different amounts of toxin adsorbed on montmorillonite were studied corresponding to half-plateau (48 µg) and plateau (105 µg) on the adsorption isotherm. At half-plateau (**Figure 2-4a**), adsorbed toxin was almost completely desorbed using the surfactants CHAPS, Triton-X-100, and Tween 20. In contrast, Sarkosyl and SDS were not efficient extractants, except for Sarkosyl at pH 8. The extraction efficiency of SDS increased when combined with an electric field, for which $11 \pm 2\%$ of desorption was observed. The extractability in water was low, but increased with increasing pH: from $14 \pm 0\%$ without buffer at pH 7 to $36 \pm 7\%$ at pH 11.5.

At the plateau (**Figure 2-4b**), the same trends in buffer efficiency were observed, although percentages of desorption were approximately halved, indicating that, the same amount of toxin was desorbed. For the half-saturated montmorillonite, maximum of desorption were observed for CHAPS, Triton-X-100, and Tween 20, whereas Sarkosyl and SDS (combined or not with an electric field) were not very efficient.

The amount of toxin desorbed from the kaolinite (**Figure 2-5**) was improved by surfactants at all pH values, except with SDS. Sarkosyl desorbed more with increasing pH (from $26 \pm 6\%$ to $117 \pm 3\%$). Electroelution from this clay was efficient, as it desorbed $65 \pm 7\%$ of toxin.

We conclude that similar desorbability trends were observed on montmorillonite and kaolinite since the best desorbants were CHAPS, Triton-X-100 and Tween 20. However, on kaolinite, Sarkosyl became efficient when pH increased and SDS when an electric field was applied.

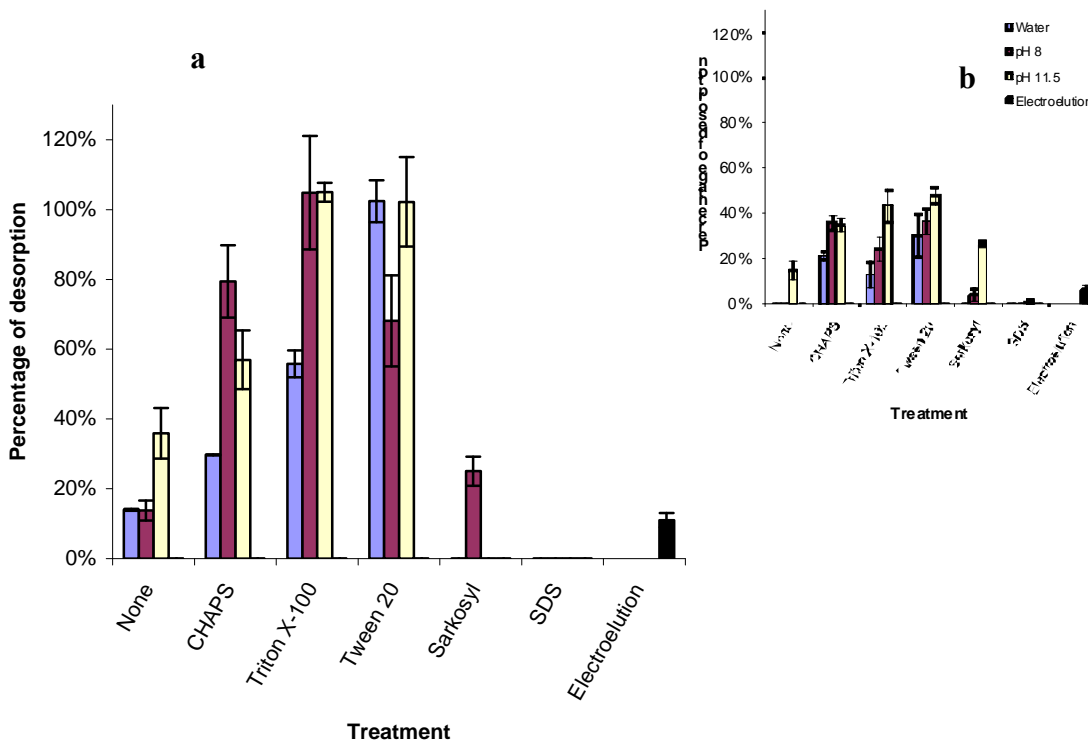


Figure 2-4. Desorption of the Cry1Aa toxin using various combinations of pH buffers and surfactants, and the use of electroelution from montmorillonite for initial toxin concentration corresponding to half-plateau (a) and plateau (b). Bars indicate one standard deviation calculated from replicates.

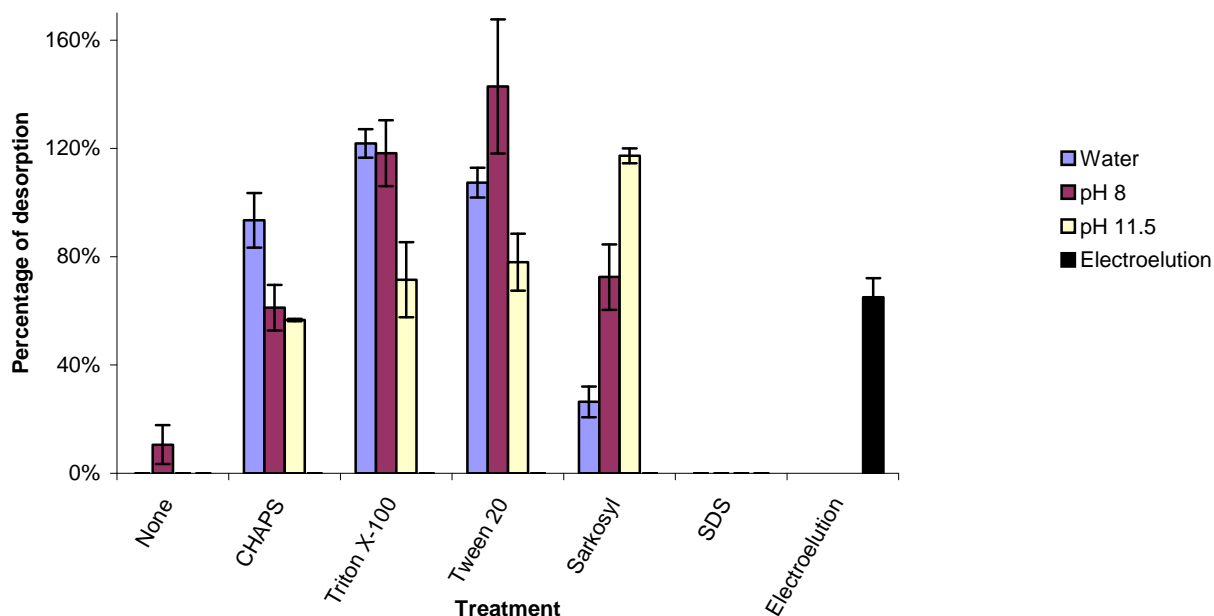


Figure 2-5. Desorption of the Cry1Aa toxin using various combinations of pH buffers and surfactants, and the use of electroelution from kaolinite. Bars indicate one standard deviation calculated from replicates.

4. Discussion

4.1. Polydispersity state

In most of the studies dealing with adsorption of Bt toxins, a centrifugation step was performed on the protein mixture just before use, presumably to discard polymers (Crecchio and Stotzky, 1998; Crecchio and Stotzky, 2001; Fu et al., 2007; Muchaonyerwa et al., 2006; Tapp and Stotzky, 1995b; Venkateswerlu and Stotzky, 1992; Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2007). This centrifugation step removed high molecular weight aggregates, whereas oligomers may still have been present in solution (Guereca and Bravo, 1999). In the present study, the monomeric form was used because it would probably be the principal state of Bt protein in soil solution, due to the low concentration. The toxin was in a monomeric state, as shown by dynamic light scattering analysis. Various precautions were taken to ensure that the monomeric state was maintained. First, the toxin was purified directly after activation, as Guereca and Bravo (1999) observed high molecular mass aggregates of 600 kDa, depending on the time elapsed after toxin activation (Guereca and Bravo, 1999). Second, a lower limit of pH of 6.5 was observed, as the protein tends to oligomerize and precipitate at acid pH values (Crecchio and Stotzky, 2001; Tapp et al., 1994). Third, a high ionic strength was maintained using NaCl (150 mM), as oligomerization was observed at lower ionic strength, even when no precipitation occurred.

4.2. pH-dependence of adsorption

Previous studies have shown that toxins from *B. thuringiensis* adsorbed readily (within 30 min), as is the case with many proteins (Haynes and Norde, 1994; Theng, 1979). The isotherms of adsorption presented in this study were of the L-type, (Giles et al., 1974), suggesting a low affinity interaction, as observed by several authors

(Crecchio and Stotzky, 2001; Fu et al., 2007; Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2007). Other types of affinity have also been observed: H-type (Chevallier et al., 2003) and C-type (Muchaonyerwa et al., 2006). The two clays had markedly different adsorption capacities for the toxin. Montmorillonite, a swelling 2:1 Si:Al clay mineral adsorbed about 40 times more toxin than did kaolinite, a nonswelling 1:1 Si:Al clay. This 40-fold difference in adsorption maxima for the two clays corresponded well to the difference in their specific surface areas.

In this study, pH had a significant effect on adsorption of the toxin on both clays, as adsorption was highest at lower pH and decreased as the pH increased from 6.5 to 9. This trend was a result of two phenomena (Quiquampoix, 1987; Quiquampoix et al., 1993). First, at a pH near isoelectric point (IEP) values, a protein with a net neutral charge experiences minimal repulsive forces at the negatively charged surface, and hence adsorption is maximal. Previous studies have reported different values of IEP for Bt toxins: between 4.4 and 5.5 (Venkateswerlu and Stotzky, 1992), 5.5 (Bietlot et al., 1989), and 6.5 (Chevallier et al., 2003; Tapp et al., 1994). As it was not possible to work at a pH below 6.5 because of protein aggregation the pH value at which adsorption would have been maximum could not be ascertained. Nevertheless these findings are in accordance with those of Venkateswerlu and Stotzky (1992), who report maximum adsorption at pH between 6 and 8. Second, when pH increased, there were repulsive electrostatic interactions between the net negatively charged surface of clays and the anionic functional groups of the protein (Quiquampoix et al., 1993). This phenomenon was probably responsible for the decrease in adsorption when the pH increased from 6.5 to 9. The same trend of decreasing adsorption maximum on the two clays with increasing pH was noted, although montmorillonite has a large permanent charge, whereas the surface charge on kaolinite is strongly pH-dependent. When the adsorption maximum was normalized with respect to specific surface area, the adsorption pH-dependence of the toxin was identical on both clays (Fig 3).

4.3. Desorption

Proteins can be adsorbed on clays through ligand exchange, hydrogen bonding, and electrostatic, hydrophobic, and van der Waals interactions (Quiquampoix, 2000; Quiquampoix, 2008). It is difficult to estimate the relative importance of each contribution to the adsorption of the CryIAa protein on clays. There was an important electrostatic contribution from the effect of pH on adsorption. The desorption studies confirm this interaction, but they also point out additional contributions.

In this study, the clay-protein interaction was partly reversible, as water and alkaline pH buffers desorbed a significant amount of toxin, whereas others have indicated that it was mostly nonreversible (Fu et al., 2007; Lee et al., 2003; Tapp et al., 1994; Venkateswerlu and Stotzky, 1992; Zhou et al., 2007). Water desorbed up to $14 \pm 0\%$ of the protein from both montmorillonite and kaolinite. These results were in agreement with those of Saxena and Stotzky (2000) who observed 10-30% desorption after washing minerals with H₂O, of montmorillonite and kaolinite respectively (Saxena and Stotzky, 2000). Other studies on desorption by water obtained different results: some demonstrated that washing desorbed little of the adsorbed proteins, e.g., $8 \pm 4\%$ (Chevallier et al., 2003) and 2-12 % (Lee et al., 2003), whereas others desorbed about 50% of toxin with water (Muchaonyerwa et al., 2006; Sundaram, 1996; Zhou et al., 2007). In addition, Venkateswerlu and Stotzky (1992) observed more than 90% desorption by water or carbonate buffer from kaolinite, whereas, no desorption from montmorillonite occurred, excepted when using Tris buffer, SDS and β -mercaptoethanol. Moreover, high pH buffers were more efficient than water, as up to

35% of the adsorbed toxin could be desorbed. These results were in agreement with the observations of some other authors, who reported desorption of between 30% and 50% of toxin from clay minerals or clay fractions using carbonate buffer (Venkateswerlu and Stotzky, 1992; Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2007).

Inasmuch as water and high pH buffers desorbed a small but environmentally significant part of adsorbed toxin, the toxin was apparently not tightly bound on the clays. Therefore, the toxin could be desorbed under environmental conditions, suggesting that the toxin would be able to diffuse, which could lead to the contamination of surface and underground waters and the exposure of insects far from the plant source (Saxena et al., 2002b). This is a different behaviour from other environmentally relevant protein contaminants, such as the prion protein which is tightly bound to clay surfaces and cannot contaminate waters without colloid facilitated transport mechanism (Quiquampoix and Burns, 2007; Rigou et al., 2006; Vasina et al., 2005). Moreover, the electroelution results suggested that the toxin was more strongly bound on montmorillonite than on kaolinite, suggesting a greater affinity for montmorillonite.

Similar desorption profiles were observed for montmorillonite and kaolinite, suggesting that the interaction mechanisms, despite the different adsorption capacities, were not markedly different. This contrasts with the finding of Venkateswerlu and Stotzky (1992) who found that the toxin was much more easily desorbed from kaolinite than from montmorillonite with either H₂O or 0.2% Na₂CO₃.

The results of the study of surfactants not only provide complementary information on the nature of the protein-clay interaction, but they are also important for the development of reliable extraction-detection tests. Desorption by water was small, whereas use of zwitterionic (CHAPS) and nonionic surfactants (Triton-X-100 and Tween 20) removed 80-100% of the adsorbed toxin, and anionic surfactants (SDS and Sarkosyl) were rather inefficient, depending on the clay mineral and the pH of the suspension. Comparison of the results at two levels of saturation showed that almost the same amounts of protein were desorbed from montmorillonite. When the surface was saturated, up to 50% of the protein remained on the clay. Moreover, SDS and Sarkosyl alone were inefficient. SDS is a strong anionic detergent that denatures proteins. As the detection test was based on ELISA, the denaturation of the protein would interfere with its quantification. In a complementary experiment, SDS was found to underestimate the immunological detection by approximately 60% (data not shown). This observation may provide an indirect indication about the interaction between the protein and the mineral surface. Anionic surfactants are efficient when they compete with negatively charged sites of the adsorbant surface for the interaction with positively charged side chains of the amino acids (Naderi et al., 2008; Rojas et al., 2002). The relative inefficiency of anionic surfactants, therefore, suggests that the interaction of positively charged amino acids of Cry1Aa protein with the mineral surfaces is not the only factor determining adsorption. Tween 20, a surfactant recommended by Palm et al. (1994) and usually used in commercial extraction and detection kits, seemed to be appropriate, as it desorbed the totality of the adsorbed toxin on both clays. It is probable that the hydrophobic tail of this surfactant interacts with hydrophobic moieties of the toxin, thus reducing the interaction with the clay surfaces (Naderi, 2008). As Triton-X-100 and CHAPS had the same desorption efficiency as Tween 20, these and similar surfactants may give efficient and constant extraction yields for environmental samples containing Bt toxins. However, both soil mineralogy and the saturation level of the surface may modify yields, and further studies will be required to determine optimal desorption

protocols. Furthermore, when immunological detection follows extraction, there is a risk of poor recognition due to protein unfolding.

Most previous studies of the adsorption of Bt toxin do not take account of the degree of polymerisation of the protein in solution. The originality of this study was the focus on the monomeric form of Bt toxin. For that, specific sample conditions were necessary to keep the toxin in a monomeric form, including a pH above 6.5 and an ionic strength of 150 mM. The toxin-clay adsorption was a low affinity interaction. The maximum amount of toxin adsorbed decreased as the pH increased. The 40-fold larger amount of toxin adsorbed on montmorillonite than on kaolinite was in accordance with their specific surface areas. Desorption experiments showed that the use of surfactants could remove up to the totality of the toxin from the clay, which is promising for the improvement of detection methods for environmental samples. In addition, water and high pH buffers seemed to desorb a significant amount of toxin, which suggested that the toxin was not irreversibly adsorbed and so could be mobile under environmental conditions. Adsorption may confer protection against microbial activity, leading to a longer persistence of the toxin in soil, a longer exposure time to target and nontarget organisms, and an increased risk of insect resistance to Bt toxins, limiting the usefulness of this class of genetically modified plants in the future. Thus, further studies must be conducted to elucidate the mechanisms determining trends in the toxicity of adsorbed protein and its residual mobility in soil systems.

Acknowledgments

The research was funded by the Agence Nationale de la Recherche and a doctoral grant was awarded to N.H. by the INRA and the Région Languedoc Roussillon. The authors thank R. Frutos for valuable discussion, M. Royer for providing the Bt strain and the cultivation-extraction protocol, F.X. Sauvage for protein analysis, INRA Narbonne for providing the fermentor, and INRA proteomic platform for the mass spectroscopy analyses.

CHAPITRE 3.

MOBILITE DE LA TOXINE BT A L'ETAT ADSORBE

CHAPITRE 3. MOBILITE DE LA TOXINE BT A L'ETAT ADSORBE

Avant propos

Le chapitre précédent a permis de mieux caractériser les interactions entre la toxine Bt et les argiles. Ce travail a été réalisé avec la forme monomère de la toxine, et de ce fait dans des conditions de pH et de force ionique strictes (pH > 6,5 et force ionique > 150 mM). Nous avons démontré que la forme monomère de la toxine possède une faible affinité pour la montmorillonite et la kaolinite, deux argiles aux propriétés contrastées. Aussi, la quantité de toxine adsorbée est fortement dépendante de la surface spécifique de l'argile ainsi que du pH. Enfin, les expériences de désorption indiquent que la toxine n'est pas fortement liée aux argiles puisque son adsorption est partiellement réversible par l'eau et des tampons alcalins. De ce fait, des éventuels transferts horizontaux de la toxine sont envisageables.

Cette notion de transport potentiel est donc très importante pour évaluer l'impact des PGM sur l'environnement car une mobilité importante des toxines Bt dans le sol pourrait être une source de contamination. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à ces transferts.

L'objectif de ce chapitre est alors de déterminer si la toxine adsorbée sur les surfaces argileuses présente une mobilité résiduelle. Pour ce faire, une méthode de microscopie à fluorescence sera utilisée, le Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Habituellement, cette technique est employée pour suivre les dynamiques de molécules au niveau cellulaire. Cependant, elle sera dans ce chapitre adaptée pour la première fois à l'étude du déplacement d'une protéine sur une argile, la montmorillonite. Dans ces expériences, la toxine, couplée à un fluorophore, est adsorbée sur l'argile, puis déposée entre lame et lamelle. Un faisceau laser est utilisé pour éteindre la fluorescence localement (photobleaching), et le suivi de la récupération de la fluorescence dans cette zone photobleachée traduit la diffusion des toxines Bt voisines. Cette analyse sera réalisée dans différentes conditions de pH et de niveaux de saturation de l'argile, paramètres pouvant influencer sur la cinétique de diffusion.

Regular contribution

March 2009

Mobility of adsorbed Cry1Aa insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* (Bt) on montmorillonite measured by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

¹Helassa, N., ¹Daudin, G., ¹Quiquampoix, H., ²Noinville, S., ³Janot, J. M., ³Déjardin, P. & ^{1*} Staunton, S.

¹INRA-UMR 1222, Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-SupAgro, place Viala, 34060 Montpellier, France

²UMR 7075, Laboratoire de Dynamique, Interactions et Réactivité, CNRS, 2 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

³Institut Européen des Membranes, Université Montpellier 2, UMR 5635 (ENSCM, CNRS, UM2), CC047, 2 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

***Corresponding author: Dr Siobhán Staunton**

E-mail: staunton@montpellier.inra.fr

Phone 33 (0)4 99 61 23 31

Abstract

The insecticidal toxins produced by genetically modified Bt crops are introduced into soil through root exudates and tissue decomposition and adsorb readily on soil components, especially on clays. This immobilization and the consequent concentration of the toxins in “hot spots” could increase the exposure of soil organisms. While the effects on non-target organisms are well documented, few studies consider the migration of the toxin in soil. In this work, we assessed the residual mobility of Bt CryIAa insecticidal toxin adsorbed on montmorillonite using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). This technique, usually used to study dynamics of cytoplasmic and membrane molecules in live cells, was applied for the first time to proteins adsorbed on clays. We demonstrated that adsorbed toxin was completely immobilized at all pH and at different degrees of surface saturation.

Keywords: Bacillus thuringiensis, Bt, adsorption, insecticidal protein, CryIAa, montmorillonite, FRAP, fluorescence recovery after photobleaching, mobility, horizontal transfer, lateral diffusion

1. Introduction

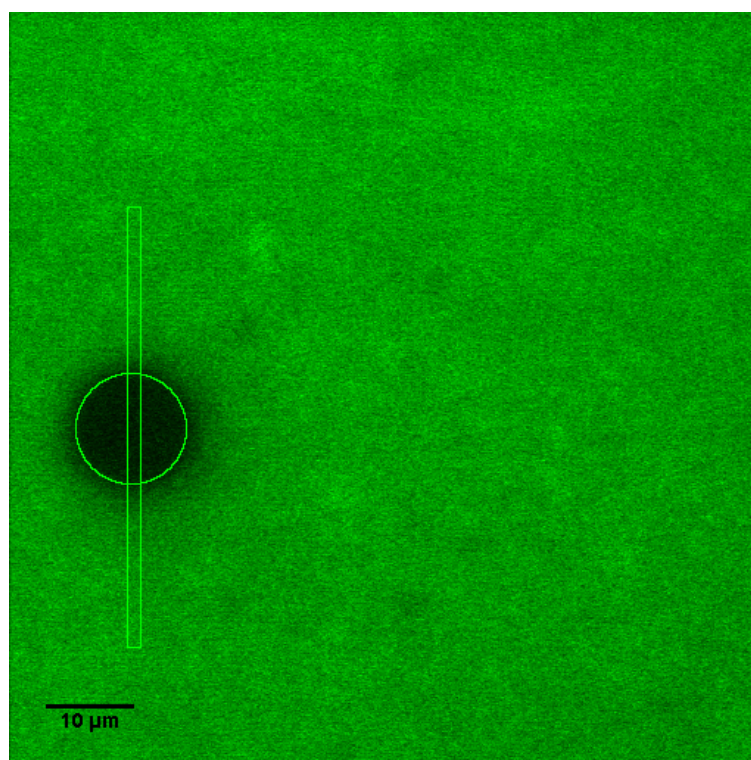
Advances in genetic engineering technology have led to the introduction and expression of genes into plants to produce agronomically useful traits. For example, genes from a soil dwelling bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt) that code for insecticidal toxins have been incorporated into plants, reducing many adverse effects associated with the use of chemical pesticides. Since their commercialisation in 1996, the surface area of Bt crops has dramatically increased to 46 millions hectares worldwide in 2007 (James, 2007). However, this large-scale commercial development raises the concern over environmental risks, such as the effects on non-target organisms, associated with the release of the toxin in soil. The toxin is incorporated into soil through root exudates and tissue decomposition and is readily adsorbed on homoionic reference clay minerals, soil fractions, and humic acids (Icoz and Stotzky, 2008). Adsorption is an important process that can severely reduce mobility. Although lateral diffusion of cytoplasmic and membrane molecules is well documented (Carrero et al., 2003; Chen et al., 2006; Edidin et al., 1976; Reits and Neefjes, 2001; Schlessinger et al., 1976), no information is available for proteins in soil. Mobility of protein adsorbed on surfaces can directly be measured by FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). In this work, the mobility of the Cry1Aa insecticidal toxin from Bt, adsorbed on montmorillonite was measured using FRAP as a function of pH and the extent of saturation of the surface.

2. Materials and Methods

The Cry1Aa toxin was prepared and purified as previously described (Helassa et al., 2009). The molecular weight (about 66 kDa) and the identity of the protein were determined by SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry (Ultraflex II, Bruker), respectively. The labelling of the protein by FITC or fluorescein isothiocyanate (Pierce, Ref 46110) was performed at room temperature in darkness, in sodium carbonate 20 mM pH 9 for 1 hour, as recommended by the supplier. After labelling, the free FITC was separated from the Cry1Aa-FITC by overnight dialysis against sodium carbonate buffer 20 mM pH 9 and the Cry1Aa -FITC was conserved at 4°C, in darkness, until required. We chose FITC as fluorophore, in common with many other studies, since it is easily attached to proteins and has a good balance between photostability and photosensitivity. We verified using an ELISA test that the immunogenicity of the labelled protein was unchanged, suggesting that the fluorophore did not dramatically change protein properties. We assumed that the adsorption properties were unchanged by labelling, as demonstrated by Tilton et al. (1990) for the adsorption of BSA on poly(dimethylsiloxane) (PDMS) surfaces (Tilton et al., 1990b). The clay-sized fraction ($\phi < 2\mu\text{m}$) of Wyoming montmorillonite was obtained by sedimentation as described by Helassa et al. (2009). Adsorption of the fluorescent toxin on montmorillonite was performed in 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) 20 mM – NaH₂PO₄ 10 mM buffer at pH 6.5; 7; 8; and 9. No measurements were carried out at pH below 6.5 because of polymerization of the protein at more acidic pH (Crecchio and Stotzky, 2001; Helassa et al., 2009; Tapp et al., 1994). The experiments were carried out at two levels of saturation in the protein; complete saturation, and half saturation, as previously described (Helassa et al., 2009). The adsorption experiments were performed in a water-bath at 25°C for 1 h 30. After incubation, the suspensions were centrifuged at 23 000 g for 30 minutes. The resulting pellet was washed with the corresponding adsorption buffer for 30 min and centrifuged again for 30 min at 23000 g. The clay pellet was removed with a spatula and smeared onto a microscope slide and immediately covered by a microscope cover glass to avoid evaporation.

A confocal scanning laser microscope (Inverse 1 Axiovert 200M Zeiss / LSM 510 META Confocal, Zeiss) was used for FRAP measurements. Excitation used the 488-nm line from an argon laser Ar 3 LASOS 30 mW to bleach uniform disks with a typical diameter of 12 μm . The bleach period was very short so the amount of fluorescence recovery that could take place during bleaching was considered to be negligible. The microscope was equipped with a 63x objective lens (Zeiss 63x Plan Apochromat 1.4 oil DIC). Twenty prebleach images were collected, and a disk was photobleached rapidly using high-powered focused laser light. Images were processed and the fluorescence redistribution as a function of time analysed using LSM software and ImageJ software system (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). A rectangular slice of 50 μm long allowed to draw a FRAP intensity profile, as a function of distance (**Figure 1**). The resulting intensity profile obtained by confocal microscopy is more reliable for the analysis of lateral Fickian diffusion than the classical global fluorescence recovery method (Yuan et al., 2003).

Figure 3-1. Typical fluorescence image, after photobleaching of a uniform disk of 12 μm diameter, of Cry1Aa adsorbed on montmorillonite.



3. Results and Discussion

FRAP patterns are presented in **Figures 2** and **3** for half-saturated and saturated surfaces, respectively. For both saturation levels, the initial intensity of fluorescence was about 2000-2500 au (arbitrary unit) and fell to about 500 au after photobleaching. In all analyses of fluorescence recovery curves, bleaching was assumed to be irreversible so that any recovery would be due to the translational movement of fluorophores. Five hundred seconds after photobleaching, no fluorescence recovery was observed, suggesting that the adsorbed protein was immobile. The root mean square displacement of the Bt toxin in solution should be $(2Dt)^{1/2}$. If we take the diffusion

coefficient of the bovine serum albumin ($6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) which has a similar molecular mass (Meechai et al., 1999), the root mean square displacement of the toxin would be $245 \mu\text{m}$ after 500 sec. The toxin is thus immobilized whatever the pH or the saturation level as evidenced by the absence of translation in the intensity profiles (**Figures 2 and 3**). If we consider that there is less than a $0.1 \mu\text{m}$ displacement of the boundary between non-bleached and bleached areas after 500 sec, the coefficient diffusion of the adsorbed Bt toxin should be less than $10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$. This results are consistent with the fact that FRAP measurements performed on foam films stabilised by FITC-BSA showed no evidence of surface diffusion as there were no return of fluorescence after the bleach pulse in the recovery part of the FRAP curve (Clark et al., 1998). However, this contrasts with BSA adsorbed on both hydrophilic and hydrophobic surfaces (poly(methylmethacrylate), PDMS surfaces and quartz) on which a coexistence of a mobile fraction and an immobile fraction was observed (Burghardt and Axelrod, 1981; Tilton et al., 1990b). They showed that proteins exhibit surface diffusion despite being irreversibly adsorbed throughout the duration of the diffusion measurement (Tilton et al., 1990b). Moreover, Burghardt and Axelrod (1981) proposed that the fraction of protein that is irreversibly adsorbed is in direct contact with the surface whereas the reversibly adsorbed protein is located in layers further from the surface (Burghardt and Axelrod, 1981). These results suggest that Cry1Aa Bt toxin is probably adsorbed on montmorillonite as a monolayer. This is consistent with the maximum amount of toxin adsorbed.

Adsorption is strongly dependent on pH. For Bt toxins, an IEP of about 6.5 was obtained by 2D-electrophoresis (data not shown) as previously demonstrated (Tapp et al., 1994). At a pH near isoelectric point (IEP) values, a protein with a net neutral charge experiences minimal repulsive forces at the negatively charged surface, and hence adsorption is maximal. When pH is increased, repulsive electrostatic interactions between the net negatively charged surface of clays and the anionic functional groups of the protein, lead to a lower affinity (Quiquampoix et al., 1993). On this basis, an increase in surface diffusion might have been expected as pH was increased from 6.5 to 9. However, as seen in **Figures 2 and 3** there was no pH-dependence of mobility.

Also, no effect of surface saturation level was observed whereas we would have expected a higher mobility when half saturated as previously reported (Gaspers et al., 1994; Tilton et al., 1990a). These authors found a significant decrease in surface diffusion with increasing surface concentration of collagenase and BSA adsorbed on immobilized substrate surfaces and polymer surfaces respectively. However it would not have been possible to detect fluorescence had markedly lower surface saturation levels been studied.

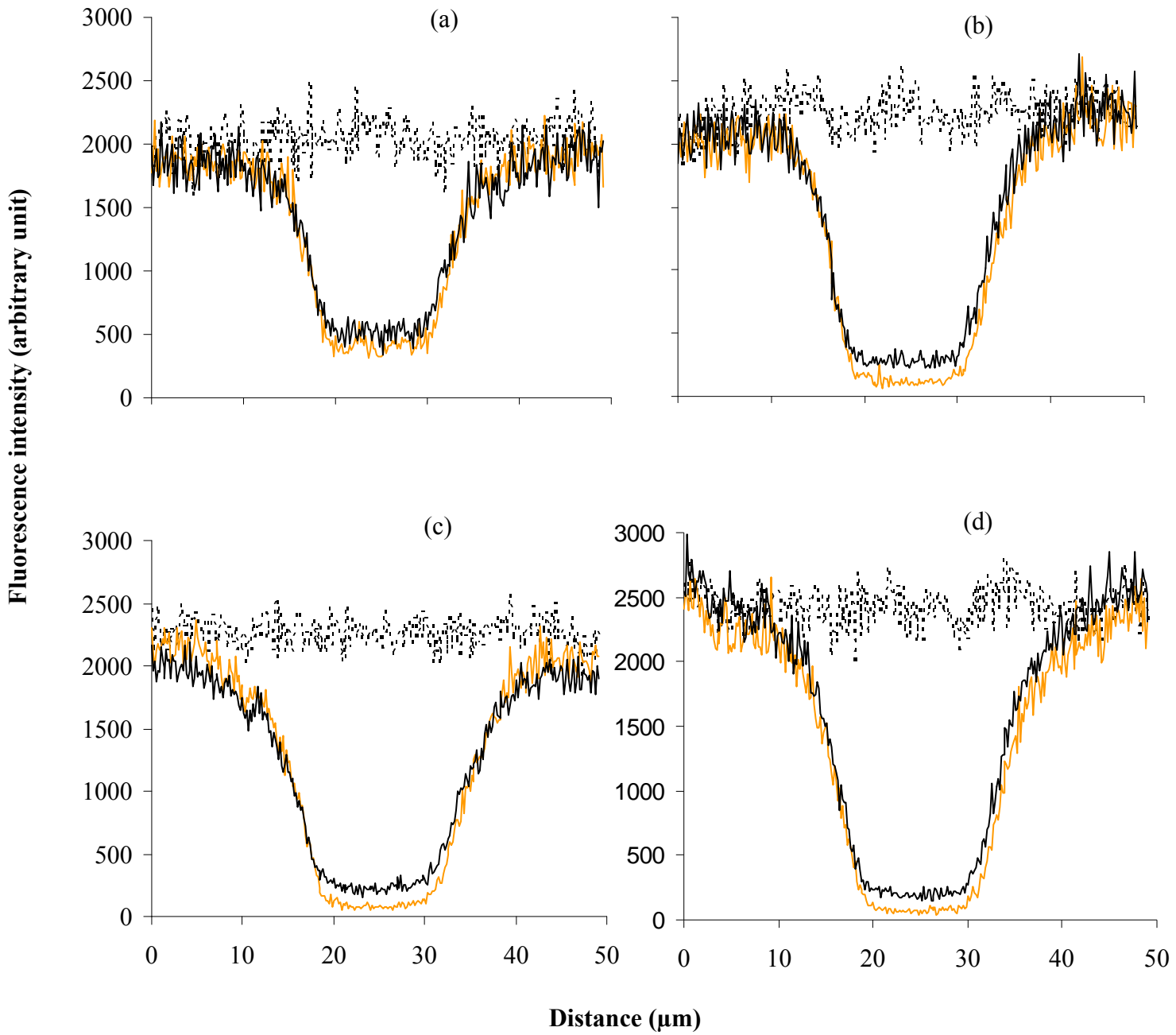


Figure 3-2. Fluorescence intensity profiles for FITC-labeled Cry1Aa adsorbed on montmorillonite at a half-saturation level (.....) before, (—) just after and (—) 500 sec, after photobleaching, at (a) pH 6.5; (b) 7; (c) 8 and (d) 9.

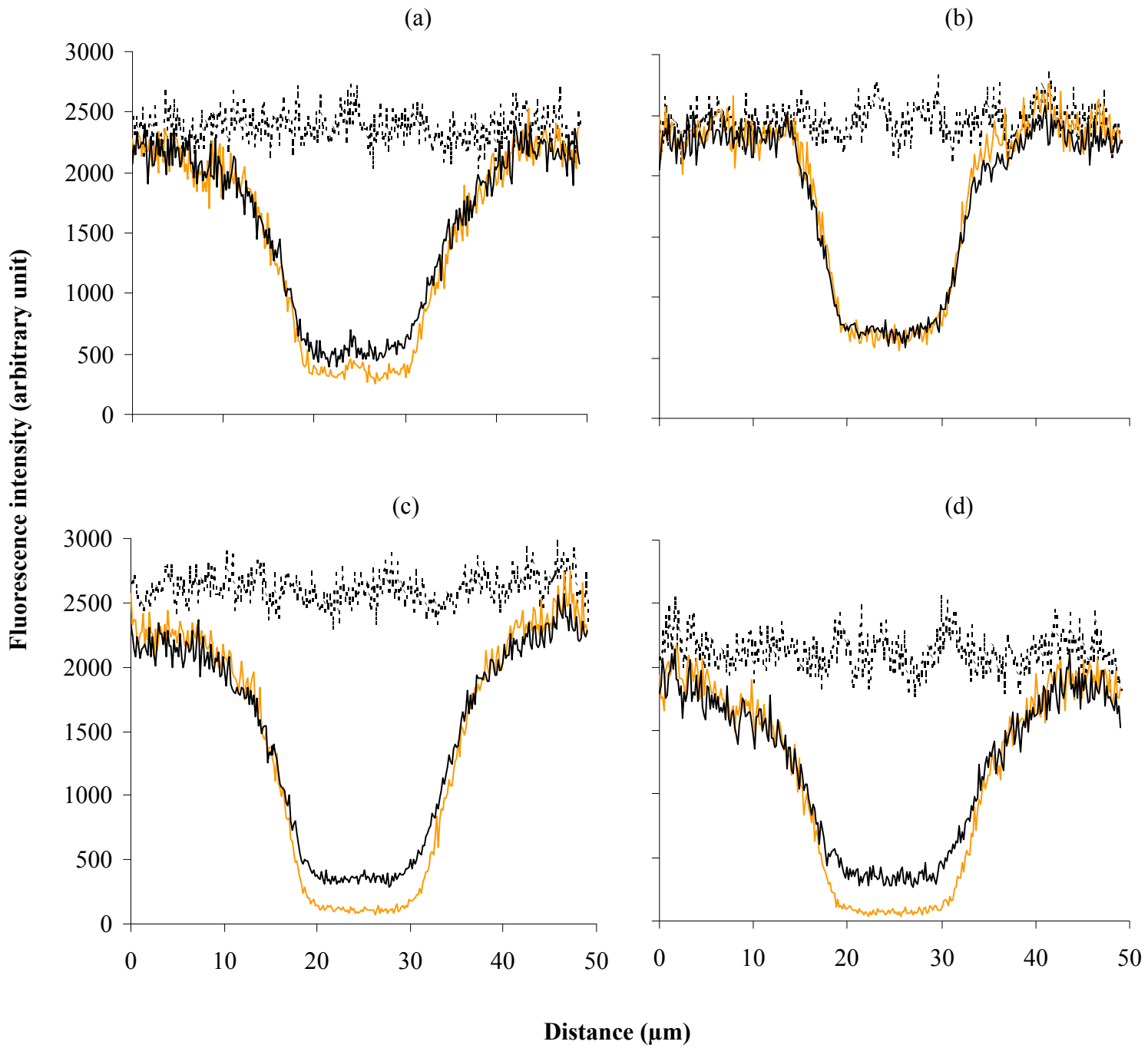


Figure 3-3. Fluorescence intensity profiles for FITC-labeled Cry1Aa adsorbed on montmorillonite at a saturation level (.....) before, (—) just after and (—) 500 sec, after photobleaching, at (a) pH 6.5; (b) 7; (c) 8 and (d) 9.

4. Conclusion

FRAP experiments showed that Bt toxin adsorbed on montmorillonite was completely immobile. This observation has important environmental consequences since the toxin would not diffuse to microporal sites within soil aggregates where it could be protected from microbial proteolysis. This immobilization appeared to be independent of the pH and of the surface saturation level.

Acknowledgments

The research was funded by the Agence Nationale de la Recherche and a doctoral grant was awarded to N.H. by the INRA and the Région Languedoc Roussillon. The authors want to thank B. Chabi for her help with FRAP measurements, R. Frutos and M. Royer for providing the Bt strain and the cultivation-extraction protocol, W. Szponarski for purification technique, and F.X. Sauvage for protein analysis LBE-INRA Narbonne for providing the fermentor and INRA proteomic platform for mass spectroscopy analyses.

CHAPITRE 4.

PERSISTANCE DE LA TOXINE BT DANS LE SOL

CHAPITRE 4. PERSISTANCE DE LA TOXINE BT DANS LE SOL

Avant propos

Les deux précédents chapitres ont permis de mieux définir les interactions physicochimiques entre la toxine Bt et les surfaces d'argiles. Ces interactions ont un effet marqué sur la mobilité de la toxine puisque nous venons de démontrer dans le chapitre précédent que la toxine était immobilisée par son adsorption sur la montmorillonite. De ce fait, les risques de contaminations par transferts dans la solution du sol semblent limités, mis à part les transports facilités par les colloïdes et bioturbation. Aussi, ces interactions physicochimiques peuvent fortement influencer sur la persistance de la toxine dans le sol, puisque la littérature fait mention d'une protection de la toxine contre la dégradation microbienne par son adsorption sur les composants du sol. L'étude de la persistance de la toxine dans le sol est primordiale pour déterminer l'impact des PGM et plus particulièrement l'exposition aux organismes non cibles.

D'après les quelques études disponibles, il apparaît que la toxine Bt ne persiste pas dans les sols, présentant un temps de demi-vie très court, généralement inférieur à 20 jours. Ces observations suggèrent que la toxine est rapidement « dégradée » dans le sol, et de ce fait le risque d'atteinte d'organismes non cibles semble limité. Les mécanismes impliqués sont souvent attribués à l'activité microbienne. Cependant, très peu de données expérimentales permettent à ce jour de conforter cette hypothèse.

L'objet de ce chapitre est donc de déterminer et de hiérarchiser les processus biotiques et/ou abiotiques contrôlant la persistance de la toxine dans le sol. Pour ce faire, de multiples traitements chimiques, enzymatiques et physiques, ciblant principalement la composante microbienne des sols, ont été appliqués. Les expériences ont été réalisées en microcosmes, avec des sols aux propriétés physicochimiques contrastées.

Regular contribution

March 2009

The persistence of Cry1Aa Bt (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil is determined by physicochemical interactions more than microbial degradation

¹Nordine Helassa, ²Arij M'Charek, ¹Hervé Quiquampoix, ³Sylvie Noinville, ⁴Philippe Déjardin, ⁵Roger Frutos & ¹*Siobhán Staunton

¹INRA-UMR 1222, Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-SupAgro, place Viala, 34060 Montpellier, France

²Laboratoire de Biochimie et de Biotechnologie, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie

³UMR 7075 - Laboratoire de Dynamique, Interactions et Réactivité, CNRS, 2 rue Henri Dunant, 94320 Thiais, France

⁴Institut Européen des Membranes, Université Montpellier 2, UMR 5635 (ENSCM, CNRS, UM2), CC047, 2 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

⁵UMR Trypanosomes, CIRAD, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

***Corresponding author: Siobhán Staunton**
E-mail: staunton@montpellier.inra.fr
Phone 33 (0)4 99 61 23 31

Abstract

Genetically modified crops, that produce Cry insecticidal crystal proteins (Cry) from *Bacillus thuringiensis* (Bt), release the toxins into soils through root exudates and upon decomposition of residues. The fate of these toxins in soil has not yet been clearly elucidated. Adsorption of the toxins on soil organo-mineral components plays an important role in determining toxicity and persistence in soil. Persistence can be influenced by biotic (degradation by microorganisms) and abiotic factors (physicochemical interactions with soil components). The aim of this study was to follow the fate of Cry1Aa Bt toxin in contrasting soils subjected to different treatments to enhance or inhibit microbial activity, in order to establish the importance of biotic and abiotic processes in Bt toxin fate. The toxin was efficiently extracted from each soil using an alkaline buffer containing a protein and a surfactant. Both toxin adsorption and the marked decline of extractable toxin after incubation of weeks to months was soil dependent. The decrease of extractable toxin with incubation time was not related to microbial degradation but mainly to physicochemical interactions with the surfaces. Hydrophobic interactions appear to play an important role in determining the interaction of the toxin with surfaces.

1. Introduction

Genetically modified (GM) crops were first commercialised in 1996 and their use has rapidly expanded (James, 2007). There is considerable public concern about the environmental and health impact of their use, particularly in Europe. About 40% of GM crops (on the basis of agricultural land area, thus 40 Mha) contain the insecticidal, so-called Bt, trait, obtained from the spore-forming bacterium, *Bacillus thuringiensis*. Formulations used in biological control containing spores and crystal protoxins of *B. thuringiensis* are considered to be environmental friendly and have been used for pest control for almost 70 years, including in organic farming. Bt-transformed plants present many advantages over other forms of pest control, and marked increases in yield and crop quality have been reported (James, 2007). Fears of adverse impact of these crops arise from two major differences between GM crops and biological control. Firstly, GM plants produce an activated truncated protein, unlike the bacterium which produces crystal proteins (Cry) that are protoxins requiring solubilization and enzymatic cleavage in the midguts of insect larvae. Thus some of the features that provide strong target species specificity have been lost, although to date there has been no clear evidence of direct adverse effects on non-target species. Secondly, the toxin is produced in the whole plant throughout its culture period and released to soil as root exudates and when crop residues breakdown (Saxena et al., 1999; Saxena et al., 2004; Saxena and Stotzky, 2000; Stotzky, 2004; Zwahlen et al., 2003a). In order to evaluate the potential risk of Bt toxins for the environment, it is essential to understand the factors that determine its fate in soil and in particular its persistence.

It has been shown that the toxin, in common with other proteins (Haynes and Norde, 1994), adsorbs readily and somewhat irreversibly to reference clay minerals, natural clay fractions from soils, and humic acids (Icoz and Stotzky, 2008; Pagel-Wieder et al., 2007). Hopkins & Gregorich (2003) detected larger concentrations of Bt in organic and coarse grained soil fractions than in clay sized mineral fractions, but this could partly reflect the efficiency of extraction prior to analysis (Hopkins and Gregorich, 2003). There is increasing evidence that the toxin maintains its insecticidal properties while adsorbed on soil (Lee et al., 2003) suggesting that essential features of protein structure are maintained. Field and microcosm studies have reported a rapid loss of Bt toxin and protoxin from Bt-cropped soils (Head et al., 2002; Shan et al., 2008) and soils amended with Bt crop residues (Donegan et al., 1995; Hopkins and Gregorich, 2003; Icoz and Stotzky, 2007; Muchaonyerwa et al., 2004; Palm et al., 1996; Saxena and Stotzky, 2002; Sims and Holden, 1996b; Sims and Ream, 1997; Wang et al., 2006), solubilized (Donegan et al., 1995; Palm et al., 1996; Tapp and Stotzky, 1998) or solid (Herman et al., 2002; Marchetti, 2007) Bt proteins. In many cases there is an initial rapid loss, over a few days or weeks, followed by a much more gradual decline. It has been shown that adsorption on soil minerals enhances the persistence of Bt toxin and it is assumed that this is due to protection against microbial degradation (Icoz and Stotzky, 2008). However, to our knowledge, only two studies have attempted to compare the persistence of Bt toxin on sterile and non-sterile soil. Palm et al. (1996) reported a slower decline in extractable Bt toxin from a γ -sterilised soil than from the same soil without sterilization (Palm et al., 1996). Similarly, Accinelli et al. (2008) report that the mineralization of ^{14}C -labelled Bt protoxin was slower in autoclaved soil than the same, nonsterile soil and that the initial rate of mineralization was enhanced by addition of an organic substrate (Accinelli et al., 2008). However, the mechanisms controlling persistence in soil are not clearly elucidated. The observed differences may be due to a variety of physicochemical, biological and environmental factors.

The objective of this study was to distinguish between physicochemical and biological factors that determine the persistence of Bt toxin in soil incubated for periods of weeks or months. Four soils with contrasting clay and organic matter contents were chosen, since these properties are most likely to influence the adsorption of the protein on soil. Amendments, soil pre-treatments and incubation conditions were selected to either inhibit or enhance microbial activity, but for each case, possible effects on physicochemical interactions were also considered. Experimental procedures were optimised to give efficient and reproducible extraction of the toxin from soil prior to immunological analysis.

2. Experimental

2.1. Preparation of the purified Bt toxin

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1, genetically modified to produce Cry1Aa Bt toxin, was cultivated in a fermentor until sporulation. The protoxins obtained were solubilized and enzymatically cleaved to obtain the toxin which was purified and stored at 4°C until required in a CAPS buffer at pH 10.4 containing NaCl 350 mM to prevent polymerisation (Helassa et al., 2009; Masson et al., 2002).

2.2. Soils and soil treatments

The four soils were sampled in Bt-free fields located in France and United Kingdom, they were air-dried and sieved < 200 µm and stored until required. Some physicochemical characteristics are shown in **Table 4-1 (Supporting Information)**. Soils A and B were top and subsoils from the same profile, and differ mainly in their organic matter content, both have clayey texture. Soils R and T were taken from adjacent sites, both are sand-textured but R had a larger organic matter content. All soils had near-neutral pH. When required, soils were sterilized by either γ -irradiation (25 kGy from a ^{60}Co source) or autoclaving (20 minutes at 121°C, followed by air-drying).

2.3. Soil microcosm experiments

For each treatment and incubation period, triplicate microcosms were prepared by wetting soil to give a moisture tension of -25 kPa (pF 2.4) with solutions containing Bt toxin and appropriate amendments (acid or alkali; inhibitor or enhancer of microbial activity). The amount of Bt toxin added ranged from 550 to 1100 ng g⁻¹, and was determined accurately from the concentration of each solution. Microcosms were sealed and incubated at 25°C in the dark. Preliminary experiments showed that the head space was sufficient to prevent anoxic conditions developing in the soil, and moisture content remained constant. After the required incubation period, microcosms were destructively sampled.

Three factors were varied in various series of incubations.

Effect of pH

For each soil, pH was adjusted to +1, -1 or -2 with respect to the initial pH value by addition of solutions of K₂CO₃ or HCl. The amount of acid and alkali required for each soil was calculated in preliminary experiments.

Effect of stimulation of microbial activity

Three different “trigger solutions” of organic carbon containing 0.2 mg C g⁻¹ soil were used to enhance microbial activity (De Nobili et al., 2001). The solutions contained (i) glucose, (ii) RMPI 1640 amino acids solution containing all amino acids except L-

glutamine (Sigma, R7131), or a mixture of both glucose and amino acids. A complementary experiment was performed in the same incubation conditions with a larger concentration of glucose, 2 mg C g⁻¹ soil.

Effect of inhibition of microbial activity

In a first series of experiments, microbial activity was inhibited using mercuric chloride (500 µg HgCl₂ g⁻¹ soil (Trevors, 1996)). In a second, more complete series of experiments, five different approaches were adopted by incubating: (i) untreated, control soil; (ii) γ-sterilized soil; (iii) autoclaved soil; (iv) soil at 4°C and (v) soil plus an inhibitor of protease activity (Sigma, SigmaFast S8820). In this series of incubations the effect of antiprotease cocktail was monitored for each soil and each treatment (control, γ-irradiation, autoclaving and low temperature).

2.4. Toxin extraction and quantification

After several incubation periods, Bt toxin contained in each sample was recovered by the addition of 1 ml of extraction buffer (CAPS 10 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 1 %, Bovine Serum Albumin 4 %, pH 11) and end-over-end shaking for 30 minutes. Then, after phase separation by centrifugation, the supernatant was collected and analysed by ELISA immunological test (Qualiplate AP003, Envirologix) and a Biotek ELX808 IU reader at 450 nm.

2.5. Adsorption of the Bt toxin on soil

The effect of temperature (25 or 4 °C) on the adsorption of Bt toxin on soil was measured in suspension containing 0.2 g soil ml⁻¹, in a background electrolyte of 10 mM CaCl₂. Suspensions were shaken end-over-end for 1.5 h then phases separated by centrifugation at 23 000 g for 30 minutes. For soil B, an isotherm was obtained using various initial concentrations of toxin, whereas for the other soils a single concentration of Bt was used. Concentration of toxin in the equilibrium solution phase was measured as above. The amount of toxin adsorbed was calculated from the difference between initial and final solution concentration by ELISA quantification.

3. Results and Discussion

3.1. Extraction and quantification of Cry1Aa Bt toxin adsorbed on contrasted soils

For this study, initial Bt toxin concentrations ranging from 550 to 1100 ng g⁻¹ soil were consistent with the amount of toxin found in Bt-contaminated fields (Clark et al., 2005). To quantify Bt toxin, several methods have been proposed including bioassays and immunological detection. Both present advantages and drawbacks. Indeed, while bioassays provide a measurement of the active toxin and do not require an extraction step, they are expensive, time consuming, subject to matrix effects and results may be poorly reproducible. In contrast, ELISA technique is a sensitive analysis method that provides more quantitative results; however it requires an extraction step (Clark et al., 2005). In our study, we chose to use ELISA detection because of its reproducibility and low detection limit (4 µg l⁻¹). We optimised extraction, which is the critical step. We developed a new extractant based on that proposed by Palm et al. (1994) often adopted for environmental matrices, with a high salt concentration, high pH and containing a surfactant, Tween 20 (Palm et al., 1994). However, this extractant gives low and variable yields from soil (from 27 to 60%), depending on soil type, and background interferences (Palm et al., 1994). We modified this extractant by adding a large

concentration of bovine serum albumin protein (BSA), more than the adsorption capacity of the soil. This modification increased the extraction yield from 10 to 68% for a clayey soil. Moreover, the extraction had the advantage of not been soil dependant (clay and organic matter contents) with excellent reproducibility between soils (average yield of 61.2 ± 5.3 %) and there was no interference due to the soil matrix in the ELISA detection.

3.2. Evolution of Cry1Aa Bt toxin in soil with time

3.2.1. Effect of soil properties and pH changes on Bt-protein persistence in soil

Figure 4-1 shows the decrease in extractable immuno-reactive Bt toxin incubated in each of the four soils over a period of 4 months. For each soil, a rapid decline of the amount of extractable toxin during the first 14 days was observed with a decrease of $86.2 \pm 7.5\%$ of the initial value, followed by a slower decrease. Similar non linear declines of Bt toxins, both extractability and toxicity of adsorbed protein, have been reported for various other soils (Ahmad et al., 2005; Palm et al., 1996; Sims and Holden, 1996b; Wang et al., 2006; Zwahlen et al., 2003a). All the protein may be assumed to be in the adsorbed state, since none was detectable in solution when the same level was added to soil in suspension (data not shown). Marked differences between soils were observed during the first month of incubation, indicating that physicochemical properties or microbial activity of soil influence Bt persistence. It is well known that proteins react with the organo-mineral surfaces of soils and clay minerals are often reported to play a dominant role because of their large specific surface area and surface charge. In the case of Bt toxin, Stotzky and coworkers have reported that the addition of clay minerals decreases the mobility and persistence of the protein, presumably due to strong adsorption (Icoz and Stotzky, 2007; Tapp and Stotzky, 1998). However there have not previously been many studies in which several contrasting soil have been compared. In this study, a greater proportion of toxin was extracted with a higher clay and organic matter content (Soil A). Results of preliminary extraction experiments indicate that differences between soils did not arise from soil-dependent extraction yields. Marchetti et al. (2007) also found a slower decline of two Cry toxins in clayey soil than in a sandy soils (Marchetti, 2007). One explanation of the slower decline of extractable immuno-reactive Bt toxin in the clayey soil (A) could be that the protein is protected from microbial degradation by adsorption (Kleber, 2007). We therefore used different strategies to modify the microbial activity of the soils and monitored the resulting effect on the persistence of Bt toxin.

Microbial activity in soil is pH-dependent and often has an optimum around pH 7 and this has been invoked to explain contrasting the insecticidal activity of Bt adsorbed on three different soils (Tapp and Stotzky, 1998). Acidifying by one or two pH units or alkalinising by one pH unit had little effect on the fate of Bt toxin in these soils (**Figure 4-6, Supporting Information**). The only observable effect was the decrease in extractable immuno-reactive Bt toxin when the clayey soils A and B were acidified. Since this effect was visible immediately, we conclude that it does not arise from changes in the microbial activity of the soil. A more likely explanation would be that the protein was precipitated at acid pH, as has been demonstrated using dynamic light scattering at higher protein concentrations (Helassa et al., 2009) and was not recovered by the extractant buffer.

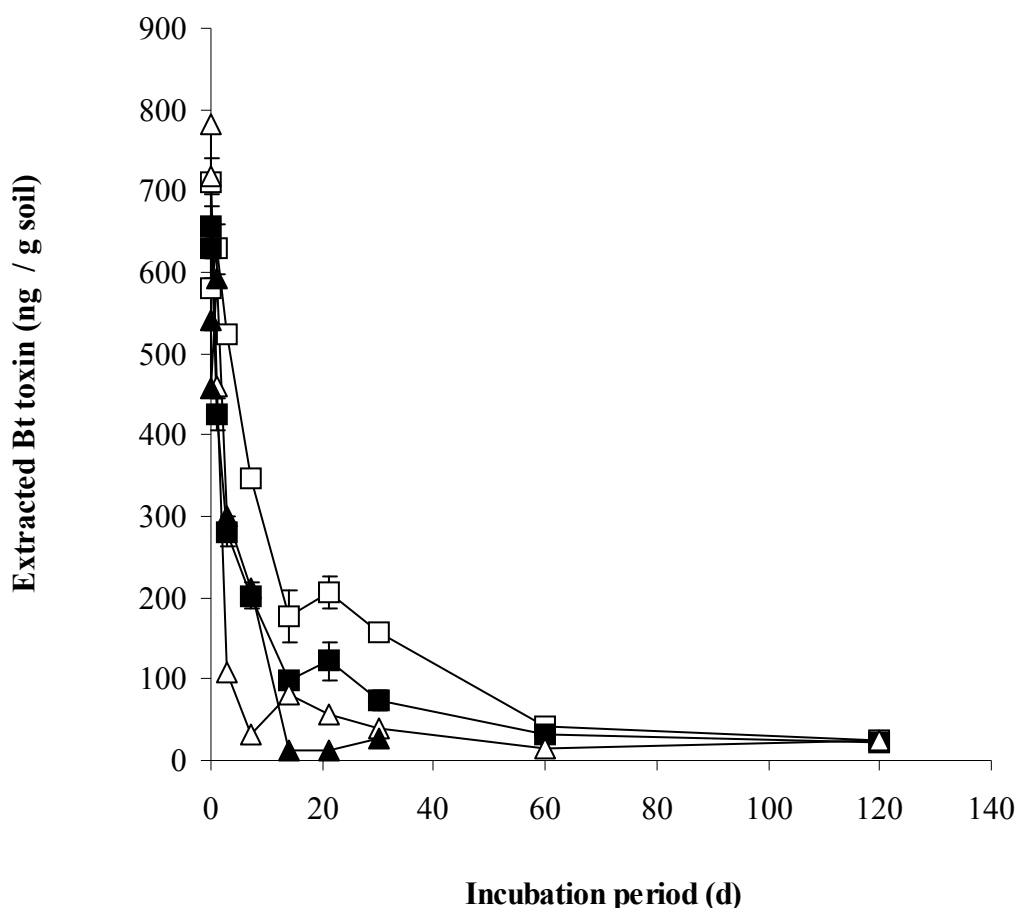


Figure 4-1. Persistence of Cry1Aa toxin as a function of incubation period, determined by ELISA after extraction, in four contrasting soils: soil A (□); soil B (■); soil R (△); soil T (▲). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error. For the soil T, the ELISA quantifications were stopped earlier because of the low level of toxin detected.

3.2.2. Enhancement of microbial activity and Bt-protein persistence in soil

A more direct method to influence microbial activity in soil is to add carbon substrates. Enhancement of microbial activity would result in a more rapid decline of extractable Bt toxin, if this were the determinant factor in the observed time trend. Small amounts of carbon, as glucose or amino acids (or both) were added as triggers for microbial activity (**Figure 4-2** for the clayey soil, A and **Figure 4-7** for all soils, **Supporting Information**), or a much larger amount of glucose (**Figure 4-8**, **Supporting Information**). For each of the soils there was no marked difference in the trends of persistence for any of the amendments. This is a strong indication that microbial activity was not responsible for the observed decrease in detection of Bt toxin. However, this conclusion contrasts with the few published studies of the role of microbial activity on Bt toxin persistence in soil. The earliest study, by Palm et al. (1996) reports that the amount of extractable Bt was greater in a γ -sterilized soil, although the both the control and treated samples did not exhibit the sharp decline observed in other experiments in the same study (Palm et al., 1996). More recently, Accinelli et al. (2008), found that the initial rate of mineralization of ^{14}C -labelled Bt protoxin was increased nearly 2-fold by addition of corn residue to stimulate microbial activity, although at the end of the 20-day incubation period the net difference was small (Accinelli et al., 2008). Only about 50% of Cry was lost as CO_2 whereas in comparable microcosm experiments, including

this one, more typical declines in detectable Bt toxin would be 90% (Icoz and Stotzky, 2007; Sims and Holden, 1996b).

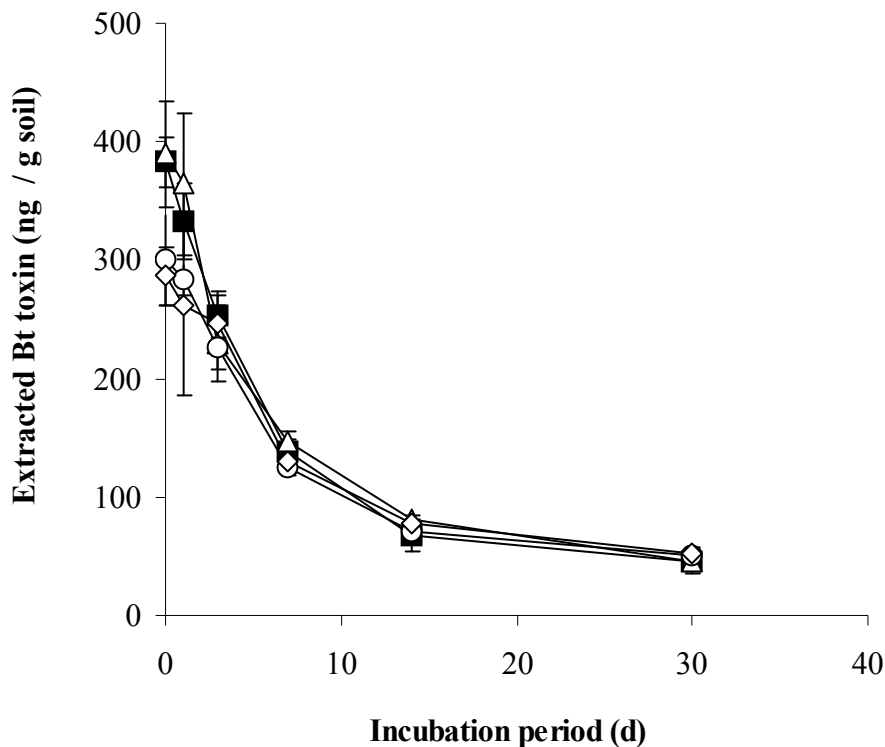


Figure 4-2. Effect of the stimulation of microbial activity by addition of carbon sources on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in a clayey soil, soil A. The carbon sources (0.2 mg C g^{-1} soil) were glucose (Δ), amino acids (\circ), or a mixture of glucose and amino acids (\diamond). The control soil, no carbon spike, is represented by (\blacksquare). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

3.2.3. Inhibition of microbial activity on Bt protein persistence in soil

Various methods can be used to inhibit microbial activity and they have varying efficiencies and side effects (Trevors, 1996). In a first trial, microbial activity was inhibited using mercuric chloride. This method merely inhibits microbial activity so there is no risk of chemical changes due to the liberation of intra-cellular compounds. There was no consistent difference between sterile and control soils, for any of the soils, and certainly no evidence that Bt toxins were degraded more rapidly in non-sterile soil (**Figure 4-9, Supporting Information**). It appeared that microbial activity was not the driving force for the decline in extractable Bt toxins in these soils. Since this result was surprising, other methods were used to inhibit or destroy microbial activity. Irradiation is considered to be an efficient method of soil sterilization that has limited effect on the chemical properties of soil, whereas autoclaving, while convenient, is known to be less efficient and causes cell lysis liberating nutrients that are readily available for surviving microorganisms. Temperature is often used to control microbial activity, but may change the extent of adsorption (see below) and the balance of physicochemical interactions between the protein and the soil surfaces. No large differences of

sterilization, autoclaving, or γ -irradiation were observed for any of the 4 soils (**Figure 4-3**). However, a slower decrease of the amount of extractable toxin was observed when microcosms were incubated at 4°C. Taken in isolation, this observation would have indicated that degradation was slower, in line with decreased microbial activity. However the contradiction with other methods of slowing microbial activity suggests another reason, as will be discussed in the following section.

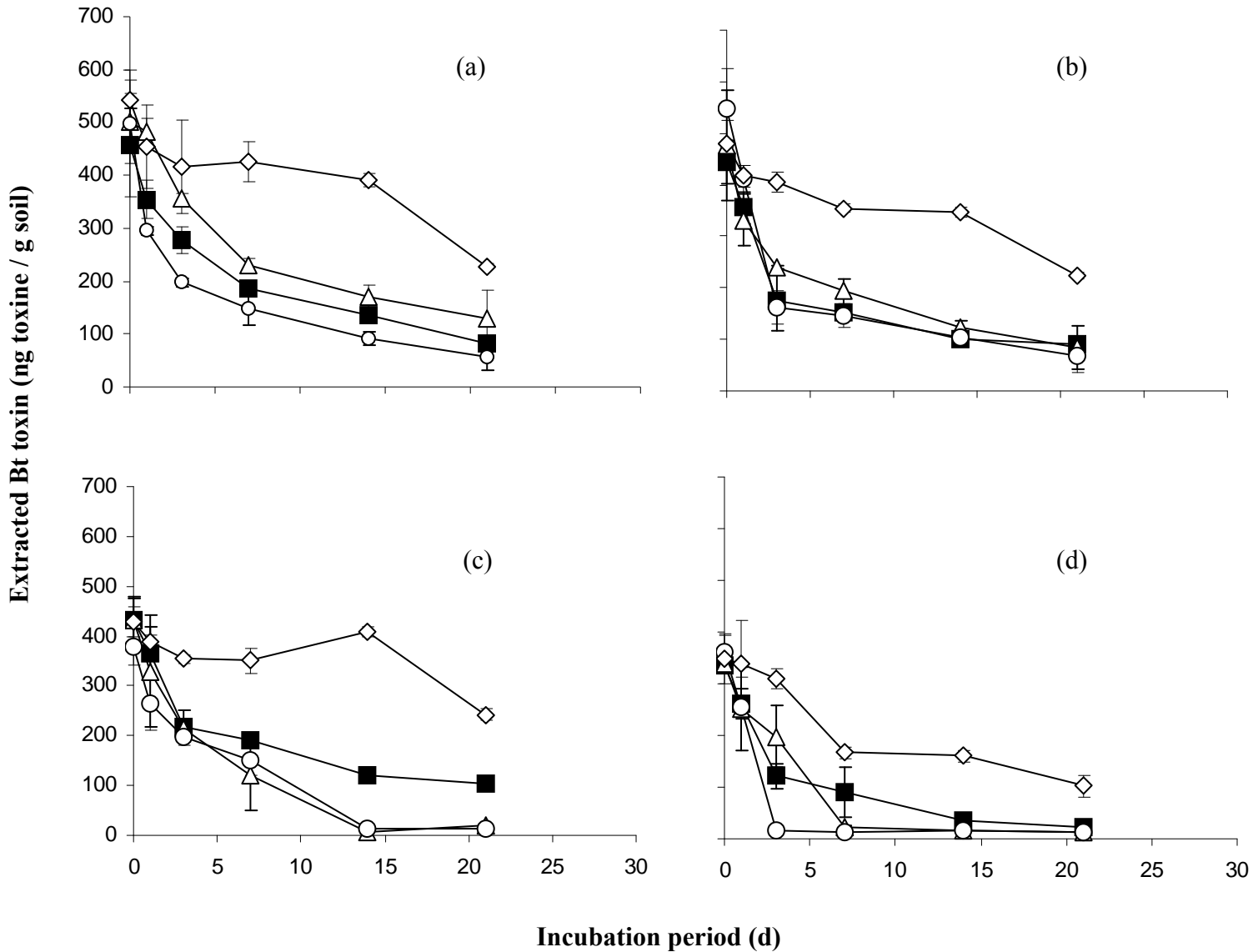
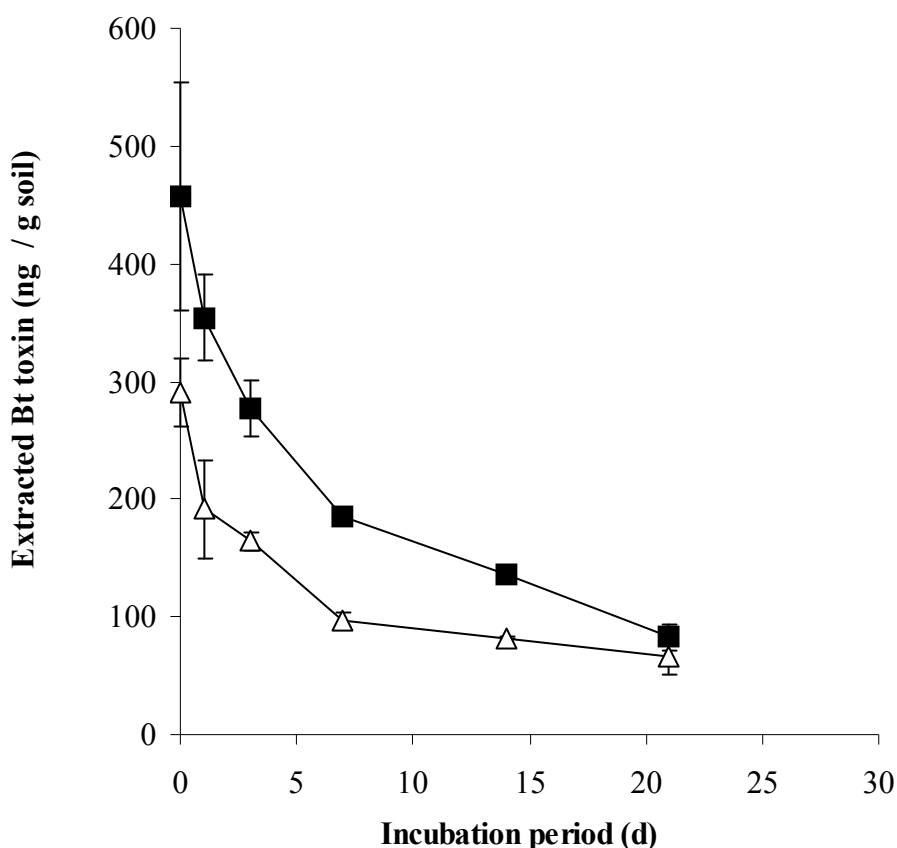


Figure 4-3. Effect of microbial activity inhibition using γ -irradiation (Δ), autoclaving (\circ) and incubation at 4°C (\diamond) on the persistence of Bt toxin in four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The control soil is represented by (\blacksquare). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

None of these techniques destroys or inhibits the catalytic activity of extra-cellular proteases. Therefore the effect of addition of an anti-protease cocktail on all of the above treatments was also studied. An example of the effect of protease inhibition is shown for soil A (a clayey soil) in **Figure 4-4** (and for all soils in **Figure 4-10, Supporting Information**). The inhibition of residual protease activity had no effect on

the sandy soils R and T, whatever the parallel treatment to inhibit microbial activity. However the addition of protease cocktail to the clayey soils, A and B, caused a decrease in immuno-reactive toxin visible at the start of the incubation. Preliminary experiments had shown that the anti protease cocktail did not interfere with the efficiency of the ELISA test. We therefore conclude that the cocktail modified the extraction yield. Similar effects (data not shown) were observed for the addition of antiprotease cocktail to the other soil treatments that inhibit microbial activity (γ -sterilization, autoclaving and refrigeration). There is no evidence that soil proteolytic activity determined the persistence of Bt toxin in soil.

Figure 4-4. Effect of microbial activity inhibition by addition of a commercial



antiproteases cocktail (\triangle), on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in a clayey soil, soil A with respect to the control soil (\blacksquare). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

3.2.4. *Decrease in extractable, immuno-reactive Bt toxin due to physicochemical changes*

Having found no evidence to support the hypothesis that the decline in extractable Bt toxin from soils was determined by the decay of the protein, we postulate that the observed trends were due to time-dependent interaction with soil surfaces. Two types of abiotic process may be hypothesized: (i) increased irreversibility of adsorption, namely

fixation, with time or (ii) time dependent changes in protein conformation so that the protein is no longer recognized by the antibody in the ELISA test.

Although it is not possible to study conformational changes in the adsorbed state on soil, time-dependent Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy has shown that Bt toxin unfolds on hydrophobic surfaces (Noinville et al., 2008, unpublished).

A comparison of the temperature effect on both adsorption and persistence adds further support to the hypothesis that observed trends are due to interactions with organo-mineral surfaces. Adsorption was found to be less at lower temperature for all the soils. The distribution coefficient (K_d , defined as the ratio of the adsorbed phase and equilibrium solution phase concentrations) at 4°C was found to be about half the value measured at 25°C (**Table 4-2, Supporting Information**). This trend was confirmed for soil B for a range of concentrations. Nearly linear adsorption isotherms were obtained at both temperatures, with larger slope at 25°C (38.8 l g⁻¹) than at 4°C (6.2 l g⁻¹) (**Figure 4-5**). This temperature dependence may be explained by the decrease in the contribution of hydrophobic interactions to adsorption at lower temperature (Haidacher et al., 1996). Chen et al. (2003) have shown that increasing temperature, albeit in a different range (from 20 to 60°C), induced the exposure of hydrophobic patches from the core of the protein (Chen et al., 2003). We postulate that because hydrophobic interactions are lesser at low temperature, the protein conserves a more native structure, recognized by the ELISA test, and may be less adsorbed increasing its extractability. These physicochemical processes would explain the observed slower decline of immunoreactive Bt toxin rather than slower microbial breakdown.

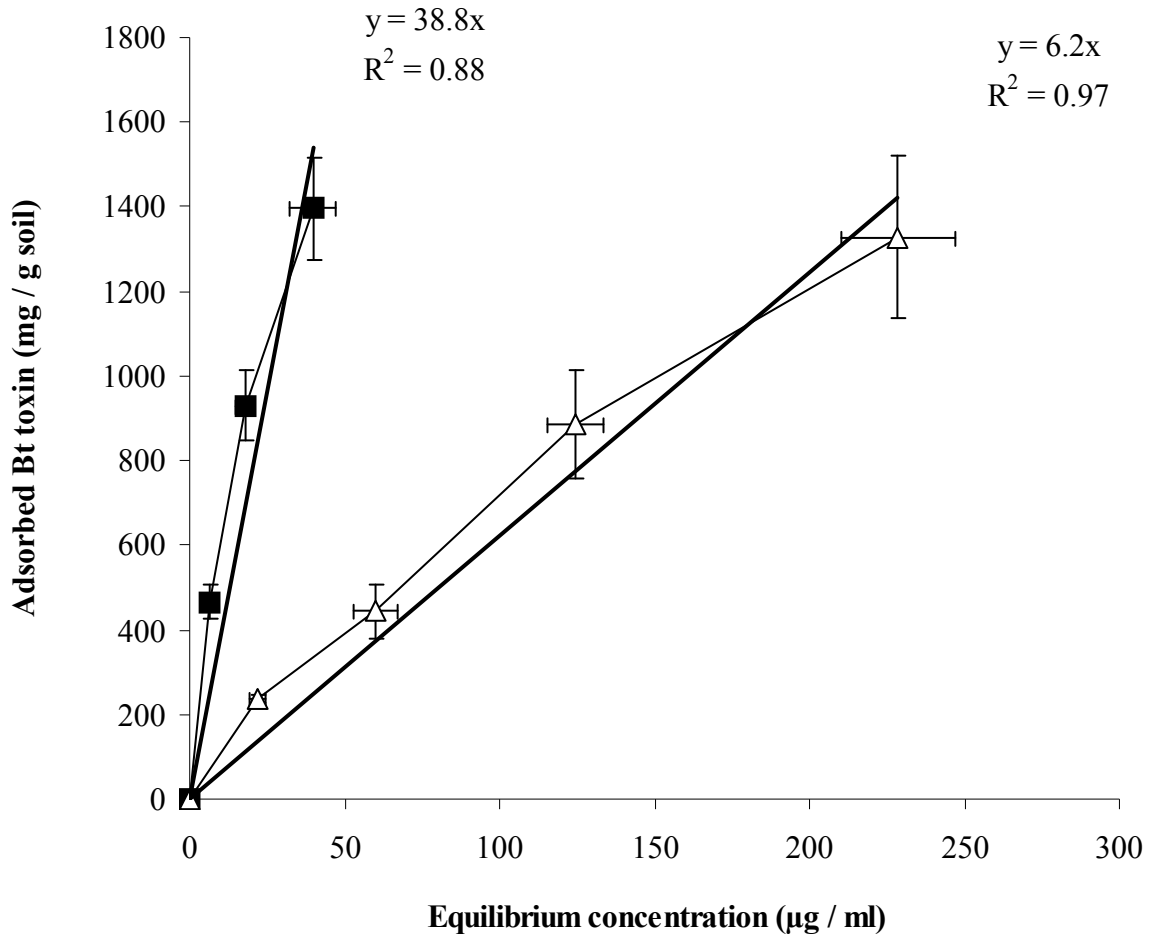


Figure 4-5. Effect of the temperature (25°C (■) and 4°C (△)) on the adsorption isotherm of trace amounts of Cry1Aa toxin on soil B.

The importance of hydrophobic interactions between Bt toxin and surfaces is illustrated by the strong interaction with hydrophobic surfaces, such as silanized silica. Large changes in the structure, monitored by FTIR spectroscopy, lead to an unfolding of α -helices to give β -sheeted structure (Staunton and Quiquampoix, 1994). Hydrophobic interactions occur in soil (Kleber et al., 2007). Clay minerals are usually considered to be hydrophilic surfaces, however when hydrophilic exchangeable cations are replaced by positively charged amino acids (lysine, arginine, and histidine) of proteins, a hydrophobic siloxane surface of contact is created (Staunton and Quiquampoix, 1994). Soil organic matter may considerably enhance hydrophobicity leading to macroscopic changes in soil properties (Doerr et al., 2007). Sandy soils are particularly prone to hydrophobicity as expressed by their frequent water repellency, because their smaller surface area is more easily saturated by hydrophobic organic molecules (Doerr et al., 2000).

In conclusion, Bt toxin can be efficiently extracted and immunologically detected from four contrasting soils. The amount of extractable, immunologically detectable Bt toxin declined rapidly over the first two weeks of incubation particularly in sandy soils. We conclude that this decline was determined by physicochemical processes and not by microbial breakdown of the adsorbed toxin. Further studies would be required to

investigate the part of chemical fixation and conformational changes once adsorbed, and its relationship with toxicity.

Acknowledgments

The research was funded by the Agence Nationale de la Recherche and a doctoral grant was awarded to N.H by the INRA and the Région Languedoc Roussillon and a travel bursary to A.M by the Tunisian Ministry of Higher Education. The authors thank M. Royer (CIRAD) for providing the Bt strain, W. Szponarski (INRA) for purification technique, and F.X. Sauvage (INRA) for protein analysis, INRA Narbonne for providing the fermentor, INRA proteomic platform for mass spectroscopy analyses and A. Martin-Garin (IRSN) for γ -sterilization of the soils.

Supporting Information

Additional experimental details and experimental data for all the four soils studied are given as Supporting Information.

Brief: Soil microcosm experiments suggest that physicochemical interactions rather than microbial activity determine the decline in detectable Bt toxin with time.

Supporting Information

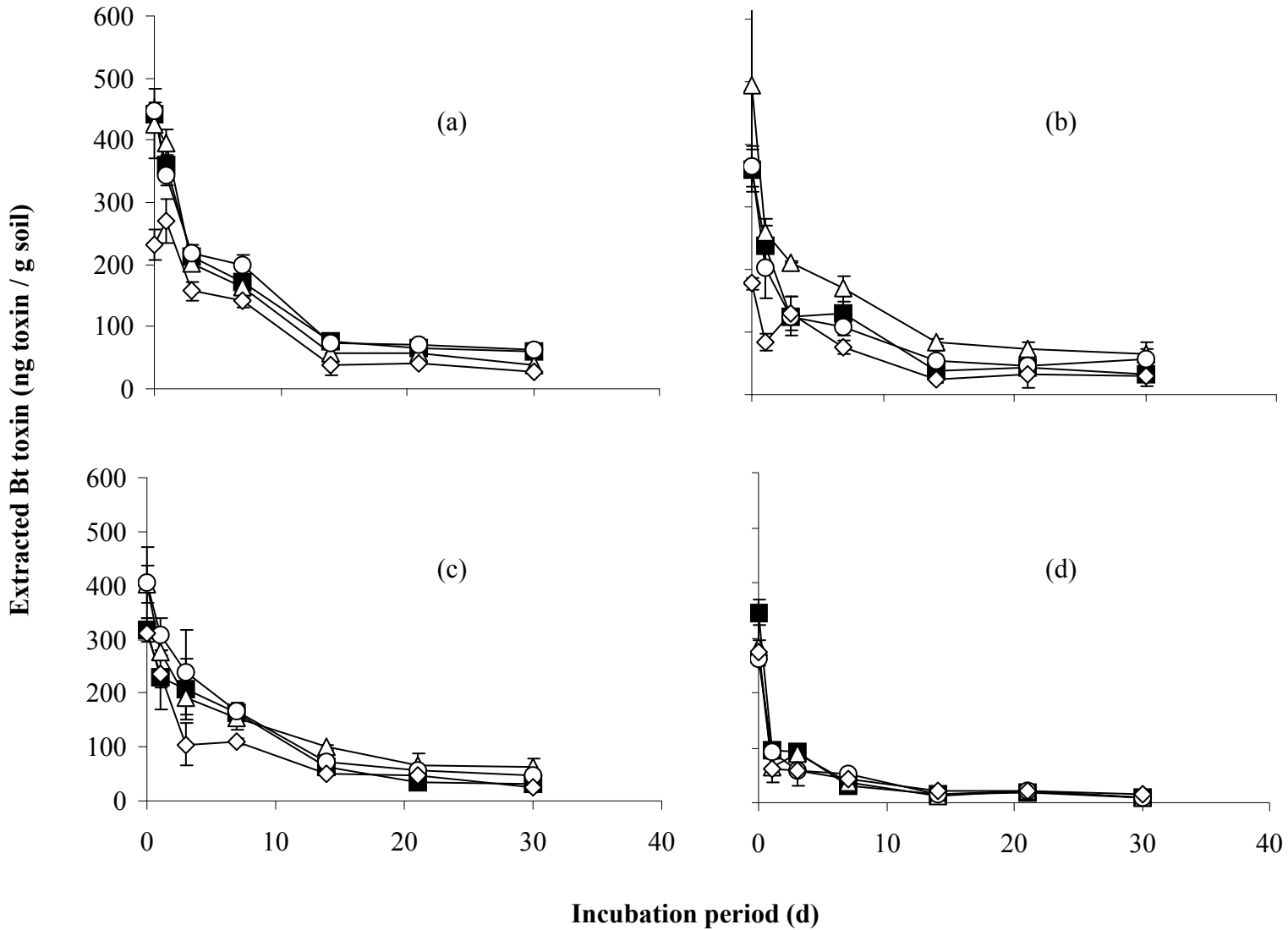


Figure 4-6. Effect of pH changes on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period for each of the four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The pH was decreased by one (○) or two units (◇) by hydrochloric acid, or increased by one unit (△) by potassium carbonate, or was unchanged, control soil (■). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

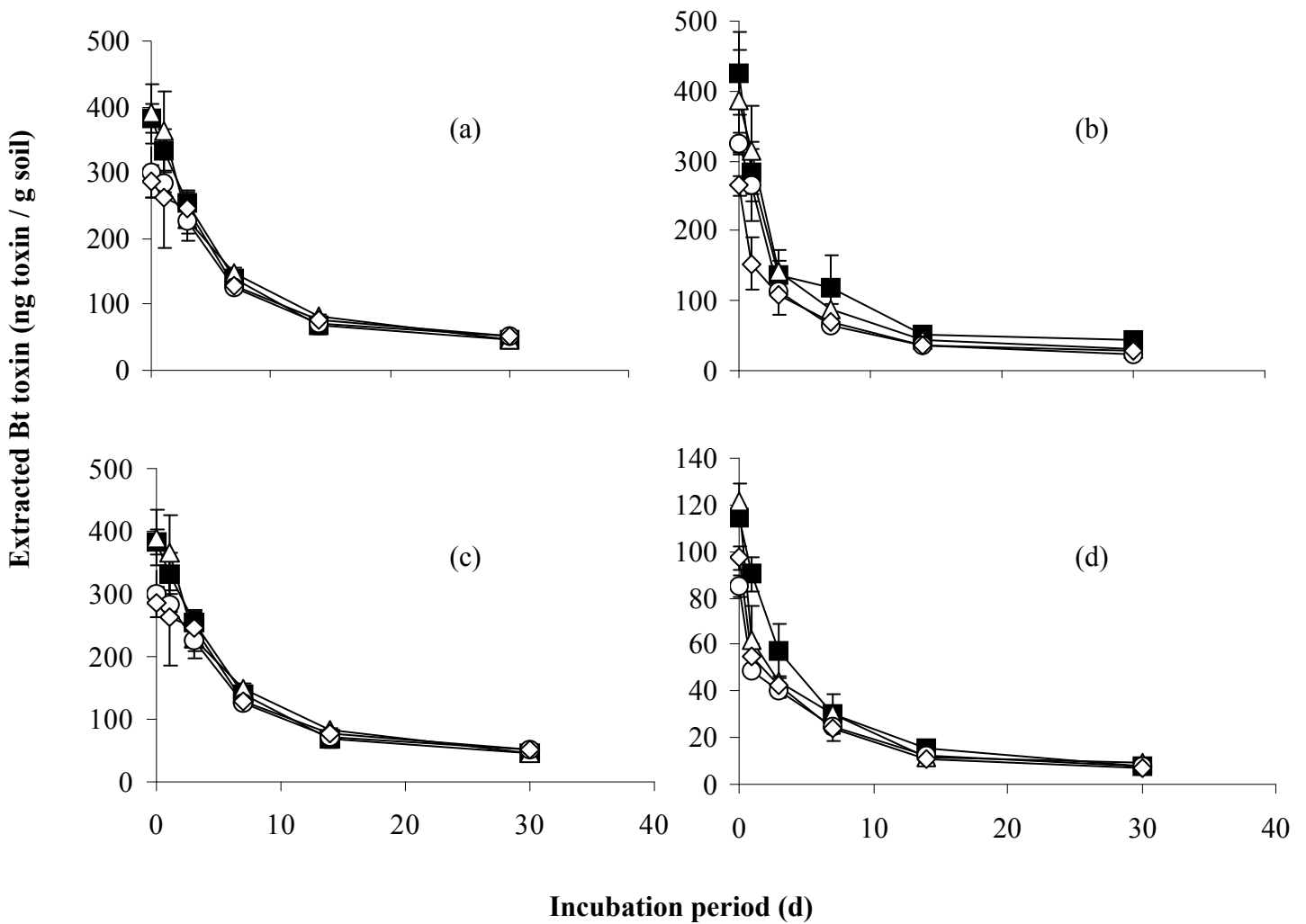


Figure 4-7. Effect of the microbial activity stimulation by addition of carbon sources on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period for each of the four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The carbon sources ($0.2 \text{ mg C g}^{-1} \text{ soil}$) were glucose (\triangle), amino acids (\circ), or a mixture of glucose and amino acids (\diamond). The control soil, no carbon spike, is represented by (\blacksquare). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

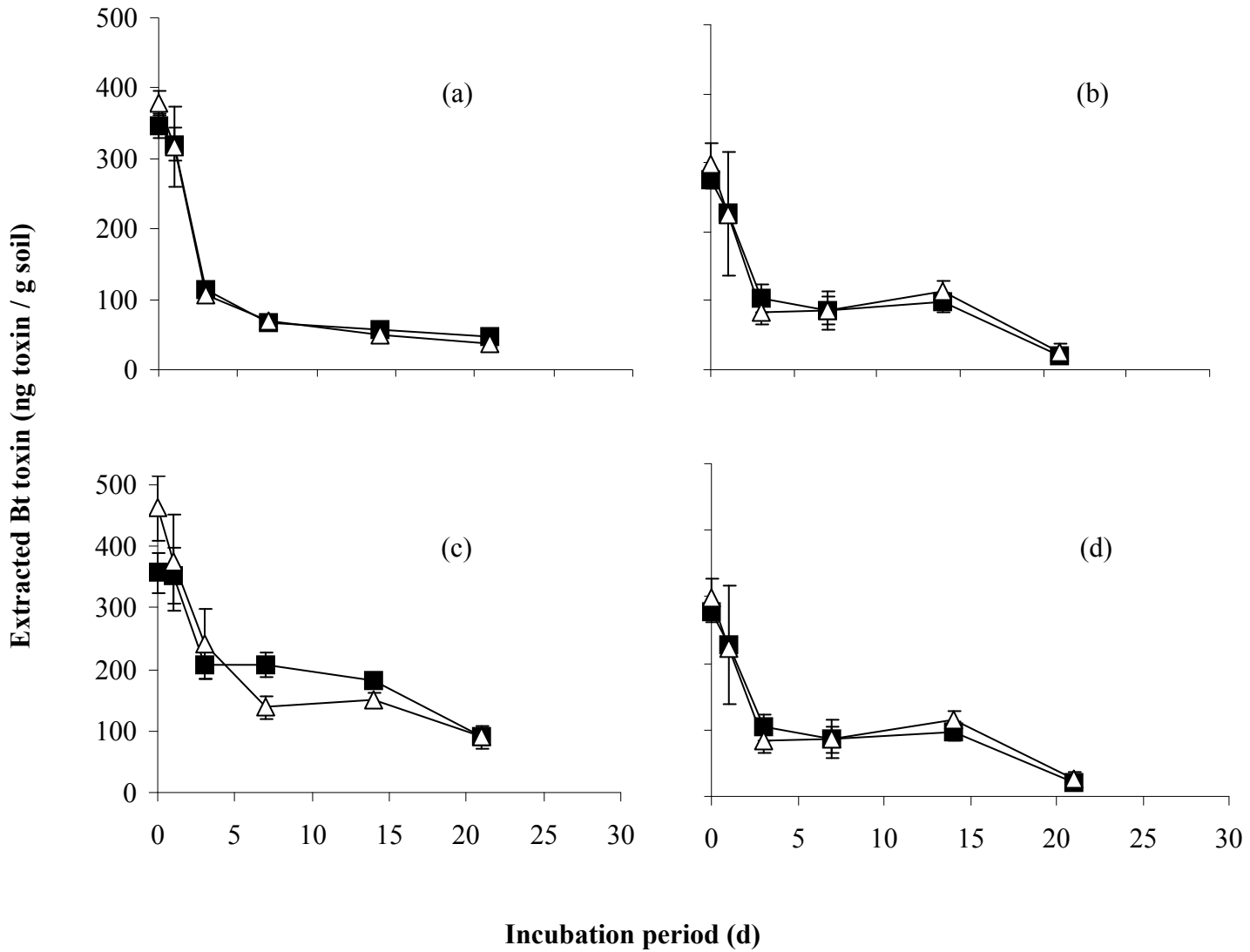


Figure 4-8. Effect of the stimulation of microbial activity by addition of a larger concentration of glucose (2 mg C g⁻¹ soil) (△) on the persistence of Bt toxin in four contrasted soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d) , compared to the control soil (■). The data are expressed as the mean of triplicates ± one standard error.

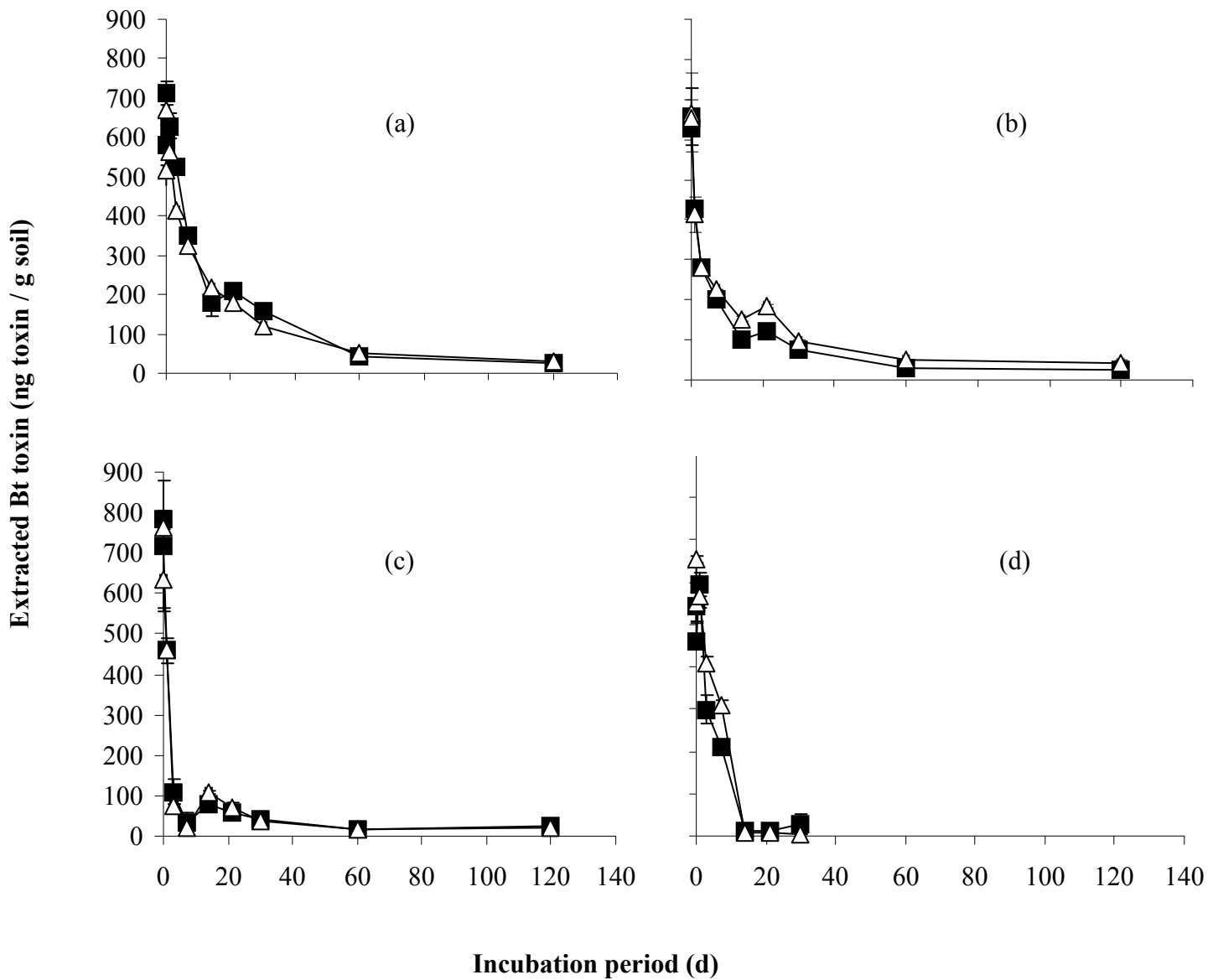


Figure 4-9. Effect of inhibition of microbial activity by addition of mercuric chloride ($500 \mu\text{g g}^{-1}$ soil) (\triangle) compared to the control soil (\blacksquare) on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

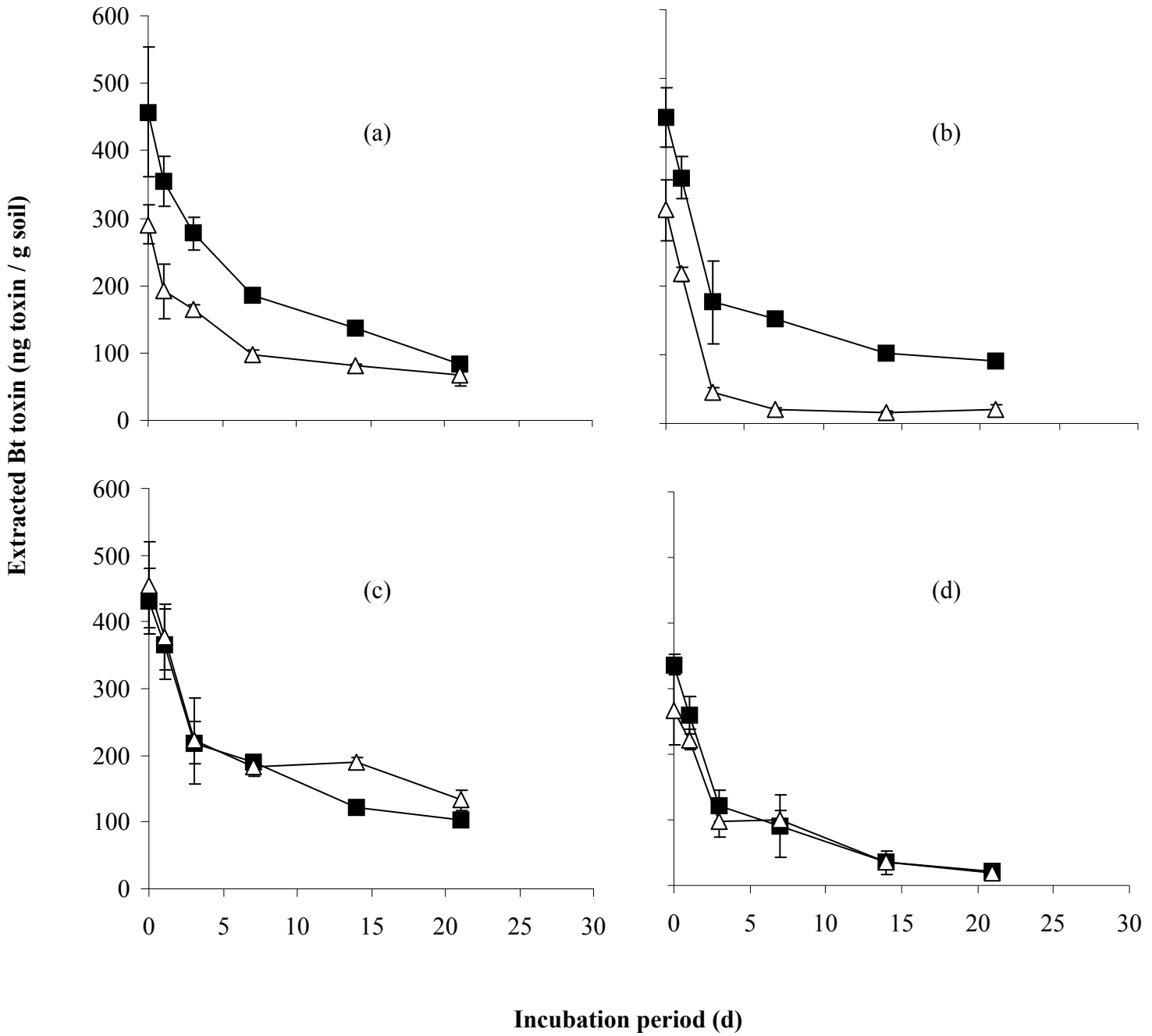


Figure 4-10. Effect of inhibition of microbial activity by addition of a commercial antiproteases cocktail (\triangle) compared to the control soil (\blacksquare), on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.

For the soil T, the ELISA quantifications were stopped earlier because of the low level of detectable toxin.

Table 4-1. Some physicochemical properties of the soils studied.

Soil	Depth (cm)	Clay (g kg ⁻¹)	Silt (g kg ⁻¹)	Sand (g kg ⁻¹)	C _{org} (g kg ⁻¹)	pH (water)	CEC (mmol _c kg ⁻¹)	Localisation	USDA Classification
A	Topsoil	357	412	203	55.7	7.2	322	Banbury (UK)	Clay Loam
B	Subsoil	345	397	207	17.6	7.8	235	Banbury (UK)	Clay Loam
R	0-25	157	160	683	13.5	6.2	79	Marcoule (France)	Sandy Loam
T	30-60	73	72	855	2.2	7.5	-	Marcoule (France)	Sandy

Table 4-2. Distribution coefficients, K_d, of a trace amount of Bt toxin in four contrasting soils at two different temperatures: 25°C and 4°C.

	K _d (l kg ⁻¹)	
	25°C	4°C
soil A	2315	1123
soil B	23515	10867
soil R	14549	7352
soil T	11871	8593

CHAPITRE 5.

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DE LA TOXINE BT EN PRESENCE DE SOL

CHAPITRE 5. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DE LA TOXINE BT EN PRESENCE DE SOL

1. Introduction

Bacillus thuringiensis (*Bt*) est une bactérie Gram positive, naturelle des sols, capable de produire lors de sa sporulation, des inclusions de cristaux protéiques. Ces corps parasporaux sont essentiellement composés de une ou plusieurs protéines cristales (Cry) et cytolytiques (Cyt) (Höfte and Whiteley, 1989). Les protéines Cry sont des δ -endotoxines synthétisées sous forme de protoxines d'environ 70 kDa ou 130 kDa, activées en toxine de 66-67 kDa par digestion enzymatique, après solubilisation dans l'intestin de l'insecte cible (Bravo et al., 2007). Appartenant à la classe des PFT (Pore-Forming Toxin), elles sont capables, après liaison aux récepteurs membranaires des cellules intestinales, de former un pore transmembranaire, induisant la mort de l'insecte cible par lyse cellulaire (Parker and Feil, 2005; Wolfersberger, 1990).

De par ses propriétés entomotoxiques, *Bt* est utilisé en France depuis plus de 70 ans en lutte biologique. Cependant, les formulations commerciales sont rapidement dégradées par les UV (Griego and Spence, 1978; Icoz and Stotzky, 2008) et ne sont pas efficaces contre les insectes foreurs. L'utilisation de *Bt* en tant qu'insecticide connaît un énorme essor depuis l'incorporation du gène de la toxine dans les plantes (Clark et al., 2005; Lord, 2005; Romeis et al., 2006). Cette transformation génétique confère aux plantes une résistance systémique contre les insectes ravageurs, y compris les foreurs. Ainsi, la culture de plantes Bt dans le monde a fortement augmenté, représentant en 2007 environ 46 millions d'hectares (James, 2007).

Ces plantes génétiquement modifiées relâchent la toxine dans les sols par exsudation racinaire et dégradation des tissus végétaux (Saxena et al., 1999; Saxena et al., 2004; Saxena and Stotzky, 2000; Stotzky, 2004; Zwahlen et al., 2003a). Cependant, le devenir de la protéine insecticide Bt dans le sol n'est pas clairement établi. Une étape clé dans l'étude de ce devenir consiste à disposer d'une méthode de détection de la toxine *in situ*. A ce jour, les méthodes de détection de xénobiotiques dans le sol (e.g. pesticides et pathogènes) sont basées sur une extraction chimique suivie d'une analyse moléculaires ou biochimiques (Fenoll et al., 2005; Kaestli et al., 2007; Li et al., 2001c; Li et al., 2008; Natividad et al., 2008; Orejuela and Silva, 2005; Wang et al., 2008).

Pour la toxine Bt, seuls les biotests utilisant des larves d'insectes permettent une détection de la toxine en présence de sol sans extraction préalable. Cependant, cette technique reste coûteuse, longue et peu reproductible compte tenu des variations que l'on peut observer avec du matériel vivant (Clark et al., 2005). Une autre technique souvent utilisée repose sur une détection immunologique de type ELISA. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible, quantitative et reproductible (Clark et al., 2005). Cependant, elle requiert une extraction chimique préalable dont l'efficacité varie suivant les caractéristiques physicochimiques des sols (Palm et al., 1994). Dans le Chapitre 2, Nous avons proposé des améliorations de cette extraction (Tween 20 et Triton X-100) qui diminuent la variabilité de l'efficacité d'extraction entre sols contrastés. Néanmoins, cette étape demeure une source d'artefact potentiel.

Une avancée majeure consisterait alors à élaborer une méthode de détection *in situ* de la toxine qui soit à la fois fiable, quantitative, reproductible, en présence de particules de

sol. Pour maximiser la spécificité de la méthode, nous avons choisi de travailler avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine étudiée, Cry1Aa. Le défi de cette détection immunologique en présence de sol vient de l'adsorption non spécifique des anticorps, eux-mêmes protéines ayant donc tendance à adsorber sur les surfaces organo-minérales. Deux approches indépendantes basées sur la spectroscopie de fluorescence ont alors été développées (**Figure 5-1**).

La première technique, le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), est basée sur un transfert d'énergie entre un fluorophore donneur et un accepteur. L'utilisation de cette technique est très originale puisque à ce jour, son exploitation se limite principalement à l'étude des interactions protéine-protéine au niveau cellulaire et des changements de conformation (Li et al., 2001a; Schuler and Eaton, 2008). Dans notre cas, les fluorophores donneur et accepteur sont couplés à 2 anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa. Comme le transfert décroît très rapidement avec la distance, seules les molécules très proches peuvent entrer en résonance. Ainsi, la probabilité de détecter un transfert d'énergie non spécifique, comme une adsorption des anticorps sur les surfaces de sol, est quasi-nulle.

Une méthode alternative, qui permet aussi de s'affranchir de l'adsorption non spécifique, consiste à saturer les sites d'adsorption de la protéine avec une autre protéine telle que l'albumine de sérum de bœuf (BSA), protéine possédant une très forte affinité pour les surfaces.

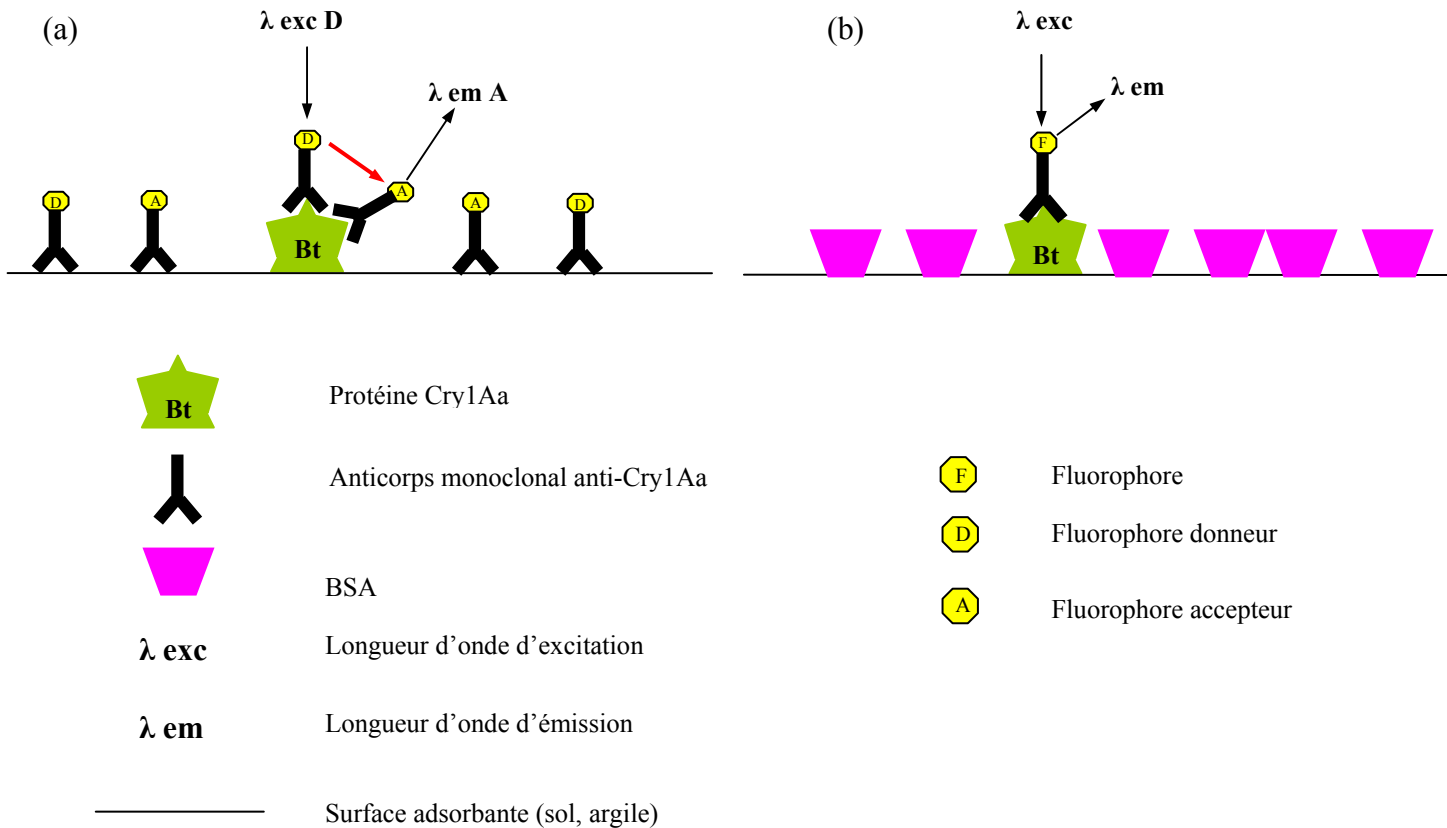


Figure 5-1. Représentations schématiques des approches envisagées pour la détection spécifique de la toxine Bt *in situ* par un ou deux anticorps monoclonaux fluorescents, basées sur :

(a) Le FRET

(b) La présaturation des surfaces

Les poids moléculaires de la protéine Cry1Aa, de la BSA et de l'anticorps sont respectivement de 66 kDa, 66 kDa et 150 kDa.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Sols et argiles

Dans cette étude, quatre sols contrastés et deux argiles de référence ont été utilisés. Les quatre sols provenaient de France et du Royaume-Uni ont été séchés à l'air et tamisés à 200 μm . Ces sols possèdent des propriétés physicochimiques contrastées, principalement au niveau de leur teneur en argile et en matière organique (**Tableau 5-1**). Les sols A et B sont des sols argileux provenant d'horizons différents, et les sols R et T sont des sols sableux provenant de sites adjacents.

Aussi, les fractions argileuses ($\Phi < 2 \mu\text{m}$) de montmorillonite (Wyoming) et de kaolinite (St Austell) ont été obtenues après sédimentation puis ont été saturées en sodium. Ces fractions ont été stockées à 4°C sous forme de suspensions à 5 g l^{-1} et 65,3 g l^{-1} respectivement. Les surfaces spécifiques de la montmorillonite et de la kaolinite sont de 800 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ et 20 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, respectivement.

Tableau 5-1. Principales caractéristiques physicochimiques des sols étudiés

Sol	Profondeur (cm)	Argile (g kg ⁻¹)	Limon (g kg ⁻¹)	Sable (g kg ⁻¹)	C _{org} (g kg ⁻¹)	pH (eau)	CEC (mmol _c kg ⁻¹)	Localisation	Classification USDA
A	Horizon A	357	412	203	55.7	7.2	322	Banbury (UK)	Argilo-limoneux
B	Horizon B	345	397	207	17.6	7.8	235	Banbury (UK)	Argilo-limoneux
R	0-25	157	160	683	13.5	6.2	79	Marcoule (France)	Sablo-limoneux
T	30-60	73	72	855	2.2	7.5	-	Marcoule (France)	Sableux

2.2. Préparation et purification de la toxine Cry1Aa

La toxine Cry1Aa a été préparée et purifiée comme décrit précédemment (Helassa et al., 2009). Brièvement, les cristaux de protoxine ont été produits à partir d'une culture en fermenteur de la souche *Bt* var. *kurstaki* HD-1 génétiquement modifiée pour produire la protéine Cry1Aa. Ensuite, ils ont été solubilisés et activés en toxine par digestion trypsique. Enfin, la toxine obtenue a été purifiée sur colonne échangeuse d'anions et conservée à 4°C, dans un tampon CAPS 10 mM, NaCl 350 mM, pH 10,5. Le poids moléculaire (66 kDa) et l'identité de la toxine purifiée ont été respectivement vérifiés par SDS-PAGE et spectrométrie de masse (MALDI-TOF, Ultraflex II, Bruker). La concentration de la solution stock de toxine pure (25,5 g l⁻¹) a été déterminée à 277 nm considérant un coefficient d'extinction molaire de 82280 cm⁻¹ M⁻¹ calculé suivant la méthode de Edelhoich (Edelhoich, 1967; Pace et al., 1995).

2.3. Marquages fluorescents et enzymatiques des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa (FITC, phosphatase alcaline, cryptate d'Europium et d₂)

Onze anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa ont été produits par le plateau technique de production d'anticorps monoclonaux de l'INRA de Bordeaux après immunisation de souris par la toxine Cry1Aa entière. Après purification sur colonne d'affinité (protéine G, Amersham), ces anticorps ont été couplés à différentes molécules sondes pour permettre la détection de la toxine à l'état adsorbé.

Le marquage à la fluorescein isothiocyanate (FITC) (Pierce, référence 46110) a été réalisé pour les anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa 8.13, 9.7, 3.4 et 11.7. Pour le marquage à la phosphatase alcaline, l'anticorps monoclonal anti-Cry1Aa 9.7 a été d'abord couplé à la biotine (Pierce, référence 21327), puis à la streptavidine-phosphatase alcaline (Pierce, référence 21324). Enfin, le marquage au cryptate d'Europium et au fluorophore d₂ (Cisbio International) ont été réalisés sur les anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa 9.7 et 8.13, respectivement. Tous les marquages ont été réalisés suivant les recommandations des fournisseurs respectifs.

Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont : 340 nm / 615 nm pour l'Europium, 650 nm / 665 nm pour le d₂ et 485 nm / 535 nm pour la FITC. Le substrat utilisé pour révéler l'activité phosphatase a été le BCIP / NBT (Sigma).

2.4. Digestion enzymatique des anticorps par la papaïne et SDS-PAGE

Afin de diminuer l'encombrement stérique des anticorps pour les expériences de FRET, l'anticorps 9.7 a été digéré par la papaïne à 37°C pendant 5 h et 22 h, suivant le protocole du fournisseur (Pierce, référence 20341). La concentration d'anticorps dans le milieu réactionnel était de 0,3 g l⁻¹. Aussi, une digestion avec une concentration

d'enzyme 10 fois supérieure aux recommandations du fournisseur, a été réalisée avec une nuit d'incubation.

Dés lors, les poids moléculaires des solutions de digestion ont été analysés par SDS-PAGE (Dual vertical Mini gel unit, CBS). Les échantillons ont été séparés sur un gel de polyacrylamide à 12,5 %, coloré au bleu de Coomassie R-250 and visualisé à l'aide de ImageScanner (Amersham Biosciences).

Une représentation schématique d'un anticorps avec son site de coupure à la papaïne est présentée en **Figure 5-2**.

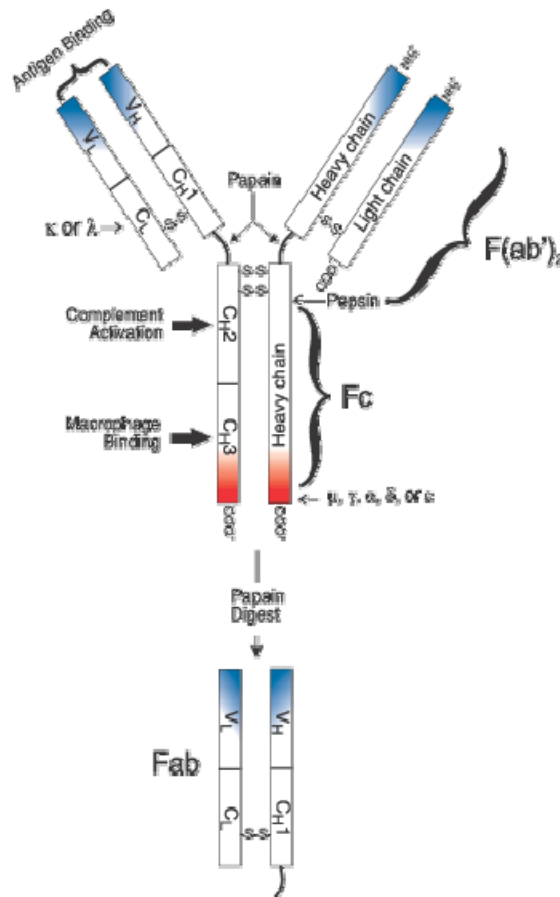


Figure 5-2. Représentation schématique d'une molécule d'anticorps (150 kDa) et de son produit de digestion par la papaïne (25 kDa). D'après Molecular Probes.

2.5. Sélection des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa

2.5.1. *Dot-blot utilisant un seul anticorps primaire anti-Cry1Aa (dot blot « classique »)*

Un microlitre de toxine Cry1Aa à 2,5 g l⁻¹ a été déposé sur un carré de membrane de nitrocellulose d'environ 1 cm² (Schleicher & Schuell, Optitran BAS83). Après séchage,

la membrane a été saturée par une solution de blocage (tampon Phosphate Buffered Saline (PBS)-lait 5 %) pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, la membrane a été lavée 3 fois avec PBS pendant 10 min puis incubée pendant 1 h avec un anticorps primaire (anticorps monoclonal anti-Cry1Aa) dilué par un facteur de 1:1000 dans la solution de blocage. Après lavage au PBS, la membrane a été alors incubée avec l'anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline (anticorps polyclonal anti-souris, Sigma, référence A3562). Après lavage au PBS, l'activité enzymatique phosphatase a été révélée par l'addition du substrat BCIP / NBT (**Figure 5-3**). Un témoin négatif a été réalisé dans les mêmes conditions mais en utilisant de l'eau à la place de la solution de toxine.

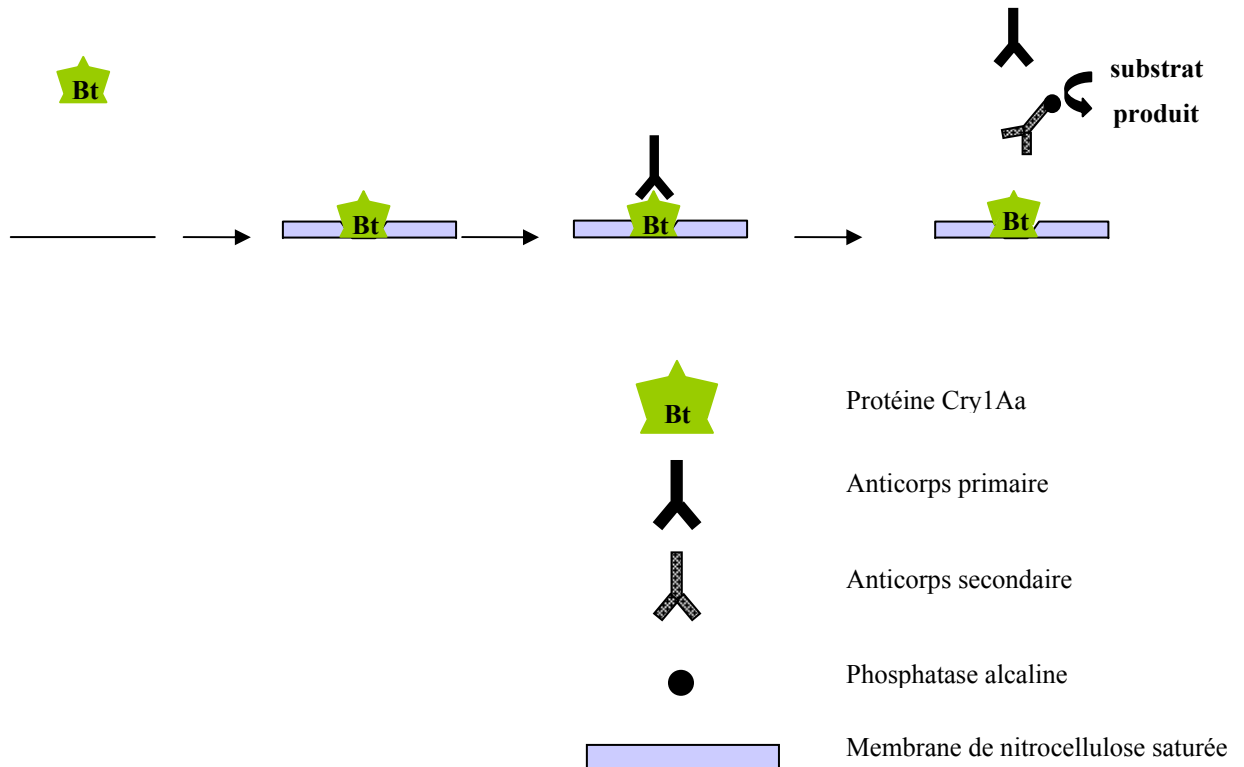


Figure 5-3. Représentations schématiques des dot-blot réalisés pour la sélection des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa.

Les poids moléculaires de la protéine Cry1Aa et des anticorps sont respectivement 66 kDa et 150 kDa.

2.5.2. Dot-blot utilisant deux anticorps primaires anti-Cry1Aa (dot blot « modifié »)

Deux stratégies, inspirées du dot-blot « classique », ont été développées afin de définir un couple d'anticorps primaires anti-Cry1Aa possédant des épitopes différents, et sont présentées schématiquement en **Figures 4a** et **4b**.

La première stratégie consistait à fixer l'anticorps primaire comme précédemment, sauf que ce dernier n'a pas été immédiatement révélé. En effet, la membrane a été ensuite incubée avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase (anticorps polyclonal anti-souris, Amersham, NA931). Après lavage, la membrane a été alors incubée avec un deuxième anticorps primaire (anti-Cry1Aa), lavée, et incubée avec

l'anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline. Et, c'est cette activité phosphatase qui a été révélée par l'addition de BCIP / NBT (**Figure 5-4a**).

La deuxième approche consiste à fixer le premier anticorps primaire anti-Cry1Aa, puis utiliser un deuxième anticorps primaire anti-Cry1Aa (9.7) marqué par la phosphatase alcaline (voir paragraphe 2.4). Le protocole a été identique à celui d'un dot blot « classique » (voir paragraphe 2.6) sauf que l'anticorps secondaire anti-souris a été remplacé par un deuxième anticorps primaire anti-Cry1Aa marqué à la phosphatase alcaline (voir paragraphe 2.4), pour la révélation de l'activité enzymatique (**Figure 5-4b**).

Un témoin négatif a été réalisé dans les mêmes conditions mais en utilisant de l'eau à la place de la toxine.

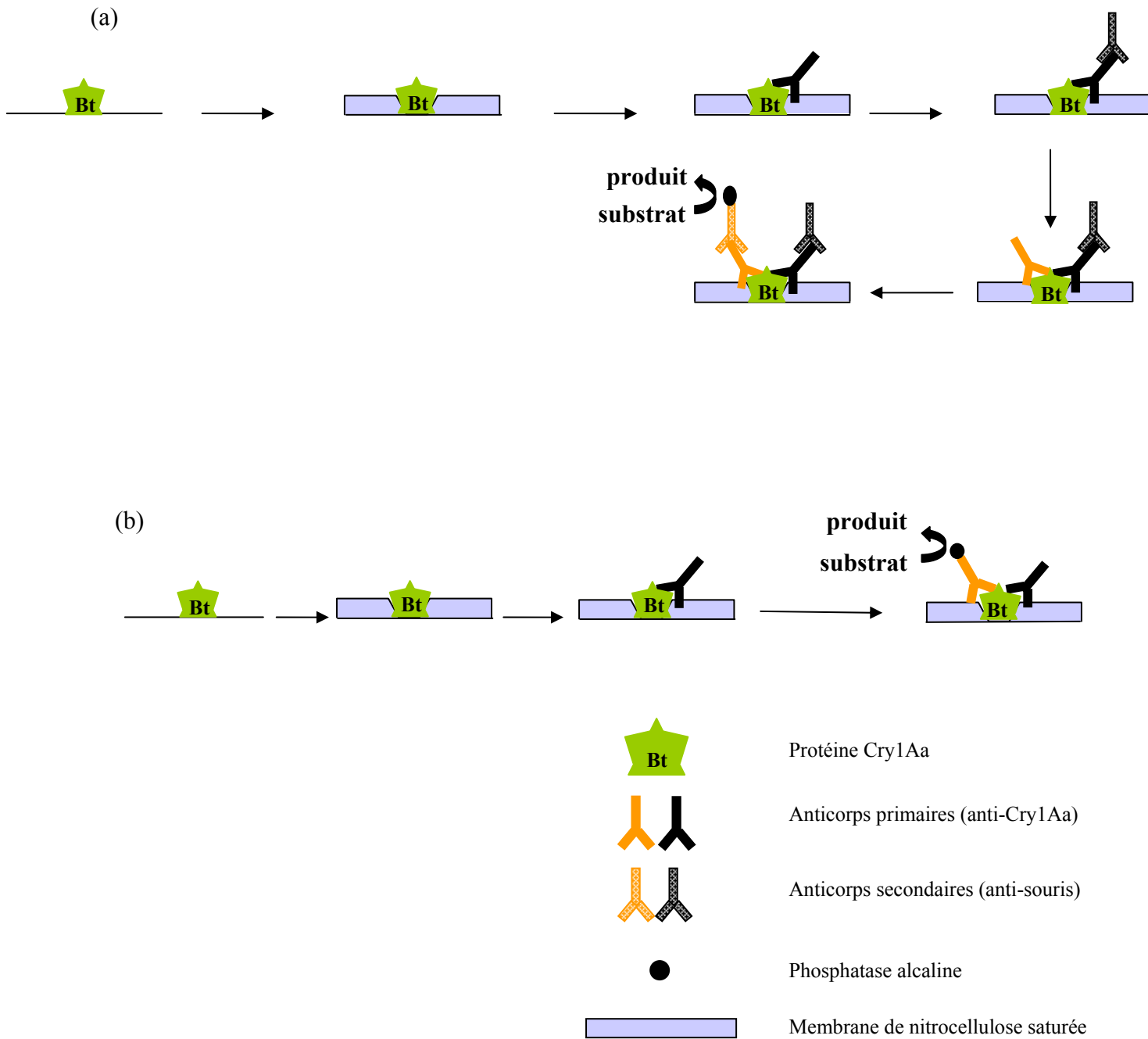


Figure 5-4. Représentations schématiques des dot-blot réalisés pour la sélection d'un couple d'anticorps compatible avec la technique TR-FRET utilisant (a) un anticorps secondaire anti-souris marqué ou (b) un anticorps primaire marqué. Les poids moléculaires de la protéine Cry1Aa et des anticorps sont respectivement de 66 kDa et 150 kDa.

2.6. TR-FRET

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est une technique qui utilise 2 fluorophores, un donneur et un accepteur, possédant des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence qui se chevauchent. Ainsi, l'excitation du donneur induit un transfert d'énergie à l'accepteur si celui-ci est suffisamment proche. En retour, l'accepteur émet à une longueur d'onde donnée. Afin de palier à l'autofluorescence de l'échantillon, nous avons choisi de travailler en temps résolu (TR-FRET) en utilisant des fluorophores à très longues demi-vie de fluorescence (msec au lieu μ sec), les lanthanides. Dans notre cas, les fluorophores utilisés ont été ceux de la technologie HTRF[®] (cryptate d'Europium comme donneur, d_2 comme accepteur). Ainsi, une mesure de l'émission de fluorescence après un court délai permet de s'affranchir de l'autofluorescence du sol tout en conservant un signal spécifique et intense (**Figure 5-5**).

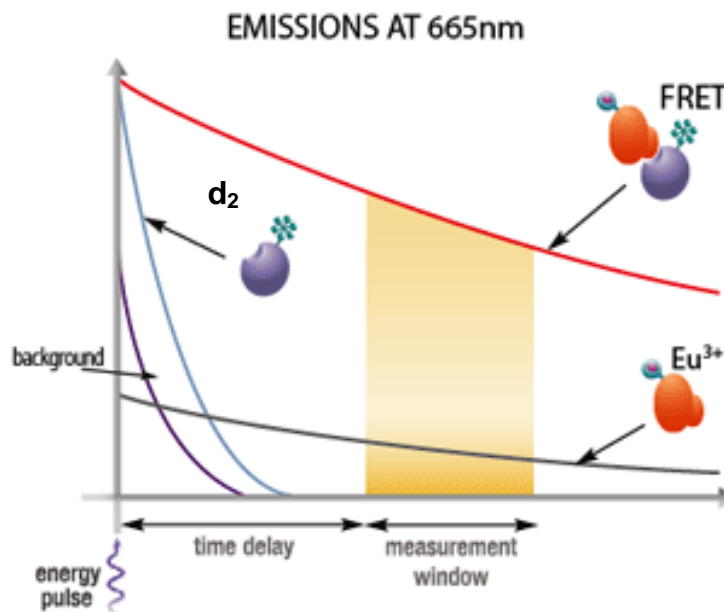


Figure 5-5. Un délai de 50 à 150 μ sec entre l'excitation et la mesure d'émission de fluorescence permet d'éliminer les fluorescences non spécifiques.

D'après www.htrf.com

Les spectres d'excitation et d'émission de l'euporium sont présentés en **annexe**.

2.7. Présaturation des surfaces argileuses

Une saturation des surfaces de montmorillonite et de kaolinite a été réalisée afin d'éviter une adsorption non-spécifique des anticorps anti-Cry1Aa servant à la détection de la toxine adsorbée. Cette étape consiste, à l'aide d'une quantité importante d'une autre protéine (BSA), à occuper les sites d'adsorption de la surface. Cette présaturation a été réalisé dans 4 conditions de pH différentes (eau, CaCl_2 20 mM pH 6,4 ; phosphate de sodium 20 mM pH 7; acétate de sodium 20 mM pH 4,5) avec une concentration de BSA de 100 mg l^{-1} et d'argile de 0,1 g l^{-1} pour la montmorillonite et 4 g l^{-1} pour la kaolinite. La suspension a été alors agitée par retournement pendant 30 min à 25°C puis

centrifugée 30 min à 23000 g. Dès lors, le dosage de la quantité de BSA restant dans le surnageant par le réactif de Bradford a permis de calculer la quantité adsorbée.

2.8. Détection par des anticorps monoclonaux fluorescents anti-Cry1Aa de la toxine à l'état adsorbée

2.8.1. Sur des surfaces argileuses (montmorillonite et kaolinite)

Dans un premier temps, des tests préliminaires ont été réalisés pour vérifier la non-adsorption des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa sur un culot d'argile présaturé (voir paragraphe 2.7). Pour ce faire, 500 μL d'une solution d'anticorps marqués à la FITC à environ 0.5 mg l^{-1} (préparé dans de l'eau) ont été ajoutés au culot présaturé. Après homogénéisation et mise en contact pendant 30 min à température ambiante, la suspension a été centrifugée pendant 30 min à 23000 g. Enfin, le dosage du surnageant par fluorescence à 485 nm / 535 nm a permis de déterminer la proportion d'anticorps adsorbée. La même expérience a été réalisée sur un culot d'argile non présaturé, à pH 7. Par ailleurs, l'ajout d'une quantité connue d'anticorps fluorescent est réalisé sur un surnageant de suspension d'argile, afin de déterminer l'effet de la matrice d'argile sur l'intensité de fluorescence. Les culots de montmorillonite et de kaolinite ont été préparés dans de l'eau à 0,1 g l^{-1} et 4 g l^{-1} respectivement.

Pour la détection de la toxine Cry1Aa à l'état adsorbé, une quantité connue de toxine a été tout d'abord adsorbée sur les surfaces de montmorillonite et kaolinite par retournement pendant 30 min à 25°C, à pH 7 (tampon phosphate de sodium 20 mM). La quantité de protéine adsorbée sur la surface était telle que le ratio Cry1Aa / anticorps marqué était environ égale à 1. La concentration de montmorillonite et de kaolinite était toujours de 0,1 g l^{-1} et 4 g l^{-1} , respectivement. Ensuite, après centrifugation, le culot a été lavé à l'eau pendant 30 min à 25°C puis centrifugé pendant 30 min à 23000 g. Le culot de toxine adsorbé a alors été mis en contact avec l'anticorps monoclonal anti-Cry1Aa marqué à la FITC, homogénéisé, incubé pendant 30 min à 25°C et centrifugé pendant 30 min à 23000 g. Enfin, le surnageant a été dosé en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la fluorescéine (485 nm / 535 nm). En comparant la différence de fluorescence initiale de l'anticorps avec celle dans le surnageant, la quantité de toxine détectée par l'anticorps fluorescent a été déterminée.

2.8.2. Sur des surfaces de sol

Des expériences préliminaires sur des sols ont permis d'évaluer l'autofluorescence et le quenching de fluorescence des échantillons d'une suspension de sol et du surnageant de cette suspension (centrifugation pendant 30 min à 23000 g). Ces suspensions ont été préparés dans de l'eau et dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7, à la concentration de 100 g l^{-1} .

Tous les dosages fluorescents ont été réalisés en microplaque noire Optiplate 96 (Perkin Elmer) avec un volume de 200 μL et lue dans un spectrofluorimètre (Victor 3, Perkin Elmer).

3. Résultats et Discussion

3.1. Sélection des anticorps monoclonaux « actifs »

Un test de la réactivité des onze anticorps monoclonaux vis-à-vis de la toxine Cry1Aa produit par le plateau technique de l'INRA de Bordeaux a permis de sélectionner 9 anticorps ayant conservé leur capacité à reconnaître la toxine. En effet, les anticorps 3.3, 11.13 et 12.1 n'interagissent plus avec l'antigène (**Figure 5-6**).

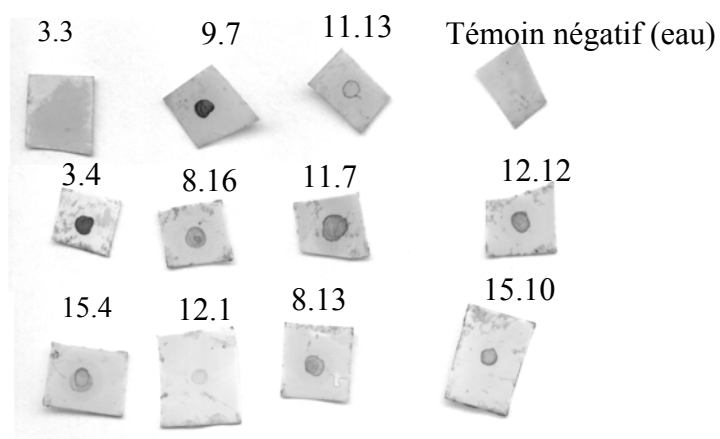


Figure 5-6. Sélection des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa par dot-blot

3.2. Détection immunologique par TR-FRET (HTRF®) de la toxine Cry1Aa adsorbée

3.2.1. Sélection du couple d'anticorps

Les expériences de FRET nécessitent 2 anticorps monoclonaux anti-Cy1Aa ayant des épitopes à la fois différents et proches. Pour sélectionner un couple d'anticorps à épitopes différents, deux stratégies ont été envisagées basées sur le principe des dot-blots.

Les résultats des expériences de dot-blot « modifié » avec une détection par un anticorps secondaire anti-souris, sont présentés en **Figure 5-7a**. L'hypothèse de départ est que l'anticorps secondaire anti-souris marqué à la phosphatase alcaline ne peut se fixer qu'au deuxième anticorps primaire. Ainsi, l'observation d'une activité phosphatase serait synonyme de la fixation des 2 anticorps primaires anti-Cry1Aa, et donc à épitopes différents.

Cependant, les témoins négatifs pour lesquels seulement un anticorps primaire a été utilisé et pour lesquels nous n'espérons pas de signal, sont positifs, au même titre que les quatre couples d'anticorps testés. De ce fait, le deuxième anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline n'est pas spécifique du deuxième anticorps primaire anti-Cry1Aa, mais peut malheureusement aussi bien se fixer sur le premier anticorps primaire anti-Cry1Aa.

De ce fait, une autre approche ne faisant pas intervenir d'anticorps secondaire mais un deuxième anticorps primaire (marqué à la phosphatase alcaline) a été développée. Ainsi, la révélation d'activité enzymatique phosphatase positive sera directement liée à fixation des deux anticorps primaires sur la protéine. Les résultats, présentés en **Figure 5-7b**, montrent un signal faiblement positif pour tous les couples d'anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa testés.

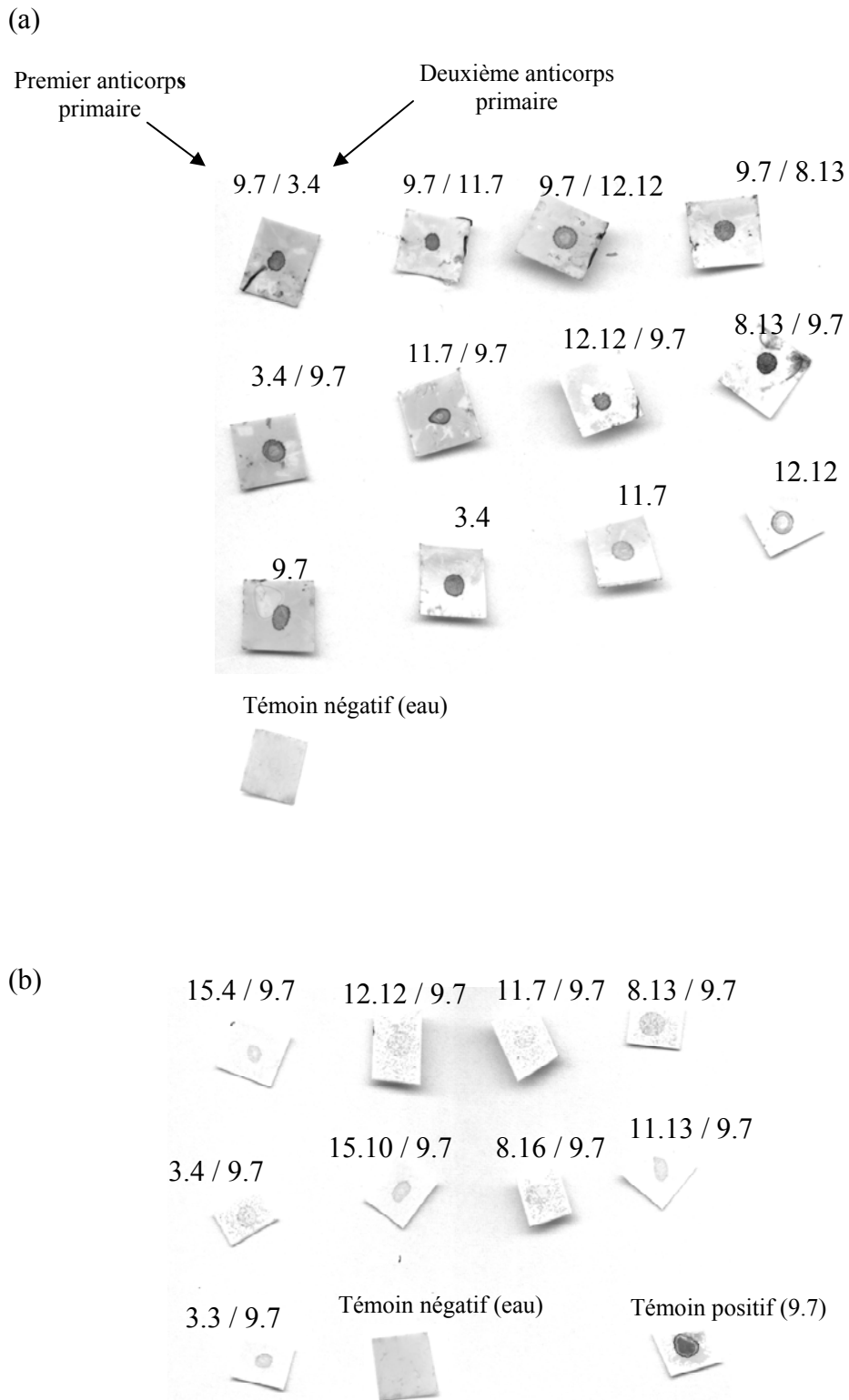


Figure 5-7. Sélection d'un couple d'anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa à épitopes différents, (a) révélé par un anticorps secondaire anti-souris marqué à la phosphatase alcaline, (b) révélé par le deuxième anticorps primaire (9.7) marqué à la phosphatase alcaline.

3.2.2. TR-FRET (HTRF®)

Même si un couple d'anticorps n'a pas pu être clairement défini, nous avons décidé de tenter l'expérience d'HTRF® avec le couple d'anticorps 9.7 et 8.13, choisi pour des raisons de concentration et de pureté. Les résultats de cet essai sont présentés dans le **Tableau 5-2**.

Il est important de remarquer que pour cette étude, des anticorps monoclonaux ont été utilisés plutôt que des polyclonaux car pour le FRET, il est nécessaire que les anticorps se fixent toujours au même niveau sur la protéine. Ainsi, si des anticorps polyclonaux avaient été utilisés, le signal aurait varié en fonction de l'endroit où se fixent les anticorps, et donc les expériences n'auraient pas été optimales.

Tableau 5-2. Intensité de fluorescence (IF) et transfert d'énergie entre deux anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa fluorescents au contact avec Cry1Aa.

Molécules	Excitation (nm)	Emission 615 nm (IF)	Emission 665 nm (IF)
Anticorps 8.13 - d ₂	650	-	247000
Anticorps 9.7 - Eu	340	57000	1200
Cry1Aa + Anticorps 9.7 - Eu	340	46000	1100
Cry1Aa + Anticorps 9.7 - Eu + Anticorps 8.13 - d ₂	340	41000	1800

Dans un premier temps, les marquages à l'Europium et au d₂ ont été vérifiés à leur longueur d'onde d'excitation et d'émission respectives. Ils présentent tous deux une intensité de fluorescence (IF) importante, qui est de 57000 pour l'anticorps 9.7 marqué au cryptate d'Europium et 247000 pour l'anticorps 8.13 marqué au d₂. Cependant, aucun transfert d'énergie n'est observé entre les deux anticorps puisque l'intensité de fluorescence émise à 665 nm après excitation à 340 nm n'est que de 1800. Cette fluorescence n'est pas caractéristique d'un transfert d'énergie puisque cette valeur est très peu différente de celle de l'anticorps 9.7 - Eu (IF = 1100) et très inférieur au potentiel de fluorescence du d₂ (IF = 247000).

D'après la taille de protéine et des 2 anticorps, l'absence de FRET serait liée à un problème d'épitopes plutôt que de distance. En effet, si les 2 anticorps parvenait à se fixer simultanément, la distance séparant les fluorophores donneur et accepteur serait inférieure à 10 nm, distance maximale pour observer un transfert d'énergie.

Une hypothèse pouvant expliquer cette absence de FRET pourrait alors être un encombrement stérique important des anticorps empêchant leur fixation simultanée. Dans ce cas, ce problème pourrait être surmonté par une digestion enzymatique de l'anticorps à la papaïne (voir paragraphe 2.4). Ceci permettrait de réduire la taille des anticorps de 150 à 25 kDa, tout en conservant ses propriétés immunologiques. Cependant, le gel d'électrophorèse SDS-PAGE présenté de l'anticorps digéré ne révèle aucune bande au voisinage de 25 kDa, taille du fragment Fab généré après digestion. Une augmentation de la concentration d'enzyme et du temps d'incubation ne présente pas d'effet sur la digestion (**Figure 5-8**). Cette absence de digestion peut s'expliquer par le fait que parmi les IgG, il existe différentes sous classes avec des sensibilités différentes aux enzymes de digestion. Certaines d'entre elles sont même complètement insensibles à la papaïne (IgG₁) contrairement aux IgG₂ qui y sont très sensibles.

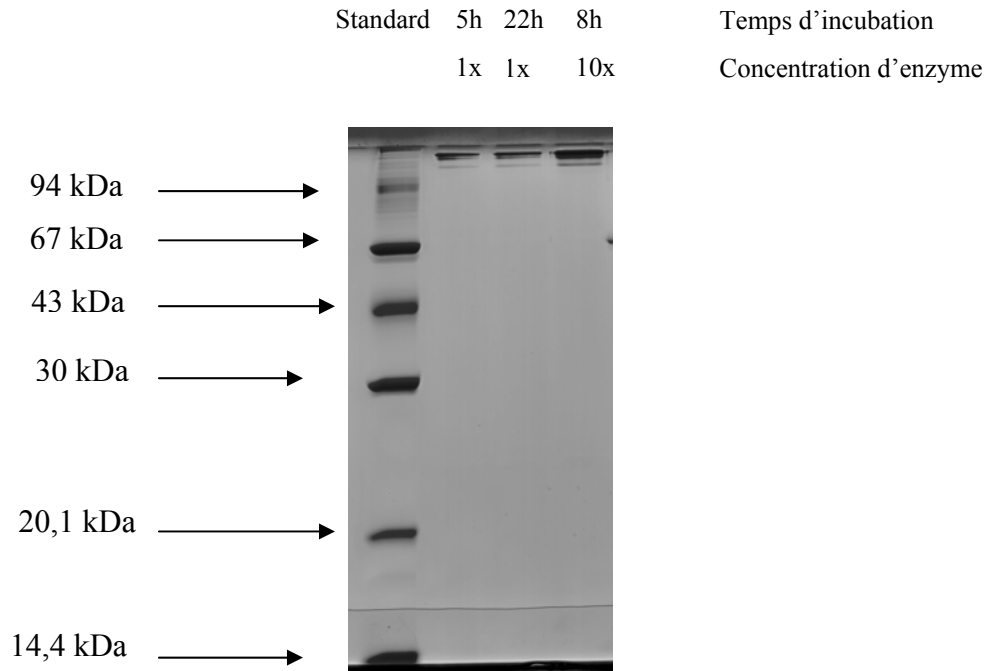


Figure 5-8. SDS-PAGE de la digestion enzymatique d'un anticorps par la papaïne à 2 concentrations et temps d'incubation différents. Le standard de poids moléculaire choisi est le LMW (Amersham Biosciences).

Aussi, le ou les épitopes pourraient être cachés par l'adsorption de la protéine Bt. Ce genre de situation a déjà été observé pour la chymotrypsine et la montmorillonite pour laquelle le changement d'activité de l'enzyme à l'état adsorbé était corrélé au masquage du site catalytique par l'adsorption (Baron et al., 1999). Dans ce cas, l'utilisation d'une solution peu dénaturante (Guanidine 3M) pourrait aider à l'exposition des épitopes (Genovesi et al., 2007).

Enfin, il se pourrait tout simplement que les anticorps possèdent des épitopes identiques. Dans ce cas, il faut changer de couple d'anticorps. Afin de déterminer préalablement si un couple d'anticorps est compatible avec le FRET, un « mapping » des épitopes des anticorps au Biacore® semble être la meilleure alternative.

3.3. Détection immunologique de la toxine Cry1Aa après présaturation des surfaces adsorbantes

Une méthode alternative au TR-FRET consiste à saturer la surface adsorbante par la BSA et détecter la toxine par un seul anticorps anti-Cry1Aa couplé à un fluorophore, la FITC. Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter 2 anticorps à épitopes différents. Aussi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux n'aurait pas été essentielle. En effet, il n'est pas requis que l'anticorps se fixe toujours sur le même épitope de la protéine, contrairement au TR-FRET. Cependant, pour des raisons de disponibilité, nous avons tout de même travaillé avec des anticorps monoclonaux.

3.3.1. Sélection des anticorps marqués à la FITC

Après marquage à la FITC, certains des anticorps monoclonaux à disposition (15.10, 12.12 et 8.16) ont montré une perte de leur capacité à reconnaître la protéine Cry1Aa (**Figure 5-9**). En effet, un marquage fluorescent peut altérer les propriétés biochimiques d'une protéine, notamment si le fluorophore se fixe de façon covalente au niveau du site de reconnaissance de l'antigène. Une façon de palier à ce problème de réduction d'affinité par la molécule fluorescente consiste à attacher le fluorophore via un « linker » comme par exemple un anticorps secondaire fluorescent, mais un encombrement stérique important pourrait être préjudiciable.

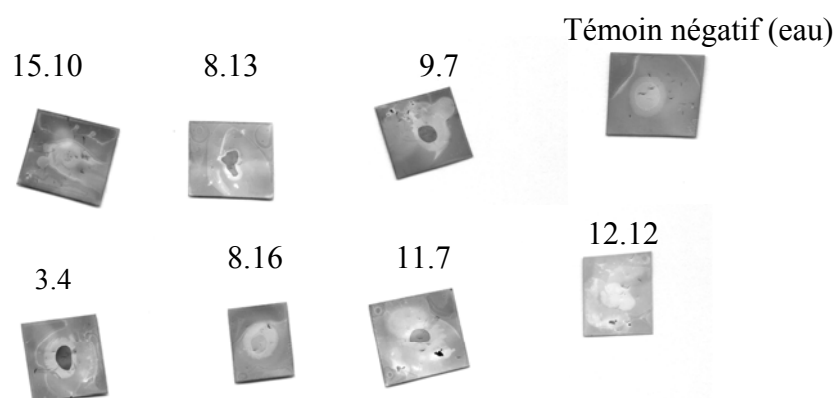


Figure 5-9. Influence du marquage des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa à la FITC sur leur réactivité vis-à-vis de leur antigène.

3.3.2. Détection immunologique de la toxine Cry1Aa adsorbée sur des surfaces argileuses de montmorillonite et de kaolinite

Présaturation des surfaces par la BSA (pH 4,5)

Par ailleurs, compte tenu du fait que le sol est un milieu très complexe, nous avons choisi dans un premier temps de travailler sur un milieu simplifié que sont les argiles (montmorillonite et kaolinite).

La première étape consiste à déterminer les bonnes conditions pour présaturer la surface de montmorillonite par la BSA. Trois conditions de pH ont été testées : CaCl₂ 20 mM pH 6,4, phosphate de sodium 20 mM pH 7, et acétate de sodium 20 mM pH 4,5. Aucune adsorption n'est observée à pH 7 et seulement une très faible adsorption à pH 6,4 (27 % des sites d'adsorption saturés). Cependant, à pH 4,5, la totalité des sites d'adsorption sont saturés par la BSA.

Cette forte influence du pH vient du fait que les protéines sont des macromolécules avec une affinité pour les surfaces fortement dépendante de leur charge nette. De ce fait, le point isoélectrique de la protéine et le pH sont des facteurs clés qui régulent cette adsorption. Le point isoélectrique de la BSA est de 4,7 (Hu et al., 2005). Au voisinage du point isoélectrique, la charge nette neutre de la protéine engendre un minimum de forces répulsives donc un contact maximum avec les surfaces chargées des argiles. L'adsorption est alors maximale au niveau de ces valeurs de pH. Pour des pH supérieurs

à cette valeur, les forces répulsives entre l'argile chargée négativement et la protéine aussi chargée négativement, réduisent l'adsorption, expliquant la non-adsorption à pH 7 (Quiquampoix et al., 1995; Quiquampoix and Ratcliffe, 1992).

Une fois les conditions optimales de présaturation définies, l'anticorps est mis en contact avec la surface d'argile présaturée et une très forte adsorption de l'anticorps (près de 90 %) est alors observée. L'affinité de l'anticorps pour la surface à pH 4,5 semble être très forte et un phénomène d'hétéroéchange entre la BSA et l'anticorps semble expliquer cette forte adsorption.

Cependant, cet anticorps ne s'adsorbe pas du tout à pH 7. De ce fait, une présaturation de la surface ne s'avère plus nécessaire et les essais de détection ont alors été effectués à pH 7.

Sans présaturation des surfaces (pH 7)

La non-adsorption à pH 7 d'une série d'anticorps marqués à la FITC a été confirmée sur la montmorillonite et la kaolinite (**Tableau 5-3**).

Tableau 5-3. Adsorption des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC sur la montmorillonite (Mt) et la kaolinite (K) à pH 7

	Eau	Surnageant d'adsorption Mt	Surnageant d'adsorption K
		IF	
Anticorps 8.13 - FITC	349000	333000	403000
Anticorps 9.7 - FITC	242000	327000	463000
Anticorps 3.4 - FITC	197000	174000	191000
Anticorps 11.7 - FITC	296000	260000	284000

Cependant, les intensités de fluorescence des anticorps 8.13 et 9.7 sont fortement augmentées après contact avec les argiles et en particulier la kaolinite et l'anticorps 9.7. Cette augmentation anormale pourrait être expliquée par l'adsorption d'un inhibiteur de fluorescence initialement présent dans la solution d'anticorps sur les surfaces argileuses. Dans ce cas, la non-adsorption des anticorps à pH 7 pourrait être le résultat d'une adsorption masquée par une augmentation de la fluorescence causée par le contact avec les argiles.

Cependant, cet effet est aussi observé avec les surnageants de montmorillonite et kaolinite (**Tableau 5-4**).

Tableau 5-4. Effet d'une solution de montmorillonite (Mt) et kaolinite (K) sur la fluorescence des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC

	Eau	Surnageant de Mt	Surnageant de K
Anticorps 8.13 - FITC	77000	79000	117000
Anticorps 9.7 - FITC	156000	289000	401000
Anticorps 3.4 - FITC	162000	176000	196000
Anticorps 11.7 - FITC	265000	261000	294000

Ces résultats suggèrent alors que l'augmentation de fluorescence provient principalement de composés présents dans les surnageants d'argiles plutôt que de la présence d'un inhibiteur dans la solution d'anticorps. Il se pourrait en effet que le surnageant d'argile soit un milieu augmentant la fluorescence de la FITC. Cependant, cet effet matrice est peu important pour les anticorps 3.4 et 11.7.

Après avoir adsorbé la toxine à pH 7, nous avons fait un test de détection de la toxine à l'état adsorbé sur la montmorillonite et la kaolinite (**Tableau 5-5**).

Tableau 5-5. Détection de la toxine Cry1Aa adsorbée sur la montmorillonite (Mt) et la kaolinite (K) par des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC

	Eau	Surnageant d'adsorption Mt	Surnageant d'adsorption K
	IF		
Anticorps 3.4 - FITC	168081	205933	217876
Anticorps 11.7 - FITC	256174	317965	288861

Nous n'observons pas de déplétion de fluorescence en solution donc il n'y a pas eu de détection de l'antigène adsorbé. Aussi, bien que nous ayons choisi de travailler avec des argiles plutôt que des sols pour diminuer les éventuels artefacts de fluorescence, nous observons une augmentation de fluorescence pour tous les anticorps en partie due à la matrice d'argile.

3.3.3. Détection immunologique de la toxine Cry1Aa adsorbée sur des sols

Quelques essais préliminaires sur les sols ont permis de déterminer que l'effet matrice des sols (en solution) et le quenching (en suspension) ont été très importants lorsqu'une concentration de sol de 100 g l⁻¹ a été utilisée (**Tableau 5-6**).

Tableau 5-6. Effet de la matrice des sols sur la fluorescence des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC

	Suspension eau	Suspension pH 7	Surnageant eau	Surnageant pH 7
	IF			
Sol A	28480	44061	100798	190909
Sol B	6284	12697	17884	61522
Sol R	25941	42625	54618	112303
Sol T	17838	31154	27258	59841

Ce problème de quenching, défini comme une diminution de l'intensité de fluorescence d'une molécule donnée, peut être expliqué par divers processus tels que les effets internes de filtre (réabsorption des photons par une molécule voisine ou par adsorption des molécules fluorescentes sur la phase solide) (Lakowicz, 2006). D'après le **Tableau 5-6**, la forte augmentation de fluorescence observée en solution montre un effet important du quenching par adsorption des molécules fluorescentes sur la phase solide du sol.

Quand à l'autofluorescence, elle serait liée à la matière organique dissoute des sols, molécules capables d'absorber la lumière incidente et de réémettre sur une large gamme

de longueur d'onde. Par ailleurs, nous remarquons que le tampon à pH 7 semble favoriser l'autofluorescence de l'échantillon.

Une alternative à ces problèmes serait de travailler avec des suspensions de sol beaucoup moins concentrées afin de minimiser le quenching et l'autofluorescence du sol. Une concentration de 1 g l^{-1} semble être acceptable. Aussi, un fluorophore différent permettrait de travailler à des longueurs d'ondes diminuant l'autofluorescence de l'échantillon (Hudson et al., 2007).

Par ailleurs, contrairement aux argiles, une présaturation des surfaces de sols semble nécessaire puisque les anticorps s'adsorbent sur tous les sols testés (100 % d'adsorption pour les sols A, B, R et 36 % pour le sol T). Cette différence prononcée entre les sols et les argiles peut s'expliquer par les interactions complexes qui peuvent se produire entre les surfaces organo-minérales et les protéines.

Alors, il conviendrait de présaturer les surfaces de sol par un anticorps non spécifique, une solution de BSA ou Superblock[®] (Pierce), solution commerciale de blocage pour l'ELISA et le western blot (Dankwardt and Hock, 2000; Genovesi et al., 2007).

Enfin, une possibilité serait de ne pas privilégier l'approche basée sur la fluorescence mais plutôt sur les activités enzymatiques. Ainsi, après inhibition des activités enzymatiques endogènes de l'échantillon et liaison de l'anticorps primaire anti-Cry1Aa, il s'agirait de détecter à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme telle que la HRP révélée à l'ECL (Dankwardt and Hock, 2000; Genovesi et al., 2007).

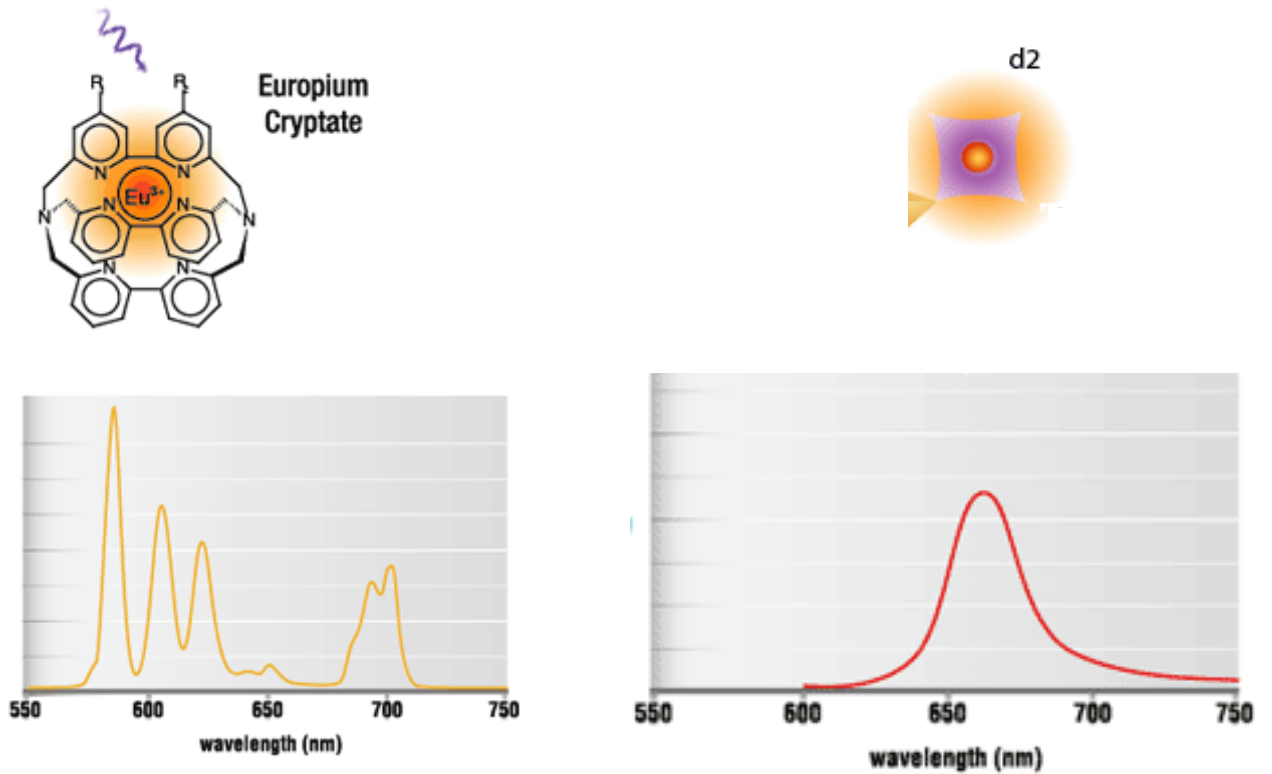
4. Conclusions et perspectives

Le but de ce travail était de mettre au point une méthode de détection fiable, quantitative et reproductible de la toxine Bt adsorbée sur les particules de sol. Deux approches ont été envisagées :

- Les essais de TR-FRET sur les argiles ont montré que le couple d'anticorps choisi ne remplissait pas les conditions requises. Cependant, la technique reste prometteuse et des vérifications préliminaires au Biacore[®] permettraient de mieux définir ces épitopes et donc de sélectionner un couple d'anticorps adéquat.
- En ce qui concerne la présaturation des surfaces, elle s'est avérée inutile pour les argiles à pH 7. Cependant, la matrice argileuse semble influencer fortement sur la fluorescence de la fluorescéine. Contrairement aux argiles, les anticorps s'adsorbent fortement sur les sols. Il faudrait alors mettre au point une méthode de présaturation des surfaces de sol permettant de minimiser le quenching et l'autofluorescence. Un fluorophore différent, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes, ou des approches basées sur l'activité enzymatique, pourraient diminuer ces artefacts. Aussi, d'autres types de sondes telles que des sondes radioactives ou enzymatiques pourraient être envisagées.

Nous pouvons donc conclure que les deux méthodes développées restent envisageables pour la détection de la toxine en présence de sol mais qu'un effort méthodologique supplémentaire est nécessaire. A terme, cette méthode pourrait alors être utilisée pour la détection *in situ* d'autres agents à risques tels que les pathogènes, les prions et les pesticides.

Annexe



Spectre d'émissions de fluorescence du cryptate d'Europium et du d₂ (D'après www.htrf.com)

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette thèse était d'étudier le devenir de la toxine Bt issue de cultures transgéniques afin d'évaluer l'impact des PGM sur l'environnement. Au cours de ce travail, nous avons tenté de répondre aux différentes lacunes observées dans la littérature :

- (i) La toxine utilisée pour les études d'interactions avec les composants du sol est probablement sous forme polymérisée
- (ii) Aucune étude de la mobilité de la toxine à l'état adsorbé n'a été réalisée
- (iii) Les processus contrôlant la persistance de la toxine Bt dans le sol ne sont pas clairement élucidés
- (iv) Il n'existe pas de méthode de détection de la toxine *in situ* (en présence de sol) à la fois fiable et reproductible

Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions de pH et de force ionique nécessaire au maintien de la toxine sous forme monomérique. Puis, nous avons étudié les phénomènes d'adsorption et de désorption de ce monomère avec les argiles, ainsi que sa mobilité à l'état adsorbé. Aussi, une analyse détaillée de la persistance de la toxine dans le sol a pu mettre en évidence les processus impliqués. Enfin, des travaux sur l'élaboration d'une méthode de détection de la toxine *in situ*, en présence de sol, ont été menés mais nécessitent d'être poursuivis.

1. Interaction de la toxine avec les argiles : adsorption, désorption et mobilité

Plusieurs équipes scientifiques se sont déjà intéressées aux interactions entre les toxines Bt et les composants du sol (argiles, fractions argileuses de sol, acides humiques, ...). La préparation de la toxine utilisée pour ces expériences ne prenait pas en compte l'état de polydispersité de la protéine. Or, la toxine a la capacité de s'oligomériser si elle n'est pas conservée dans des conditions strictes. Ainsi, la toxine utilisée dans les précédentes études était probablement sous forme polymérique. Cependant, compte tenu de la faible concentration de toxine relâchée par les PGM, la toxine incorporée dans les sols semble plutôt être sous forme monomérique, avec des propriétés d'adsorption probablement différentes. Nous avons montré en diffusion dynamique de la lumière, qu'un pH supérieur à 6,5 ainsi qu'une force ionique élevée d'au moins 150 mM étaient nécessaires au maintien de la forme monomérique. Dans ces conditions, les isothermes d'adsorption complètes ont été réalisées sur 2 argiles aux propriétés contrastées, la montmorillonite et la kaolinite. Nous avons montré que l'interaction entre la protéine et la surface est de faible affinité et est partiellement désorbée par l'eau ou un pH élevé. Aussi, nous avons démontré une forte influence du pH, et donc de la charge nette de la protéine, sur l'adsorption. Ces résultats suggèrent que les interactions électrostatiques jouent un rôle majeur dans l'interaction avec les argiles. De ce fait, la force ionique devrait jouer un rôle important. Or, dans cette étude, le maintien de la forme monomérique de la toxine requiert une force ionique anormalement élevée (150 mM) par rapport à ce qu'on peut retrouver dans les sols (quelques mM), pouvant alors influencer sur la quantité de toxine adsorbée.

Par ailleurs, le FRAP, habituellement employé pour analyser les dynamiques cellulaires, a été appliqué avec succès dans l'étude de la mobilité de la toxine à l'état adsorbé. Les analyses à faible concentration de toxine réalisées sur la montmorillonite ont démontré que la toxine est immobilisée par son adsorption et que cette immobilisation n'est pas influencée par le pH et le niveau de saturation de l'argile. Ces résultats suggèrent alors que les risques de transfert à la surface des argiles sont fortement limités. Aussi, des expériences préliminaires sur des sols ont montré que cette dernière s'adsorbe avec une forte affinité sur les composants du sol, probablement due à la faible concentration en toxine ainsi qu'aux complexes organo-minéraux pouvant interagir avec la toxine. De ce fait, le risque réel de dissémination par mobilité de surface semble limité. Cependant, d'autres types de transferts dans le sol tels que les transferts facilités par les colloïdes et par bioturbation existent, et il serait utile de les explorer afin de mieux évaluer les risques de dissémination des protéines issues d'OGM dans l'environnement. De plus, cette forte adsorption sur la phase solide du sol pourrait conduire à une concentration locale de la toxine en « hot spots », augmentant l'exposition de la toxine vis-à-vis des organismes non cibles.

2. Persistance de la toxine dans le sol et les mécanismes mis en jeu

Une analyse détaillée visant à évaluer la persistance de la toxine dans le sol a montré que la dégradation microbienne joue un rôle seulement mineur sur la persistance de la toxine dans le sol, contrairement à ce qui est suggéré dans la littérature. En effet, des traitements visant à inhiber l'activité microbienne (chlorure de mercure, autoclavage, γ -stérilisation, cocktail d'antiprotéases) et à stimuler cette activité (amendement de glucose et/ou acides aminés) n'ont pas montré d'effet marqué sur la persistance de la toxine. Ainsi, l'hypothèse de processus biotiques contrôlant la persistance est écartée, privilégiant la forte implication des processus abiotiques. Les processus abiotiques impliqués pourraient être de deux types :

- une fixation chimique de la protéine sur les composants du sol, diminuant son extraction avec le temps et la protégeant contre la dégradation microbienne
- un changement de conformation au contact des surfaces de sol, diminuant son immunogénicité et sa détection en ELISA

Lorsque la toxine est incubée à basse température (4°C), la diminution de toxine extraite avec le temps est beaucoup moins nette. Cette température est optimale pour la stabilité de la protéine, rendant son cœur hydrophobe peu accessible aux surfaces minérales. De ce fait, une basse température pourrait diminuer les interactions hydrophobes, facilitant l'extraction de la toxine et/ou diminuant les éventuels changements de conformation après contact avec les surfaces. Afin de définir lequel des 2 processus abiotiques est majoritairement impliqué, il serait pertinent d'étudier ces modifications de structure à l'état adsorbé. Cependant, il existe très peu de méthodes évaluant la structure tertiaire des protéines à l'état adsorbé : La RMN du solide et la microscopie de force atomique (AFM). Dans le cas de la RMN du solide, elle n'est à ce jour pas applicable à des molécules d'une taille supérieure à 20 kDa, or la toxine Bt représente environ 65 kDa. L'AFM permet en théorie d'observer des changements de conformation de molécules adsorbées, mais cette technique reste difficile à mettre en place et à interpréter.

La meilleure alternative semble l'utilisation de techniques plus facile à mettre en œuvre telles que la FTIR et le dichroïsme circulaire. Certes ces méthodes renseignent seulement sur la structure secondaire des protéines, mais l'évolution de la proportion de feuillets- β et hélices- α peut être corrélée à un changement de structure tertiaire. Aussi, l'application d'une technique de RMN impliquant une sonde paramagnétique (ion

manganèse) peut fournir des informations complémentaires sur l'étalement d'une protéine sur des argiles, et donc des changements dans sa structure tertiaire.

Ces modifications de la structure tertiaire pourraient modifier l'activité entomotoxique de la protéine, qu'il serait aussi intéressant de vérifier par biotest. En effet, un point clé dans la persistance de la toxine dans le sol est la persistance de son activité insecticide. Si la toxine persiste à l'état adsorbé sous forme active, son exposition aux organismes non cibles pourraient causer à long terme des changements dans les écosystèmes. Au contraire, si elle persiste sous forme inactive, son impact environnemental serait considérablement réduit. Une étude par biotest se montre alors essentielle afin d'évaluer cet impact environnemental.

3. Détection de la toxine à l'état adsorbé, des méthodes prometteuses

La dernière partie de ce travail de thèse consistait à élaborer une méthode de détection de la toxine *in situ*, en présence de sol. Pour des raisons de spécificité, nous avons choisi une détection immunologique par des anticorps monoclonaux. Les sondes de détection utilisées étaient des molécules fluorescentes et deux stratégies ont été envisagées pour éviter une perturbation de la mesure par des phénomènes d'adsorption non spécifique des anticorps sur les surfaces de constituants du sol : (i) la localisation de la toxine Bt par deux anticorps monoclonaux reconnaissant deux épitopes et utilisant l'HTRF[®] et (ii) la présaturation des surfaces. Dans le principe, ces deux stratégies sont très prometteuses, cependant des efforts méthodologiques supplémentaires s'avèrent nécessaires.

L'HTRF[®] est une technique qui nécessite deux fluorophores dont les spectres d'excitation et d'émission se chevauchent, afin d'observer un transfert d'énergie. Dans notre étude, ces deux fluorophores étaient chacun couplés à un anticorps monoclonal. Afin d'observer le transfert d'énergie, il est nécessaire que ces anticorps se fixent sur la protéine. De ce fait, ils doivent posséder des épitopes différents. Dans cette étude, il n'a pas été possible de sélectionner un couple d'anticorps présentant clairement des épitopes différents. Les protéines présentant généralement peu d'épitopes, cette opération est limitante. Cependant, des analyses d'interactions protéine-protéine au Biacore[®] permettant un « mapping » des épitopes, pourraient permettre de définir le couple adéquat. La sélection des anticorps étant l'étape limitante, une fois un couple établi la technique devrait pouvoir être applicable rapidement.

Lors des études préliminaires de présaturation de surfaces, nous avons démontré que celles-ci ne s'avéraient pas nécessaire sur les argiles à pH 7 puisque les anticorps ne s'adsorbent pas à ce pH. De ce fait, les phénomènes d'adsorption non spécifique sont écartés. Cependant, la matrice argileuse semble agir comme un « enhancer » de la fluorescence de la sonde utilisée (FITC), ce qui pose des problèmes d'interprétation des dosages. Nous n'avons pas vraiment d'explication à ce phénomène et la meilleure alternative semble un changement de fluorophore pour un autre qui ne soit pas sujet aux mêmes artéfacts. Il serait éventuellement possible de travailler avec d'autres types de sondes tels que des sondes radioactives ou enzymatiques. Une publication est parue récemment pour la détection des prions *in situ*, basée sur une présaturation et une détection immunologique couplée à une sonde enzymatique, confortant l'idée que la démarche de détection après présaturation des surfaces est prometteuse (Genovesi et al., 2007).

En ce qui concerne les sols, des expériences préliminaires ont montré que, contrairement aux argiles, une présaturation était nécessaire. Il faudrait choisir une

protéine capable de s'adsorber sur les surfaces et empêcher l'adsorption des anticorps. Les expériences de présaturation des argiles avec de la BSA ont montré que l'anticorps s'adsorbait malgré tout sur la surface. Ceci est dû à la faible adsorption de la BSA sur les argiles à partir de pH 7. De ce fait, il faudrait envisager d'utiliser une autre protéine telle que le lysosyme, présentant une meilleure adsorption à des pH voisins de la neutralité.

Ainsi, ces approches méritent d'être poursuivies.

En conclusion, ce travail a permis de mieux évaluer l'impact des PGM sur l'environnement en comblant certaines lacunes observées dans la littérature. En effet, les expériences menées dans cette thèse ont permis de mieux comprendre les interactions physicochimiques entre la toxine Bt et les composants du sol. Les études ont permis de proposer un mécanisme impliqué dans la persistance de la toxine dans les sols. La dégradation microbienne semble jouer un rôle mineur par rapport aux interactions physicochimiques (e.g. interactions hydrophobes). En effet, la toxine ne semble pas dégradée mais inactivée au contact des surfaces de sol.

Quant aux expériences de détection de la toxine à l'état adsorbé, elles n'ont pas pu être menées à terme mais les deux stratégies envisagées restent prometteuses. Le développement de ces techniques pourrait être une grande avancée scientifique en terme de détection de protéines d'intérêt environnemental tels que la toxine Bt ou le prion.

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTES DES TABLEAUX

CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1-1. Pourcentage de similarité de séquences en acides aminés entre différentes protéines Cry (Crickmore et al., 1998; Höfte and Whiteley, 1989).....	10
Tableau 1-2. Cultures de plantes Bt autorisées pour la production en date de juillet 2001, classées par pays et par date (Shelton et al., 2002).....	22
Tableau 1-3. Bilan des espèces d'insectes ayant développé une résistance aux toxines issues de Bt (Ferre and Van Rie, 2002).	27
Tableau 1-4. Persistance de la protéine Bt dans l'environnement (Clark et al., 2005).	32
Tableau 1-5. Solubilisation de la toxine Cry1Ac dans du tampon carbonate 40 mM (pH 10.5) (Masson et al., 2002).	34
Tableau 1-6. Solubilisation de la toxine Cry1Ac dans du tampon CAPS 50 mM (pH 11) (Masson et al., 2002).....	34
Tableau 1-7. Effet de la concentration en sel sur les oligomères de la toxine Cry1Ac (Masson et al., 2002).....	34

CHAPITRE 5. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DE LA TOXINE BT EN PRESENCE DE SOL

Tableau 5-1. Principales caractéristiques physicochimiques des sols étudiés.....	102
Tableau 5-2. Intensité de fluorescence (IF) et transfert d'énergie entre deux anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa fluorescents au contact avec Cry1Aa.	111
Tableau 5-3. Adsorption des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC sur la montmorillonite (Mt) et la kaolinite (K) à pH 7	114
Tableau 5-4. Effet d'une solution de montmorillonite (Mt) et kaolinite (K) sur la fluorescence des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC.....	114
Tableau 5-5. Détection de la toxine Cry1Aa adsorbée sur la montmorillonite (Mt) et la kaolinite (K) par des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC	115
Tableau 5-6. Effet de la matrice des sols sur la fluorescence des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa marqués à la FITC.....	115

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1-3. Structure tridimensionnelle des protéines cristales Cry1Aa, Cry3Aa, Cry4Aa, Cry2Aa, Cry3Bb, Cry4Ba (Bravo et al., 2007).....	9
Figure 1-4. (a) Structure tridimensionnelle et (b) potentiel électrostatique de la toxine Cry1Aa (en bleu les charges positives et en rouge les charges négatives), modélisés par Swiss-PDB Viewer.	9
Figure 1-5. Représentation d'une protéine insecticide Cry avec la mise en évidence des 3 domaines structuraux de la toxine (domaines I, II et III). La région transmembranaire apparaît en noir (Parker and Feil, 2005).	11
Figure 1-6. Positions des blocs conservés sur différentes protéines Cry. Les blocs sont représentés en noir, gris ou blanc indiquant un important, modéré ou faible degré de similarité, respectivement (Schnepf et al., 1998).....	12
Figure 1-7. Mécanisme d'action des protéines insecticides Cry1.....	13
Figure 1-8. Longueurs relatives des protoxines Cry ainsi que les positions des digestions par les protéases (flèches pleines). Les flèches en pointillés représentent les clivages intramoléculaires. Les parties hachurées correspondent au fragment toxique (Bravo et al., 2007).	14
Figure 1-9. Récepteurs des protéines Cry1A : CADR, récepteur cadherin-like; APN, aminopeptidase N ; ALP, alcaline phosphatase ; GCR, glycoconjugué de 270 kDa (Bravo et al., 2007).	15
Figure 1-10. Modèle séquentiel de la liaison de la toxine Cry1Ac à l'APN de <i>L. dispar</i> . A : La reconnaissance entre le domaine III de la toxine et la partie GalNAc de l'APN, B : facilite la reconnaissance entre le domaine II et l'APN, induisant l'insertion potentielle du domaine I dans la membrane (Jenkins et al., 2000).	16
Figure 1-11. (a) Principales étapes de la formation du pore membranaire par les PFT (b) avec une représentation vue de dessus du modèle tétramérique pour la toxine Cry1Aa. Les rectangles et les cercles numérotés correspondent au domaine I et le cercle central au pore transmembranaire. DII et DIII représentent les domaines II et III (Parker and Feil, 2005; Schwartz et al., 1997a).....	17
Figure 1-12. Surface occupée en millions d'hectares par les cultures OGM résistantes aux insectes, tolérantes aux herbicides, et aux deux (James, 2007).	23
Figure 1-13. Modèle proposé pour la liaison des protéines Cry aux BBMV des cellules intestinales des larves de <i>P. xylostella</i> (Ferre and Van Rie, 2002).....	25

CHAPITRE 2. INTERACTIONS DE LA TOXINE BT AVEC LES ARGILES

Figure 2-1. Adsorption isotherms of Cry1Aa toxin on montmorillonite at various pH values: 6.5 (●); 7 (■); 8 (▲) and 9 (□). Lines represent nonlinear regression fits (Schulthess & Dey, 1996) to Langmuir adsorption isotherm.	49
--	----

Figure 2-2. Adsorption isotherms of Cry1Aa toxin on kaolinite at various pH: 6.5 (●); 7 (■) ; 8 (▲) and 9 (□). Lines represent non-linear regression fits (Schulthess & Dey, 1996) to Langmuir adsorption isotherm.	49
Figure 2-3. Effect of pH on the maximum amount of toxin adsorbed calculated by Langmuir regression, normalized to the specific surface area for the montmorillonite (□) and the kaolinite (■).....	50
Figure 2-4. Desorption of the Cry1Aa toxin using various combinations of pH buffers and surfactants, and the use of electroelution from montmorillonite for initial toxin concentration corresponding to half-plateau (a) and plateau (b). Bars indicate one standard deviation calculated from replicates.....	51
Figure 2-5. Desorption of the Cry1Aa toxin using various combinations of pH buffers and surfactants, and the use of electroelution from kaolinite. Bars indicate one standard deviation calculated from replicates.....	52

CHAPITRE 3. MOBILITE DE LA TOXINE BT A L'ETAT ADSORBE

Figure 3-1. Typical fluorescence image, after photobleaching of a uniform disk of 12 μm diameter, of Cry1Aa adsorbed on montmorillonite.....	66
Figure 3-2. Fluorescence intensity profiles for FITC-labeled Cry1Aa adsorbed on montmorillonite at a half-saturation level () before, () just after and () 500 sec, after photobleaching, at (a) pH 6.5; (b) 7; (c) 8 and (d) 9.	68
Figure 3-3. Fluorescence intensity profiles for FITC-labeled Cry1Aa adsorbed on montmorillonite at a saturation level () before, () just after and () 500 sec, after photobleaching, at (a) pH 6.5; (b) 7; (c) 8 and (d) 9.	69

CHAPITRE 4. PERSISTANCE DE LA TOXINE BT DANS LE SOL

Figure 4-1. Persistence of Cry1Aa toxin as a function of incubation period, determined by ELISA after extraction, in four contrasting soils: soil A (□); soil B (■); soil R (△); soil T (▲). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.....	83
Figure 4-2. Effect of the stimulation of microbial activity by addition of carbon sources on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in a clayey soil, soil A. The carbon sources (0.2 mg C g^{-1} soil) were glucose (△), amino acids (○), or a mixture of glucose and amino acids (◇). The control soil, no carbon spike, is represented by (■). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.....	84
Figure 4-3. Effect of microbial activity inhibition using γ -irradiation (△), autoclaving (○) and incubation at 4°C (◇) on the persistence of Bt toxin in four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The control soil is represented by (■). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.....	85
Figure 4-4. Effect of microbial activity inhibition by addition of a commercial antiproteases cocktail (△), on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in a clayey soil, soil A with respect to the control soil (■). The data are expressed as the mean of triplicates \pm one standard error.....	86

Figure 4-5. Effect of the temperature (25°C (■) and 4°C (△)) on the adsorption isotherm of trace amounts of Cry1Aa toxin on soil B.	88
Figure 4-6. Effect of pH changes on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period for each of the four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The pH was decreased by one (○) or two units (◇) by hydrochloric acid, or increased by one unit (△) by potassium carbonate, or was unchanged, control soil (■). The data are expressed as the mean of triplicates ± one standard error.....	90
Figure 4-7. Effect of the microbial activity stimulation by addition of carbon sources on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period for each of the four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The carbon sources (0.2 mg C g ⁻¹ soil) were glucose (△), amino acids (○), or a mixture of glucose and amino acids (◇).The control soil, no carbon spike, is represented by (■). The data are expressed as the mean of triplicates ± one standard error.	91
Figure 4-8. Effect of the stimulation of microbial activity by addition of a larger concentration of glucose (2 mg C g ⁻¹ soil) (△) on the persistence of Bt toxin in four contrasted soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d) , compared to the control soil (■). The data are expressed as the mean of triplicates ± one standard error.....	92
Figure 4-9. Effect of inhibition of microbial activity by addition of mercuric chloride (500 µg g ⁻¹ soil) (△) compared to the control soil (■) on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The data are expressed as the mean of triplicates ± one standard error.	93
Figure 4-10. Effect of inhibition of microbial activity by addition of a commercial antiproteases cocktail (△) compared to the control soil (■), on the persistence of Bt toxin as a function of incubation period in four contrasting soils: soil A (a); soil B (b); soil R (c); soil T (d). The data are expressed as the mean of triplicates ± one standard error.	94

CHAPITRE 5. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION DE LA TOXINE BT EN PRESENCE DE SOL

Figure 5-1. Représentations schématiques des approches envisagées pour la détection spécifique de la toxine Bt <i>in situ</i> par un ou deux anticorps monoclonaux fluorescents, basées sur :.....	101
Figure 5-2. Représentation schématique d'une molécule d'anticorps (150 kDa) et de son produit de digestion par la papaïne (25 kDa).	103
Figure 5-3. Représentations schématiques des dot-blot réalisés pour la sélection des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa.	104
Figure 5-4. Représentations schématiques des dot-blot réalisés pour la sélection d'un couple d'anticorps compatible avec la technique TR-FRET utilisant (a) un anticorps secondaire anti-souris marqué ou (b) un anticorps primaire marqué.	106
Figure 5-5. Un délai de 50 à 150 µsec entre l'excitation et la mesure d'émission de fluorescence permet d'éliminer les fluorescences non spécifiques.	107
Figure 5-6. Sélection des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa par dot-blot	109

Figure 5-7. Sélection d'un couple d'anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa à épitopes différents, (a) révélé par un anticorps secondaire anti-souris marqué à la phosphatase alcaline,	110
Figure 5-8. SDS-PAGE de la digestion enzymatique d'un anticorps par la papaïne à 2 concentrations et temps d'incubation différents.	112
Figure 5-9. Influence du marquage des anticorps monoclonaux anti-Cry1Aa à la FITC sur leur réactivité vis-à-vis de leur antigène.	113
Annexe. Spectre d'émissions de fluorescence du cryptate d'Europium et du d ₂ (D'après www.htrf.com).....	117

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Accinelli C., Koskinen W.C., Becker J.M. and Sadowsky M.J. 2008. Mineralization of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1025-1028.

Adang M.J., Brody M.S., Cardineau G., Eagan N., Roush R.T., Shewmaker C.K., Jones A., Oakes J.V. and McBride K.E. 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIIIa gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology* 21: 1131-1145.

Agaisse H. and Lereclus D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol* 177: 6027-6032.

Ahmad A., Wilde G.E. and Zhu K.Y. 2005. Delectability of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein in soil and its effect on nontarget surface and below-ground arthropods. *Environmental Entomology* 34: 385-394.

Al-Deeb M.A., Wilde G.E., Blair J.M. and Todd T.C. 2003. Effect of Bt corn for corn rootworm control on nontarget soil microarthropods and nematodes. *Environmental Entomology* 32: 859-865.

Allured V.S., Collier R.J., Carroll S.F. and McKay D.B. 1986. Structure of Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0- angstrom Resolution. *PNAS* 83: 1320-1324.

Angsuthanasombat C., Crickmore N. and Ellar D.J. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS Microbiology Letters* 94: 63-68.

Atsumi S., Mizuno E., Hara H., Nakanishi K., Kitami M., Miura N., Tabunoki H., Watanabe A. and Sato R. 2005. Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3966-3977.

Baron M.H., Revault M., Servagent-Noinville S., Abadie J. and Quiquampoix H. 1999. Chymotrypsin Adsorption on Montmorillonite: Enzymatic Activity and Kinetic FTIR Structural Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 214: 319-332.

Barton K.A., Whiteley H.R. and Yang N.-S. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiology* 85: 1103-1109.

Bauce R., Carisey N., Dupont A. and Van Frankenhuyzen K. 2004. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 1624-1634.

- Baum J.A. and Malvar T. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* 18: 1-12.
- Baumgarte S. and Tebbe C.C. 2005. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology* 14: 2539-2551.
- Beegle C.C. and Yamamoto T. 1992. History of *Bacillus thuringiensis berliner* Research and Development. *Canadian Entomologist* 124: 587-616.
- Bietlot H., Carey P., Choma C., Kaplan H., Lessard T. and Pozsgay M. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochemical Journal* 260: 87-91.
- Bietlot H.P., Vishnubhatla I., Carey P.R., Pozsgay M. and Kaplan H. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Journal* 267: 309-315.
- Blackwood C.B. and Buyer J.S. 2004. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. *Journal of Environmental Quality* 33: 832-836.
- Boonserm P., Davis P., Ellar D.J. and Li J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology* 348: 363-382.
- Brar S.K., Verma M., Tyaci R.D. and Valero J.R. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41: 323-342.
- Bravo A., Gill S.S. and Soberon M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
- Bravo A., Gomez I., Conde J., Munoz-Garay C., Sanchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S. and Soberon M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1667: 38-46.
- Broadwell A.H. 1994. Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 27-29.
- Brusetti L., Francia P., Bertolini C., Pagliuca A., Borin S., Sorlini C., Abruzzese A., Sacchi G., Viti C., Giovannetti L., Giuntini E., Bazzicalupo M. and Daffonchio D. 2004. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant and Soil* 266: 11-21.
- Bryant J.E. 1994. Application strategies for *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 65-75.
- Burges H.D. and Hurst J.A. 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *Journal of Invertebrate Pathology* 30: 131-139.

- Burghardt T.P. and Axelrod D. 1981. Total internal reflection/fluorescence photobleaching recovery study of serum albumin adsorption dynamics. *Biophys J* 33: 455-467.
- Burton S.L., Ellar D.J., Li J. and Derbyshire D.J. 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. *Journal of Molecular Biology* 287: 1011-1022.
- Carozzi N.B., Kramer V.C., Warren G.W., Evola S. and Koziel M.G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3057-3061.
- Carrero G., McDonald D., Crawford E., de Vries G. and Hendzel M.J. 2003. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods* 29: 14-28.
- Carroll J. and Ellar D.J. 1997. Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *European Journal of Biochemistry* 245: 797-804.
- Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Mocali S., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M.P., Miclaus N. and Giovannetti M. 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities in experimental microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6719-6729.
- Chang C., Yu Y.M., Dai S.M., Law S.K. and Gill S.S. 1993. High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 815-821.
- Chen W.Y., Huang H.M., Lin C.C., Lin F.Y. and Chan Y.C. 2003. Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: Studies by isothermal titration calorimetry and the Van't Hoff equation. *Langmuir* 19: 9395-9403.
- Chen Y., Lagerholm B.C., Yang B. and Jacobson K. 2006. Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* 39: 147-153.
- Chestukhina G.G., Kostina L.I., Mikhailova A.L., Tyurin S.A., Klepikova F.S. and Stepanov V.M. 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Archives of Microbiology* V132: 159-162.
- Chevallier T., Muchaonyerwa P. and Chenu C. 2003. Microbial utilization of two proteins adsorbed to a vertisol clay fraction: toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and bovine serum albumin. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1211-1218.
- Choe S., Bennett M.J., Fujii G., Curmi P.M.G., Kantardjieff K.A., Collier R.J. and Eisenberg D. 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357: 216-222.

Choma C.T. and Kaplan H. 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. *Biochemistry* 29: 10971-10977.

Choma C.T., Surewicz W.K., Carey P.R., Pozsgay M. and Kaplan H. 1990. Secondary structure of the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Journal of Protein Chemistry* V9: 87-94.

Choma C.T., Surewicz W.K. and Kaplan H. 1991. The toxic moiety of the protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179: 933-938.

Clark B.W. and Coats J.R. 2006. Subacute effects of Cry1Ab Bt corn litter on the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Entomology* 35: 1121-1129.

Clark B.W., Phillips T.A. and Coats J.R. 2005. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4643-4653.

Clark D.C., Wilde P.J. and Dietmar Möbius and Reinhard M. 1998. Mobility of adsorbed protein molecules as studied by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Studies in Interface Science*. Elsevier, pp 267-301.

Cökmüs C., HakkiSayar A., Saçilik S., Osmanağaoğlu O. and Berber I. 2000. Effects of UV-light on *Bacillus sphaericus* and its protection by chemicals. *Journal of Basic Microbiology* 40: 215-221.

Cooper M.A., Carroll J., Travis E.R., Williams D.H. and Ellar D.J. 1998. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochemical Journal* 333: 677-683.

Cortet J., Andersen M.N., Caul S., Griffiths B., Joffre R., Lacroix B., Sausse C., Thompson J. and Krogh P.H. 2006. Decomposition processes under Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize: Results of a multi-site experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 195-199.

Crawford D. and Harvey W. 1988. Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology* 137: 277-286.

Crecchio C. and Stotzky G. 1998. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 463-470.

Crecchio C. and Stotzky G. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 573-581.

Crickmore N., Bone E.J., Williams J.A. and Ellar D.J. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiology Letters 131: 249-254.

Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J. and Dean D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.

Dankwardt A. and Hock B. 2000. Inhibition of endogenous peroxidase activity in soil samples. Application to the analysis of soil-bound triazine residues by enzyme immunoassays with peroxidase tracer. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163: 279-283.

de Maagd R.A., Bravo A. and Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics 17: 193-199.

De Nobili M., Contin M., Mondini C. and Brookes P.C. 2001. Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. Soil Biology and Biochemistry 33: 1163-1170.

Delecluse A., Poncet S., Klier A. and Rapoport G. 1993. Expression of cryIVA and cryIVB genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology 59: 3922-3927.

DeLucca I., A. J., Simonson J. and Larson A. 1979. Two new serovars of *Bacillus thuringiensis*: serovars *dakota* and *indiana* (Serovars 15 and 16). Journal of Invertebrate Pathology 34: 323-324.

Devare M., Londono-R L.M. and Thies J.E. 2007. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A 3-year field analysis. Soil Biology and Biochemistry 39: 2038-2047.

Devare M.H., Jones C.M. and Thies J.E. 2004. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity, and diversity. Journal of Environmental Quality 33: 837-843.

Doerr S.H., Ritsema C.J., Dekker L.W., Scott D.F. and Carter D. 2007. Water repellence of soils: new insights and emerging research needs. Hydrological Processes 21: 2223-2228.

Doerr S.H., Shakesby R.A. and Walsh R.P.D. 2000. Soil water repellency: its causes, characteristics and hydro-geomorphological significance. Earth-Science Reviews 51: 33-65.

Donegan K.K., Palm C.J., Fieland V.J., Porteous L.A., Ganio L.M., Schaller D.L., Bucuo L.Q. and Seidler R.J. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil-microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. Applied Soil Ecology 2: 111-124.

Dorsch J.A., Candas M., Griko N.B., Maaty W.S.A., Midboe E.G., Vadlamudi R.K. and Bulla L.A. 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 Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1025-1036.

Drummond J. and Pinnock D.E. 1994. Host spectrum of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 15-19.

Du C., Martin P.A.W. and Nickerson K.W. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3847-3853.

Dubelman S., Ayden B.R., Bader B.M., Brown C.R., Jiang C. and Vlachos D. 2005. Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. *Environmental Entomology* 34: 915-921.

Dubois N.R. and Dean D.H. 1995. Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environmental Entomology* 24: 1741-1747.

Edelhoch H. 1967. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* 6: 1948-1954.

Edidin M., Zagyansky Y. and Lardner T.J. 1976. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 191: 466-468.

Einspanier R., Lutz B., Rief S., Berezina O., Zverlov V., Schwarz W. and Mayer J. 2004. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *European Food Research and Technology* 218: 269-273.

Escher N., Kach B. and Nentwig W. 2000. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Basic and Applied Ecology* 1: 161-169.

Fang M., Kremer R.J., Motavalli P.P. and Davis G. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4132-4136.

Feitelson J.S., Payne J. and Kim L. 1992. *Bacillus thuringiensis* - Insects and Beyond. *Bio-Technology* 10: 271-275.

Fenoll J., Hellin P., Marin C., Martinez C.M. and Flores P. 2005. Multiresidue Analysis of Pesticides in Soil by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection and Gas Chromatography Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 53: 7661-7666.

Ferre J., Escriche B., Bel Y. and Van Rie J. 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiology Letters* 132: 1-7.

Ferre J., Real M.D., Rie J.V., Jansens S. and Peferoen M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 5119-5123.

Ferre J. and Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47: 501-533.

Ferreira L., Molina J.C., Brasil C. and Andrade G. 2003. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticidal protein effects on soil microorganisms. *Plant and Soil* 256: 161-168.

Flores S., Saxena D. and Stotzky G. 2005. Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1073-1082.

Forcada C., Alcacer E., Garcera M.D. and Martinez R. 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31: 257-272.

Forcada C., Alcacer E., Garcera M.D., Tato A. and Martinez R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42: 51-63.

Francis B.R. and Bulla L.A. 1997. Further characterization of BT-R1, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 541-550.

Fu Q., Hu H., Chen S., Huang Q. and Liang W. 2007. Adsorption of insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by some Chinese soils: effects of organic acid ligands addition. *Plant and Soil* 296: 35-41.

Fujimoto H., Itoh K., Yamamoto M., Kyojuka J. and Shimamoto K. 1993. Insect-resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio-Technology* 11: 1151-1155.

Gahan L.J., Gould F. and Heckel D.G. 2001. Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293: 857-860.

Galitsky N., Cody V., Wojtczak A., Ghosh D., Luft J.R., Pangborn W. and English L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 57: 1101-1109.

Gao Y., Fencil K.J., Xu X., Schwedler D.A., Gilbert J.R. and Herman R.A. 2006. Purification and Characterization of a Chimeric Cry1F delta-Endotoxin Expressed in Transgenic Cotton Plants. pp 829-835.

Gao Y., Schafer B.W., Collins R.A., Herman R.A., Xu X., Gilbert J.R., Ni W., Langer V.L. and Tagliani L.A. 2004. Characterization of Cry34Ab1 and Cry35Ab1

Insecticidal Crystal Proteins Expressed in Transgenic Corn Plants and *Pseudomonas fluorescens*. pp 8057-8065.

Gaspers P.B., Robertson C.R. and Gast A.P. 1994. Enzymes on Immobilized Substrate Surfaces: Diffusion. *Langmuir* 10: 2699-2704.

Ge A., Rivers D., Milne R. and Dean D. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *Journal of Biological Chemistry* 266: 17954-17958.

Genovesi S., Leita L., Sequi P., Andrighetto I., Sorgato M.C. and Bertoli A. 2007. Direct Detection of Soil-Bound Prions. *PLoS ONE* 2: e1069.

Giles C.H., D'Silva A.P. and Easton I.A. 1974. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm: Part. II. Experimental interpretation. *Journal of Colloid and Interface Science* 47: 766-778.

Gomez I., Dean D.H., Bravo A. and Soberon M. 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 Cy1Ab toxin. *Biochemistry* 42: 10482-10489.

Gomez I., Miranda-Rios J., Rudino-Pinera E., Oltean D.I., Gill S.S., Bravo A. and Soberon M. 2002a. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope (HITDTNKNK876)-H-869 in *Manduca sexta* Bt-R-1 receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Journal of Biological Chemistry* 277: 30137-30143.

Gomez I., Oltean D.I., Gill S.S., Bravo A. and Soberon M. 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *Journal of Biological Chemistry* 276: 28906-28912.

Gomez I., Sanchez J., Miranda R., Bravo A. and Soberon M. 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 Letters* 513: 242-246.

Gould F., Anderson A., Reynolds A., Bumgarner L. and Moar W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology* 88: 1545-1559.

Greenplate J.T., Penn S.R., Shappley Z., Oppenhuizen M., Mann J., Reich B. and Osborn J. 2000. Bollgard II efficacy: quantification of total lepidopteran activity in a 2-gene product. 2000 Proceedings Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, USA, 4-8 January, 2000: Volume 2, pp 1041-1043.

Griego V.M. and Spence K.D. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Applied and Environmental Microbiology* 35: 906-910.

Griffiths B.S., Caul S., Thompson J., Birch A.N.E., Scrimgeour C., Andersen M.N., Cortet J., Messean A., Sausse C., Lacroix B. and Krogh P.H. 2005. A comparison of

soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* is CryIAb toxin. *Plant and Soil* 275: 135-146.

Griffiths B.S., Caul S., Thompson J., Birch A.N.E., Scrimgeour C., Cortet J., Foggo A., Hackett C.A. and Krogh P.H. 2006. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *Journal of Environmental Quality* 35: 734-741.

Grochulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai M., Schwartz J.L., Brousseau R. and Cygler M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIa(a) insecticidal toxin - crystal structure and channel formation. *Journal of Molecular Biology* 254: 447-464.

Guereca L. and Bravo A. 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1429: 342-350.

Haidacher D., Vailaya A. and Horváth C. 1996. Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 2290-2295.

Hastowo S., Lay B.W. and Ohba M. 1992. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 108-113.

Haynes C.A. and Norde W. 1994. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2: 517-566.

Head G., Surber J.B., Watson J.A., Martin J.W. and Duan J.J. 2002. No detection of CryIAc protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. *Environmental Entomology* 31: 30-36.

Helassa N., Quiquampoix H., Noinville S., Szponarski W. and Staunton S. 2009. Adsorption and desorption of monomeric Bt (*Bacillus thuringiensis*) CryIAa toxin on montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 498-504.

Herman R.A., Wolt J.D. and Halliday W.R. 2002. Rapid degradation of the CryIF insecticidal crystal protein in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7076-7078.

Herrero S., Oppert B. and Ferre J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1085-1089.

Hodgman T.C. and Ellar D.J. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by computational analysis. *DNA Sequence* 1: 97-106.

Hodgson E. 2001. Genetically Modified Plants and Human Health Risks: Can Additional Research Reduce Uncertainties and Increase Public Confidence? , pp 153-156.

Hofmann C. and Luthy P. 1986. Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin to invertebrate cells. *Archives of Microbiology* V146: 7-11.

- Hofmann C., Luthy P., Hutter R. and Pliska V. 1988a. Binding of the δ endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush- border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur J Biochem 173: 85-91.
- Hofmann C., Vanderbruggen H., Hofte H., Rie J.V., Jansens S. and Mellaert H.V. 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. PNAS 85: 7844-7848.
- Höfte H. and Whiteley H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 53: 242-255.
- Hopkins D.W. and Gregorich E.G. 2003. Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. European Journal of Soil Science 54: 793-800.
- Hossain F., Pray C.E., Lu Y.M., Huang J.K. and Fan C.H. 2004. Genetically modified cotton and farmers' health in China. International Journal of Occupational and Environmental Health 10: 296-303.
- Hu J., Li S. and Liu B. 2005. Adsorption of BSA onto sulfonated microspheres. Biochemical Engineering Journal 23: 259-263.
- Hudson N., Baker A. and Reynolds D. 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - a review. River Research and Applications 23: 631-649.
- Icoz I. and Stotzky G. 2007. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. Transgenic Research.
- Icoz I. and Stotzky G. 2008. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 40: 559-586.
- Ishiwata S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114: 1-5.
- James C. 2007. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Brief No 37, Ithaca, NY.
- Jarrett P. and Stephenson M. 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. Applied and Environmental Microbiology 56: 1608-1614.
- Jenkins J.L. and Dean D.H. 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. Genet Eng (NY) 22: 33-54.
- Jenkins J.L., Lee M.K., Sangadala S., Adang M.J. and Dean D.H. 1999. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. FEBS Letters 462: 373-376.

- Jenkins J.L., Lee M.K., Valaitis A.P., Curtiss A. and Dean D.H. 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to Gypsy moth aminopeptidase N Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 275: 14423-14431.
- Jin R.G., Liu Y.B., Tabashnik B.E. and Borthakur D. 2000. Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36: 231-237.
- Johnson D.E. and McGaughey W.H. 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Current Microbiology* 33: 54-59.
- Johnston K.A., Lee M.J., Brough G., Hilder V.A., Gatehouse A.M.R. and Gatehouse J.A. 1995. Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens* - Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25: 375-383.
- Jurat-Fuentes J.L. and Adang M.J. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry* 271: 3127-3135.
- Jurat-Fuentes J.L., Gould F.L. and Adang M.J. 2002. Altered Glycosylation of 63- and 68-Kilodalton Microvillar Proteins in *Heliothis virescens* Correlates with Reduced Cry1 Toxin Binding, Decreased Pore Formation, and Increased Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxins. *Appl Environ Microbiol* 68: 5711-5717.
- Kaelin P., Morel P. and Gadani F. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricornis* (F.). *Applied and Environmental Microbiology* 60: 19-25.
- Kaestli M., Mayo M., Harrington G., Watt F., Hill J., Gal D. and Currie B.J. 2007. Sensitive and Specific Molecular Detection of *Burkholderia pseudomallei*, the Causative Agent of Melioidosis, in the Soil of Tropical Northern Australia. *Appl Environ Microbiol* 73: 6891-6897.
- Keeton T.P. and Bulla L.A. 1997. Ligand specificity and affinity of BT-R1, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3419-3425.
- Kleber M. 2007. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* 85: 9-24.
- Kleber M., Sollins P. and Sutton R. 2007. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry* 85: 9-24.
- Knight P.J.K., Crickmore N. and Ellar D.J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology* 11: 429-436.

Knowles B.H. 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -Endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, Vol 24, pp 275-308.

Kodaka M. 2004. Interpretation of concentration-dependence in aggregation kinetics. *Biophysical Chemistry* 109: 325-332.

Koskella J. and Stotzky G. 1997. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3561-3568.

Koskella J. and Stotzky G. 2002. Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subspp. *kurstaki*, *morrisoni* (strain *tenebrionis*), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 262-267.

Kowalchuk G.A., Bruinsma M. and van Veen J.A. 2003. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 403-410.

Koziel M.G., Beland G.L., Bowman C., Carozzi N.B., Crenshaw R., Crossland L., Dawson J., Desai N., Hill M., Kadwell S., Launis K., Lewis K., Maddox D., McPherson K., Meghji M.R., Merlin E., Rhodes R., Warren G.W., Wright M. and Evola S.V. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio-Technology* 11: 194-200.

Kranthi K.R., Jadhav D., Wanjari R., Kranthi S. and Russell D. 2001. Pyrethroid resistance and mechanisms of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 94: 253-263.

Lakowicz J.R. 2006. Quenching of Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer

Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, pp 277-330.

Lecadet M.M. and Dedonder R. 1967. Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* I. Preparation and fractionation of the lysates. *Journal of Invertebrate Pathology* 9: 310-321.

Lee L., Saxena D. and Stotzky G. 2003. Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4111-4115.

Lee M.K., Rajamohan F., Gould F. and Dean D.H. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* cryIA δ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3836-3842.

Li H.Y., Ng E.K.O., Lee S.M.Y., Kotaka M., Tsui S.K.W., Lee C.Y., Fung K.P. and Waye M.M.Y. 2001a. Protein-protein interaction of FHL3 with FHL2 and visualization of their interaction by green fluorescent proteins (GFP) two-fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Journal of Cellular Biochemistry* 80: 293-303.

- Li J., Carroll J. and Ellar D.J. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.
- Li J., Derbyshire D.J., Promdonkoy B. and Ellar D.J. 2001b. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochemical Society Transactions* 29: 571-577.
- Li M., Tsai S.F., Rosen S.M., Wu R.S., Reddy K.B., DiCesare J. and Salamone S.J. 2001c. Preparation of Pentachlorophenol Derivatives and Development of a Microparticle-Based On-Site Immunoassay for the Detection of PCP in Soil Samples. *J Agric Food Chem* 49: 1287-1292.
- Li W., Wu Y.-J., Qin D.-M., Ma Y., Sun Y.-J. and Qiu S.-P. 2008. A Method for Quantifying Azoxystrobin Residues in Grapes and Soil Using GC with Electron Capture Detection. *Chromatographia* 67: 761-766.
- Llewellyn D., Cousins Y., Mathews A., Hartweck L. and Lyon B. 1994. Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes in transgenic crop plants. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 85-93.
- Lord J.C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 19-29.
- Lorence A., Darszon A., Diaz C., Lievano A., Quintero R. and Bravo A. 1995. δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush-border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Letters* 360: 217-222.
- Loseva O., Ibrahim M., Candas M., Koller C.N., Bauer L.S. and Bulla Jr. L.A. 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 567-577.
- Losey J.E., Rayor L.S. and Carter M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399: 214-214.
- Luo K., Lu Y.-J. and Adang M.J. 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 Biochemistry and Molecular Biology* 26: 783-791.
- Luo K., Sangadala S., Masson L., Mazza A., Brousseau R. and Adang M.J. 1997. The *Heliothis virescens* 170kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 735-743.
- MacKinnon R. and Miller C. 1989. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245: 1382-1385.
- MacKinnon R. and Yellen G. 1990. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* 250: 276-279.
- Manachini B. and Lozzia G.C. 2002. First investigations into the effects of Bt corn crop on Nematofauna. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura* 34: 85-96.

- Marchetti E. 2007. Persistence of Cry toxins and cry genes from genetically modified plants in two agricultural soils. *Agronomy for Sustainable Development* 27: 231-236.
- Mark E. Whalon B.A.W. 2003. Bt: Mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54: 200-211.
- Martin F.G. and Wolfersberger M.G. 1995. *Bacillus thuringiensis* δ -tndotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane-vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *Journal of Experimental Biology* 198: 91-96.
- Martin P.A.W. and Travers R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2437-2442.
- Martinez-Ramirez A.C., Gould F. and Ferre J. 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology* 9: 239-246.
- Masson L., Lun Y.J., Mazza A., Brousseau R. and Adang M.J. 1995. The CryIa(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *Journal of Biological Chemistry* 270: 20309-20315.
- Masson L., Mazza A., Sangadala S., Adang M.J. and Brousseau R. 2002. Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1594: 266-275.
- McGaughey W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.
- McGaughey W.H. and Whalon M.E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258: 1451-1455.
- McGuire M.R., Shasha B.S., Lewis L.C., Bartelt R.J. and Kinney K. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* 83: 2207-2210.
- McNall R.J. and Adang M.J. 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 999-1010.
- Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarrett P. and Burges H.D. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1344-1350.
- Meechai N., Jamieson A.M. and Blackwell J. 1999. Translational Diffusion Coefficients of Bovine Serum Albumin in Aqueous Solution at High Ionic Strength. *Journal of Colloid and Interface Science* 218: 167-175.

- Milne R. and Kaplan H. 1993. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23: 663-673.
- Miyasono M., Inagaki S., Yamamoto M., Ohba K., Ishiguro T., Takeda R. and Hayashi Y. 1994. Enhancement of δ -endotoxin activity by toxin-free Spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 111-112.
- Moar W.J., Pusztai M., Vanfaassen H., Bosch D., Frutos R., Rang C., Luo K. and Adang M.J. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera, Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2086-2092.
- Moar W.J., Trumble J.T. and Federici B.A. 1989. Comparative toxicity of spores and crystals from the NRD-12 and HD-1 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to neonate beet armyworm (Lepidoptera: noctuidae). *Journal of economic entomology* 82: 1593-1603.
- Morin S., Biggs R.W., Sisterson M.S., Shriver L., Ellers-Kirk C., Higginson D., Holley D., Gahan L.J., Heckel D.G., Carriere Y., Dennehy T.J., Brown J.K. and Tabashnik B.E. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5004-5009.
- Morse R.J., Yamamoto T. and Stroud R.M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9: 409-417.
- Muchaonyerwa P., Chenu C., Pantani O.L., Calamai L., Nyamugafata P. and Mpeperek S. 2002. Adsorption of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *tenebrionis* to clay fractions of tropical soils. *Developments in Soil Science*. Elsevier, pp 59-68.
- Muchaonyerwa P., Chevallier T., Pantani O.L., Nyamugafata P., Mpeperek S. and Chenu C. 2006. Adsorption of the pesticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* on tropical soils and their particle-size fractions. *Geoderma* 133: 244-257.
- Muchaonyerwa P., Waladde S., Nyamugafata P., Mpeperek S. and Ristori G.G. 2004. Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. *Plant and Soil* 266: 41-46.
- Munoz-Garay C., Sanchez J., Darszon A., de Maagd R.A., Bakker P., Soberon M. and Bravo A. 2006. Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different cry toxins. *Journal of Membrane Biology* 212: 61-68.
- Naderi A., Makuska R. and Claesson P.M. 2008. Interactions between bottle-brush polyelectrolyte layers: Effects of ionic strength and oppositely charged surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science* 323: 191-202.

Naef A., Zesiger T. and Defago G. 2006. Impact of transgenic Bt maize residues on the mycotoxigenic plant pathogen *Fusarium graminearum* and the biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. *Journal of Environmental Quality* 35: 1001-1009.

Nagamatsu Y., Itai Y., Hatanaka C., Funatsu G. and Hayashi K. 1984. A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agricultural and Biological Chemistry* 48: 611-619.

Natividad K.D.T., Nomura N. and Matsumura M. 2008. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *Journal of Virological Methods* 149: 28-34.

Nayak P., Basu D., Das S., Basu A., Ghosh D., Ramakrishnan N.A., Ghosh M. and Sen S.K. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAc δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 2111-2116.

Noinville S., Revault M., Helassa N., Quiquampoix H., Dejardin P. and Staunton S. 2008. Prevention from oligomerisation of Cry1Aa toxin by adsorption on montmorillonite. unpublished.

Novillo C., Castanera P. and Ortego F. 1997. Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 36: 181-201.

Obrycki J.J., Losey J.E., Taylor O.R. and Jesse L.C.H. 2001. Transgenic insecticidal corn: Beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *Bioscience* 51: 353-361.

Oerke E.-C. and Dehne H.-W. 1997. Global crop production and the efficacy of crop protection - current situation and future trends. *European Journal of Plant Pathology* 103: 203-215.

Ojcius D.M. and Young J.D.E. 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends in Biochemical Sciences* 16: 225-229.

Oppert B., Kramer K.J., Johnson D., Upton S.J. and McGaughey W.H. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 571-583.

Orejuela E. and Silva M. 2005. Rapid and sensitive determination of phosphorus-containing amino acid herbicides in soil samples by capillary zone electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection. *ELECTROPHORESIS* 26: 4478-4485.

Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. and Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption-coefficient of a protein. *Protein Science* 4: 2411-2423.

Pagel-Wieder S., Niemeyer J., Fischer W.R. and Gessler F. 2007. Effects of physical and chemical properties of soils on adsorption of the insecticidal protein (Cry1Ab) from *Bacillus thuringiensis* at Cry1Ab protein concentrations relevant for experimental field sites. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 3034-3042.

- Palm C.J., Donegan K., Harris D. and Seidler R.J. 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. *Molecular Ecology* 3: 145-151.
- Palm C.J., Schaller D.L., Donegan K.K. and Seidler R.J. 1996. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1258-1262.
- Pardo-Lopez L., Gomez I., Rausell C., Sanchez J., Soberon M. and Bravo A. 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45: 10329-10336.
- Parker M.W. and Feil S.C. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88: 91-142.
- Perlak F.J., Deaton R.W., Armstrong T.A., Fuchs R.L., Sims S.R., Greenplate J.T. and Fischhoff D.A. 1990. Insect Resistant Cotton Plants. 8: 939-943.
- Perlak F.J., Stone T.B., Muskopf Y.M., Petersen L.J., Parker G.B., McPherson S.A., Wyman J., Love S., Reed G., Biever D. and Fischhoff D.A. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology* V22: 313-321.
- Peterson A.M., Fernando G.J.P. and Wells M.A. 1995. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25: 765-774.
- Poncet S., Delecluse A., Klier A. and Rapoport G. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 131-135.
- Pont B. and Nentwig W. 2005. Quantification of Bt-protein digestion and excretion by the primary decomposer *Porcellio scaber*, fed with two Bt-corn varieties. *Biocontrol Science and Technology* 15: 341-352.
- Powers E.T. and Powers D.L. 2006. The kinetics of nucleated polymerizations at high concentrations: Amyloid fibril formation near and above the "supercritical concentration". *Biophys J* 91: 122-132.
- Pray C.E., Huang J.K., Hu R.F. and Rozelle S. 2002. Five years of Bt cotton in China - the benefits continue. *Plant Journal* 31: 423-430.
- Quiquampoix H. 1987. A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a [β]-glucosidase adsorbed on different mineral surfaces. *Biochimie* 69: 753-763.
- Quiquampoix H. 2000. Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil. In: Bollag J. and Stotzky G. (eds) *Soil Biochemistry*, pp 171-206.

Quiquampoix H. 2008. Enzymes and Proteins, Interactions with Soil-Constituent Surfaces. Encyclopedia of Soil Science, pp 210-216.

Quiquampoix H., Abadie J., Baron M.H., Leprince F., MatumotoPintro P.T., Ratcliffe R.G. and Staunton S. 1995. Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces. Proteins at Interfaces II, pp 321-333.

Quiquampoix H. and Burns R.G. 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: Environmental and health consequences. Elements 3: 401-406.

Quiquampoix H. and Ratcliffe R.G. 1992. A ^{31}P NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation Mn^{2+} : modification of conformation with pH. Journal of Colloid and Interface Science 148: 343-352.

Quiquampoix H., Servagent-Noinville S. and Baron M.H. 2002. Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. Marcel Dekker, New York, pp 285-306.

Quiquampoix H., Staunton S., Baron M.H. and Ratcliffe R.G. 1993. Interpretation of the pH-dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme-activity in soil. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 75: 85-93.

Rampersad J., Khan A. and Ammons D. 2003. A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. Current Microbiology 47: 355-357.

Rausell C., Garcia-Robles I., Sanchez J., Munoz-Garay C., Martinez-Ramirez A.C., Real M.D. and Bravo A. 2004a. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1660: 99-105.

Rausell C., Munoz-Garay C., Miranda-CassoLuengo R., Gomez I., Rudino-Pinera E., Soberon M. and Bravo A. 2004b. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. Biochemistry 43: 166-174.

Ravoahangimalala O., Charles J.-F. and Schoeller-Raccaud J. 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). Research in Microbiology 144: 271-278.

Reits E.A.J. and Neeffjes J.J. 2001. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. Nat Cell Biol 3: E145-E147.

Rice P.J., Rice P.J., Arthur E.L. and Barefoot A.C. 2007. Advances in Pesticide Environmental Fate and Exposure Assessments. J Agric Food Chem 55: 5367-5376.

Rigou P., Rezaei H., Grosclaude J., Staunton S. and Quiquampoix H. 2006. Fate of prions in soil: Adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion

protein from montmorillonite and natural soils. *Environmental Science & Technology* 40: 1497-1503.

Rojas O.J., Ernstsson M., Neuman R.D. and Claesson P.M. 2002. Effect of polyelectrolyte charge density on the adsorption and desorption behavior on mica. *Langmuir* 18: 1604-1612.

Romeis J., Meissle M. and Bigler F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.

Roush R.T. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis* - Can transgenic crops be better than sprays. *Biocontrol Science and Technology* 4: 501-516.

Roush R.T. 1998. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 353: 1777-1786.

Rouxhet P.G., Caillou S., Nonckreman C.J., Alves A. and Gerin P.A. 2005. Enzymes et micro-organismes aux interfaces : mécanismes physico-chimiques et propriétés. *Matériaux et Techniques* 93: 13-26.

Rui Y.K., Yi G.X., Zhao J., Wang B.M., Li Z.H., Zhai Z.X., He Z.P. and Li Q.X. 2005. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 1279-1284.

Salm T., Bosch D., Honée G., Feng L., Munsterman E., Bakker P., Stiekema W.J. and Visser B. 1994. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* cryIA(b) and cryIC genes: a resistance management strategy. *Plant Molecular Biology* 26: 51-59.

Sangadala S., Walters F., English L. and Adang M. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)- K⁺ efflux in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 269: 10088-10092.

Saxena D., Flores S. and Stotzky G. 1999. Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402: 480-480.

Saxena D., Flores S. and Stotzky G. 2002a. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 133-137.

Saxena D., Flores S. and Stotzky G. 2002b. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 111-120.

Saxena D., Stewart C.N., Altosaar I., Shu Q. and Stotzky G. 2004. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B.*

thuringiensis corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 383-387.

Saxena D. and Stotzky G. 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ*. *FEMS Microbiology Ecology* 33: 35-39.

Saxena D. and Stotzky G. 2001a. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1225-1230.

Saxena D. and Stotzky G. 2001b. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany* 88: 1704-1706.

Saxena D. and Stotzky G. 2001c. Bt toxin uptake from soil by plants. *Nature Biotechnology* 19: 199-199.

Saxena D. and Stotzky G. 2002. Bt toxin is not taken up from soil or hydroponic culture by corn, carrot, radish, or turnip. *Plant and Soil* 239: 165-172.

Schlessinger J., Koppel D.E., Axelrod D., Jacobson K., Webb W.W. and Elson E.L. 1976. Lateral transport on cell membranes: mobility of concanavalin A receptors on myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 2409-2413.

Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R. and Dean D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.

Schnepf H., Tomczak K., Ortega J. and Whiteley H. 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 20923-20930.

Schuler B. and Eaton W.A. 2008. Protein folding studied by single-molecule FRET. *Current Opinion in Structural Biology* 18: 16-26.

Schwartz J.-L., Juteau M., Grochulski P., Cygler M., Prefontaine G., Brousseau R. and Masson L. 1997a. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Letters* 410: 397-402.

Schwartz J.L., Potvin L., Chen X.J., Brousseau R., Laprade R. and Dean D.H. 1997b. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by CryIAa, a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3978-3984.

Servagent-Noinville S., Revault M., Quiquampoix H. and Baron M.-H. 2000. Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 221: 273-283.

Shan G., Embrey S.K., Herman R.A. and McCormick R. 2008. Cry1F protein not detected in soil after three years of transgenic Bt corn (1507 corn) use. *Environmental Entomology* 37: 255-262.

Shelton A.M., Tang J.D., Roush R.T., Metz T.D. and Earle E.D. 2000. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotechnology* 18: 339-342.

Shelton A.M., Zhao J.Z. and Roush R.T. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47: 845-881.

Shen R.F., Cai H. and Gong W.H. 2006. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. *Plant and Soil* 285: 149-159.

Sims S.R. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* CryIA(c) protein expressed in transgenic cotton: Effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist* 20: 493-500.

Sims S.R. and Berberich S.A. 1996. *Bacillus thuringiensis* CryIA protein levels in raw and processed seed of transgenic cotton: Determination using insect bioassay and ELISA. *Journal of Economic Entomology* 89: 247-251.

Sims S.R., Berberich S.A., Nida D.L., Segalini L.L., Leach J.N., Ebert C.C. and Fuchs R.L. 1996. Analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. *Crop Science* 36: 1212-1216.

Sims S.R. and Holden L.R. 1996a. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissue. *Environmental Entomology* 25: 659-664.

Sims S.R. and Holden L.R. 1996b. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissue. *Environmental Entomology* 25: 659-664.

Sims S.R. and Martin J.W. 1997. Effect of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins CryIA(b), CryIA(c), CryIIA, and CryIIIA on *Folsomia candida* and *Xenylla grisea* (Insecta: Collembola). *Pedobiologia* 41: 412-416.

Sims S.R. and Ream J.E. 1997. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: Laboratory microcosm and field studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1502-1505.

Slatin S.L., Abrams C.K. and English L. 1990. δ -endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 169: 765-772.

Smith R.A. and Couche G.A. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 311-315.

Staunton S. and Quiquampoix H. 1994. Adsorption and Conformation of Bovine Serum Albumin on Montmorillonite: Modification of the Balance between Hydrophobic and Electrostatic Interactions by Protein Methylation and pH Variation. *Journal of Colloid and Interface Science* 166: 89-94.

Stotzky G. 2000. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *Journal of Environmental Quality* 29: 691-705.

Stotzky G. 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil* 266: 77-89.

Stradner A., Sedgwick H., Cardinaux F., Poon W.C.K., Egelhaaf S.U. and Schurtenberger P. 2004. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* 432: 492-495.

Sun C.X., Chen L.J., Wu Z.J., Zhou L.K. and Shimizu H. 2007. Soil persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin from transgenic Bt cotton tissues and its effect on soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils* 43: 617-620.

Sundaram K.M.S. 1996. Sorptive interactions and binding of δ -endotoxin protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in forest soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 31: 1321-1340.

Tabashnik B., Finson N., Groeters F., Moar W., Johnson M., Luo K. and Adang M. 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *PNAS* 91: 4120-4124.

Tabashnik B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39: 47-79.

Tabashnik B.E., Liu Y.-B., Malvar T., Heckel D.G., Masson L., Ballester V., Granero F., Mensua J.L. and Ferre J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *PNAS* 94: 12780-12785.

Tang J.D., Shelton A.M., VanRie J., DeRoeck S., Moar W.J., Roush R.T. and Peferoen M. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology* 62: 564-569.

Tapp H., Calamai L. and Stotzky G. 1994. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 663-679.

Tapp H. and Stotzky G. 1995a. Dot-blot enzyme-linked-immunosorbent-assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 602-609.

Tapp H. and Stotzky G. 1995b. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1786-1790.

Tapp H. and Stotzky G. 1997. Monitoring the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil with flow cytometry. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 1074-1078.

Tapp H. and Stotzky G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 471-476.

Theng B.K.G. 1979. *Formation and Properties of Clay-Polymer Complexes*. Amsterdam, 362 pp.

Tilton R.D., Gast A.P. and Robertson C.R. 1990a. Surface diffusion of interacting proteins. Effect of concentration on the lateral mobility of adsorbed bovine serum albumin. *Biophys J* 58: 1321-1326.

Tilton R.D., Robertson C.R. and Gast A.P. 1990b. Lateral diffusion of bovine serum albumin adsorbed at the solid-liquid interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 137: 192-203.

Tojo A. and Aizawa K. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 576-580.

Trevors J.T. 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26: 53-59.

Turrini A., Sbrana C., Nuti M.P., Pietrangeli B.M. and Giovannetti M. 2004. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 266: 69-75.

Vadlamudi R., Ji T. and Bulla L., Jr. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 12334-12340.

Vadlamudi R.K., Weber E., Ji I., Ji T.H. and Bulla L.A., Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 5490-5494.

Valaitis A.P., Jenkins J.L., Lee M.K., Dean D.H. and Garner K.J. 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 46: 186-200.

Valaitis A.P., Lee M.K., Rajamohan F. and Dean D.H. 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 Biochemistry and Molecular Biology* 25: 1143-1151.

Valaitis A.P., Mazza A., Brousseau R. and Masson L. 1997. Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 529-539.

Van Frankenhuyzen K., Gringorten J.L., Milne R.E., Gauthier D., Pusztai M., Brousseau R. and Masson L. 1991. Specificity of activated CryIA Proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest lepidoptera. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1650-1655.

Van Rie J., Jansens S., Hofte H., Degheele D. and Van Mellaert H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *European Journal of Biochemistry* 186: 239-247.

Van Rie J., McGaughey W.H., Johnson D.E., Barnett B.D. and Van Mellaert H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247: 72-74.

Vasina E.N., Dejardin P., Rezaei H., Grosclaude J. and Quiquampoix H. 2005. Fate of prions in soil: Adsorption kinetics of recombinant unglycosylated ovine prion protein onto mica in laminar flow conditions and subsequent desorption. *Biomacromolecules* 6: 3425-3432.

Venkateswerlu G. and Stotzky G. 1992. Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay-minerals. *Current Microbiology* 25: 225-233.

Vercesi M.L., Krogh P.H. and Holmstrup M. 2006. Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology* 32: 180-187.

Wang H.Y., Ye Q.F., Wang W., Wu L.C. and Wu W.X. 2006. Cry1Ab protein from Bt transgenic rice does not residue in rhizosphere soil. *Environmental Pollution* 143: 449-455.

Wang Y., Shimodaira J., Miyasaka T., Morimoto S., Oomori T., Ogawa N., Fukuda M. and Fujii T. 2008. Detection of bphAa Gene Expression of *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 in Soil Using a New Method of RNA Preparation from Soil. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72: 694-701.

Watkinson I. 1994. Global view of present and future markets for Bt products. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 49: 3-7.

West A.W., Burges H.D., White R.J. and Wyborn C.H. 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *Journal of Invertebrate Pathology* 44: 128-133.

Wolfersberger M.G. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 46: 475-477.

- Wolfersberger M.G., Chen X.J. and Dean D.H. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 279-282.
- Wright D.J., Iqbal M., Granero F. and Ferre J. 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1814-1819.
- Wu D., Johnson J.J. and Federici B.A. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* 13: 965-972.
- Wu W.-x., Ye Q.-f. and Min H. 2004a. Effect of straws from Bt-transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. *European Journal of Soil Biology* 40: 15-22.
- Wu W.X., Ye Q.F. and Min H. 2004b. Effect of straws from Bt-transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. *European Journal of Soil Biology* 40: 15-22.
- Wu W.X., Ye Q.F., Min H., Duan X.J. and Jin W.M. 2004c. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 289-295.
- Xie R.Y., Zhuang M.B., Ross L.S., Gomez I., Oltean D.I., Bravo A., Soberon M. and Gill S.S. 2005. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *Journal of Biological Chemistry* 280: 8416-8425.
- Xu X.J., Yu L.Y. and Wu Y.D. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 948-954.
- Xue K., Luo H.F., Qi H.Y. and Zhang H.X. 2005. Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzing by PLFA. *Journal of Environmental Sciences-China* 17: 130-134.
- Yool A.J. 1994. Block of the inactivating potassium channel by clofilium and hydroxylamine depends on the sequence of the pore region. *Molecular Pharmacology* 46: 970-976.
- Yu L., Berry R.E. and Croft B.A. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae). *Journal of Economic Entomology* 90: 113-118.
- Yuan Y., Velez O.D. and Lenhoff A.M. 2003. Mobility of Adsorbed Proteins Studied by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Langmuir* 19: 3705-3711.

Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M. and Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2: 2143-2150.

Zhao J., Rui C., Lu M., Fan X., Ru L. and Meng X. 2000. Monitoring and management of *Helicoverpa armigera* resistance to transgenic Bt cotton in Northern China. *Resistant Pest Management* 11: 28-31.

Zhao J.Z., Fan Y.L., Fan X.L., Shi X.P. and Lu M.G. 1999. Evaluation of transgenic tobacco expressing two insecticidal genes to delay resistance development of *Helicoverpa armigera*. *Chinese Science Bulletin* 44: 1871-1874.

Zhou X., Huang Q., Chen S. and Yu Z. 2005. Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil. *Applied Clay Science* 30: 87-93.

Zhou X.Y., Huang Q.Y., Cai P. and Yu Z.N. 2007. Adsorption and insecticidal activity of toxin from *Bacillus thuringiensis* on rectorite. *Pedosphere* 17: 513-521.

Zwahlen C., Hilbeck A., Gugerli P. and Nentwig W. 2003a. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12: 765-775.

Zwahlen C., Hilbeck A., Howald R. and Nentwig W. 2003b. Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. (vol 12, pg 1077, 2003). *Molecular Ecology* 12: 2279-2279.