

2M11.3405.10

**Université de Montréal**

**Réponse transcriptionnelle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette à  
l'exposition sous-létale de la protoxine Cry1Ab du bacille de Thuringe**

**par**

**LILIANE MEUNIER**

**Département de Microbiologie et immunologie**

**Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de Maître ès sciences (M. Sc)  
en Microbiologie et immunologie**

**Décembre, 2005**

**© Liliane Meunier, 2005**



W

4

US8

2006

V089

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

**Université de Montréal**

**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé**

**Réponse transcriptionnelle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette à  
l'exposition sous-létale de la protoxine Cry1Ab du bacille de Thuringe**

**Présenté par**

**LILIANE MEUNIER**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes**

.....

**George Szatmari, Président-rapporteur**

.....

**Luke Masson, Directeur de recherche**

.....

**Roland Brousseau, Codirecteur de recherche**

.....

**Jean-Louis Schwartz, Membre du jury**

## Résumé

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*) est l'insecte ravageur des forêts de résineux le plus important d'Amérique du Nord. Les périodes d'épidémies sont contrôlées à l'aide d'une bactérie entomopathogène, *Bacillus thuringiensis*, qui produit des protéines cristallisées (Cry) ayant une activité insecticide. Même si les toxines Cry ont un spectre d'action restreint, leur toxicité est généralement évaluée par la mort de l'insecte exposé. Des effets sous-létaux sur des insectes non-ciblés ne sont pas apparents, mais pourraient être détectés au niveau moléculaire. En dressant un portrait de la réponse transcriptionnelle présente chez la larve lors d'une exposition à une dose sublétales de toxine Cry, nous pourrions déterminer si les gènes qui présentent des profils transcriptionnels altérés pourront être utilisés comme des marqueurs universels de stress reliés aux toxines Cry chez des insectes non ciblés. À cette fin, une librairie créée par hybridation suppressive soustractive (SSH) a été obtenue en utilisant deux populations de larves (témoin et exposée à la toxine Cry1Ab). La librairie transformée a été caractérisée en séquençant et en analysant 1091 clones ainsi qu'en attribuant des fonctions potentielles à ces gènes, lorsque c'était possible. L'analyse de l'expression différentielle chez certains clones sélectionnés par PCR quantitative ainsi que l'analyse des fonctions des gènes de la librairie soustractive nous indiquent que la réponse transcriptionnelle présente chez la larve exposée à une dose sublétales de toxine Cry est principalement reliée à une régulation métabolique.

**Mots clés :** *Bacillus thuringiensis*, *Choristoneura fumiferana*, hybridation soustractive, expression génique

## Summary

Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) larvae are destructive defoliators of North American forests where epidemic episodes result in major damage to spruce and balsam-fir trees. These episodes have been controlled by using formulations containing the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis* which contains crystal (Cry) proteins as the active intoxicating agent. Although Cry toxins have a relatively narrow host range, toxicity is generally measured by death of the insect. Sublethal effects on non-target insects are not readily apparent but could be assessed at a molecular level. By understanding the transcriptional response of the larvae to a sublethal Cry toxin dose, we can assess whether genes showing altered transcriptional profiles can be used as universal Cry toxin stress markers for non-target insects. To this end, a suppression subtractive hybridization library (SSH) was created using two larval populations (control and Cry1Ab toxin treated). The transformed library was characterized by sequencing 1091 clones and assigning putative protein functions to these genes where possible. Differential mRNA expression analysis of selected clones, assessed by quantitative-PCR, combined with functional gene analyses of the subtracted library, indicates that the transcriptional response when the larvae is exposed to a sublethal dose of Cry toxin is primarily related to metabolic gene regulation.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, *Choristoneura fumiferana*, subtractive hybridization, gene expression

## Table des matières

<b>Identification du jury.....</b>	<b>ii</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary.....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>xii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xv</b>
<b><i>SECTION I - Introduction.....</i></b>	<b>1</b>
<b>Recension de la littérature.....</b>	<b>2</b>
1.0 Insectes en général.....	2
1.1 Insectes nuisibles des plantes.....	2
1.2 Méthodes de contrôle: chimiques et biologiques.....	3
2.0 Le système immunitaire chez les insectes.....	5
3.0 Réponse non spécifique à un pathogène.....	7
4.0 Tordeuse des bourgeons de l'épinette, <i>Choristoneura fumiferana</i> .....	8
4.1 Historique des invasions en Amérique du Nord.....	8
4.2 Cycle de vie.....	9
4.3 Méthodes de gestion.....	11
5.0 <i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i> .....	13



5.1 Historique.....	13
5.2 Description.....	14
5.3 Cycle de vie du <i>Bt</i> .....	14
5.4 Les différentes toxines sécrétées par <i>Bt</i> .....	15
5.5 Mode d'action des toxines Cry.....	16
5.6 Les récepteurs de toxines Cry.....	18
5.7 Famille des gènes Cry.....	19
6.0 Utilisations de <i>Bt</i> : épandage et plantes transgéniques.....	21
6.1 Épandage.....	21
6.2 Plantes transgéniques <i>Bt</i> .....	22
7.0 Résistance au <i>Bt</i> .....	23
8.0 Exposition sublétales au <i>Bt</i> .....	25
8.1 Résistance des insectes cibles.....	25
8.2 Effets des doses sublétales chez les insectes non-cibles.....	26
<b>Problématique.....</b>	<b>28</b>
<b><i>Section II – Méthodologie et résultats.....</i></b>	<b>31</b>
<b>Article:</b> Transcriptional response of <i>Choristoneura fumiferana</i> to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	33
Abstract.....	34
Introduction.....	35
Results.....	37
Subtractive library analysis.....	37

Q-PCR analysis.....	39
Discussion.....	41
Experimental procedures.....	47
Insects and infection treatment.....	47
RNA extraction.....	47
Suppression subtractive hybridization.....	48
Subtracted library construction.....	49
Sequencing and analysis.....	49
Single-stranded cDNA synthesis.....	50
Single-stranded cDNA quantification.....	50
Data analysis.....	51
Acknowledgments.....	53
References.....	54
Tables.....	59
Figure.....	66
<b><i>Section III – Discussion</i></b> .....	<b>67</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>68</b>
1.0 Protocole experimental.....	70
1.1 Choix de la dose de toxine.....	70
1.2 Administration du traitement.....	70
2.0 Banque d'ADN complémentaire.....	72
3.0 Analyse des séquences.....	74

4.0 Profils d'expression.....	75
4.1 Gènes surexprimés.....	75
4.2 Gènes stables.....	79
4.3 Gènes réprimés.....	80
<b>Conclusion.....</b>	<b>82</b>
<b><i>Section IV - Bibliographie.....</i></b>	<b>84</b>

## Liste des tableaux

<b><i>Section II – Méthodologie et résultats</i></b> .....	31
<b>Article:</b> Transcriptional response of <i>Choristoneura fumiferana</i> to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	33
<i>Table 1. List of primers used in Q-PCR</i> .....	59
<i>Table 2. Molecular function distribution</i> .....	60
<i>Table 3. GenBank characterization of the SSH library (E-value &lt; <math>e^{-15}</math>)</i> .....	61
<i>Table 4. Relative expression ratio normalized with PLPA2 in each biological replicate</i> .....	65

## Liste des figures

<b>SECTION I - Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Recension de la littérature.....</b>	<b>2</b>
<i>Figure 1. Cycle de vie de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.....</i>	10
<i>Figure 2. Mode d'action de la toxine Cry au niveau de l'intestin moyen.....</i>	17
<b>Section II – Méthodologie et résultats.....</b>	<b>31</b>
<b>Article: Transcriptional response of <i>Choristoneura fumiferana</i> to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from <i>Bacillus thuringiensis</i>.....</b>	<b>33</b>
<i>Figure 1. Breakdown of the different known molecular functions in the subtractive library as assigned by the Gene Ontology software.....</i>	66

## Liste des sigles et abréviations

A	Adénine
ABC	ATP binding cassette
ADN (DNA)	Acide désoxyribonucléique (deoxyribonucleic acid)
ARN (RNA)	Acide ribonucléique (ribonucleic acid)
ATP	Adénosine triphosphate
BR	Réplikat biologique / Biological replicate
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Cytosine
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire / complementary deoxyribonucleic acid
<i>C. fumiferana</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>
Cp	Crossing point
Ct	Threshold cycle
Cry	Protéines intracellulaires cristallisées / Crystal toxins
Cyt	Protéines cytolytiques / cytolytic toxins
DDT	Dichloro-diphényl-trichloroéthane
DNase	Désoxyribonucléase/Desoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
ED	Dose effective / Effective dose
EST	Expression sequence tag
G	Guanine
IDGF	Insect-derived growth factor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
HSP	Protéine de choc thermique/ heat shock protein
L32	60S ribosomal protein L32

LB	Luria Bertani
LD	Dose létale / Lethal dose
mRNA	Acide ribonucléique messenger/Messenger ribonucleic acid
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne / Polymerase chain reaction
pH	Potentiel hydrogène
PLPA2	Acidic calcium-independent phospholipase A2
PO	Phénoloxidase
proPO	Prophénoloxidase
Q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RNase	Ribonucléase
RT-PCR	Transcriptase inverse - Réaction de polymérisation en chaîne / Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction
SERPIN	Serine protease inhibitors
SSH	Hybridation suppressive soustractive / suppressive subtractive hybridisation
T	Thymine

## Unités de mesure

C	Celcius
g	gramme
kDa	kiloDalton
kg	kilogramme
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
pb (bp)	paire de bases (base pairs)
s	seconde
U	unité
$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{l}$	microlitre
$\mu\text{M}$	micromolaire

## Symboles

°	degrés
$\pm$	plus ou moins
$\geq$	plus grand ou égal à...
$\leq$	plus petit ou égal à...
%	pourcent



## Remerciements

Je tiens à dire merci sincèrement à tous ceux et celles qui ont rendu ce projet de maîtrise réalisable, et plus particulièrement :

Luke Masson, pour sa confiance, son encadrement, ses blagues en anglais et pour être plus gentil qu'un simple patron.

Roland Brousseau, pour ses connaissances et enseignements ainsi que pour sa générosité.

Manuella Van Munster (ou simplement Manuela avec un seul « l » pour les intimes) qui a su être à la fois superviseur, correctrice et plus particulièrement une excellente amie durant toute la durée de ma maîtrise. Merci pour toutes ces soirées si bien arrosées!

Les membres du laboratoire de Génétique environnementale, chercheurs, collègues et amis(es), pour le partage de vos idées, de vos connaissances et pour tous les sujets de discussion. Et plus particulièrement, tous ceux qui ont rendu mon séjour à l'IRB si agréable : Alberto, Anick, Christine, Gabrielle, Guigui, Hugo, Jarek, Jason, Julie, Katia, Miria et Léa.

Merci à Francine, Daniel, Marc et Émilie qui sont beaucoup plus qu'une simple famille pour moi. Un gros merci à la belle petite Camille qui me fait rajeunir de 14 années chaque fois que je la vois.

Merci à mes amis les plus fous! Ils se reconnaîtront! Et plus particulièrement à Gene, Boubou et Martin qui ne changeront jamais même s'ils deviendront assurément des vedettes du grand Star System médical. Un gros merci pour votre grande folie.

Merci à Jocelyn, même si c'est très quétaine de remercier son amoureux... Merci de m'avoir soutenu surtout dans les derniers temps où je passais la majorité de mon temps assise devant Marcelin plutôt que d'être avec toi. Merci d'être toujours resté calme et de m'avoir réconfortée durant cette période assez chaotique.

Il ne faudrait pas oublier la personne avec qui j'ai passé mes derniers mois : le grand Marcelin, fier Mac si beau et si fort!

Le réseau Biocontrôle, pour leur soutien ainsi que pour m'avoir permis de me promener un peu partout en Amérique du Nord lors de divers congrès.

Et finalement, je remercie le CRSNG pour le financement de ce projet de maîtrise.

**SECTION I-Introduction**

## **Recension de la littérature**

### **1.0 Insectes en général**

Parmi le grand nombre d'espèces d'insectes présentes sur terre, certaines sont dites indispensables, comme les insectes pollinisateurs ou bénéfiques, tandis que d'autres sont considérées comme étant nuisibles en raison de dommages économiques en foresterie et en agriculture, ou bien des effets qu'elles peuvent avoir sur la santé humaine en tant que vecteurs de maladie (paludisme, dengue, virus du Nil...). Ainsi au point de vue agricole, plus du quart de la récolte mondiale est détruit chaque année par les insectes ravageurs, que ce soit au champ ou au stockage, et plus de 10 000 espèces d'insectes sont considérés comme étant responsables de ces dommages (Union des Industries de la Protection des Plantes-UIPP, <http://www.uipp.org>).

### **1.1 Insectes nuisibles des plantes**

Les insectes ravageurs des plantes peuvent causer des dommages directs ou indirects. Les effets directs sont attribués aux espèces se nourrissant des feuilles (insectes défoliateurs) ou des racines (insectes foreurs) tandis que les effets indirects sont attribuables en grande partie aux insectes piqueurs-suceurs vecteurs de maladies dont les agents sont des microorganismes comme des bactéries, des virus phytopathogènes ou des parasites (Almeida et Purcell, 2003; Sylvester, 1980).

Ainsi, dans les forêts, certains insectes sont considérés comme des fléaux dus à leur multiplication extraordinaire de façon occasionnelle pouvant causer des dommages énormes sur des étendues boisées. Seulement au Québec, les insectes ravageurs présents

dans les forêts entraînent des pertes de plus de 100 millions de mètres cube par année, un volume équivalent à plus de cinq fois la quantité d'exploitation forestière québécoise (Dale *et al.*, 2001).

## **1.2 Méthodes de contrôle : chimiques et biologiques**

Les pesticides chimiques comportent de nombreux inconvénients dont la persistance pour de longues périodes dans l'environnement, leurs larges spectres d'action, la résistance de la part des organismes ciblés ainsi que leurs effets à long terme (Kristiansen et Lewis, 1986). Les produits chimiques engendrent des problèmes au niveau de la culture mais également, ils peuvent mettre en danger l'équilibre écologique des cours d'eau ainsi que l'approvisionnement en eau potable (Dugal, 1986). C'est d'ailleurs pour ces raisons que les biopesticides et plus particulièrement les insecticides d'origines bactériennes constituent une excellente alternative à ces méthodes de contrôle chimique.

Un insecticide biologique se doit de comporter un ensemble de qualités qui sont difficiles à concilier : sélectivité et innocuité pour les mammifères et autres organismes non nuisibles, rapidité d'action, forte virulence, stabilité et production industrielle rentable (de Barjac, 1977). De ce fait, même si plusieurs entomopathogènes ont été utilisés dans des conditions contrôlées telles qu'au laboratoire ou dans le cadre de certaines conditions environnementales recréées (serres), seulement quelques uns présentent les caractéristiques requises pour une exploitation massive adéquate (Lacey et Goettel, 1995).

Le groupe de microorganismes qui sont spécifiquement pathogènes pour les insectes est très varié et constitue par conséquent autant de possibilités quant à leur utilisation comme biopesticides. Il contient entre autre un large éventail de virus (tels que les baculovirus (Szewczyk *et al.*, 2005)), de champignons (tels que *Metarhizium* spp. (Roberts et St Leger, 2004)) et de bactéries (tels que *Bacillus thuringiensis* (Aronson, Beckman, et Dunn, 1986)). Chacune de ces catégories est composée d'un large spectre d'organismes qui se distinguent par le mode d'infection, de réplication ainsi que par le mécanisme de pathogénicité. Les nématodes ont également un rôle pathogène envers diverses espèces d'insectes, agissant de concert avec certaines bactéries. Ils sont virulents pour leurs hôtes spécifiques mais ne produisent pas de substances hautement toxiques en soi (Falcon, 1971).

## 2.0 Le système immunitaire chez les insectes

Chez les invertébrés, les mécanismes de défense et de coagulation doivent se produire rapidement vu leur système circulatoire ouvert (Soderhall, Cerenius, et Johansson, 1994). Chez la plupart des animaux vertébrés, ces mécanismes sont maintenus par les cellules sanguines tandis que dans le cas des invertébrés ces fonctions de défense sont assurées par des cellules appelées hémocytes (Soderhall, Cerenius, et Johansson, 1994). Les hémocytes ont un rôle important dans les mécanismes de défense, puisqu'ils sont responsables de la phagocytose de divers agents pathogènes (Soderhall, Cerenius, et Johansson, 1994). De plus, les insectes n'ayant pas de système immunitaire acquis, leur système immunitaire inné est très efficace. Trois mécanismes de réactions semblent impliqués dans la réponse immunitaire innée chez les insectes: l'induction de cascades protéolytiques, les réactions de défenses cellulaires et la synthèse de peptides antimicrobiens (Hoffmann, Reichart, et Hetru, 1996).

Le système d'activation de la prophénoloxidase (proPO) en phénoloxidase (PO) fait partie de la première catégorie, il s'agit d'un mécanisme de cascades protéolytiques (Soderhall, 1982). La phénoloxidase catalyse les premières étapes du mécanisme de la formation de la mélanine, qui permettra l'encapsulation finale de l'agent pathogène (Soderhall et Cerenius, 1998; Ashida et Brey, 1998). Le mode d'action de ce système a été confirmé chez certains insectes (Ashida, Ishizaki, et Iwahana, 1983; Dularay et Lackie, 1985; Leonard, Soderhall, et Ratcliffe, 1985) ainsi que chez d'autres invertébrés (Jackson, Smith, et Peddie, 1993; Smith et Soderhall, 1991). Des produits bactériens comme les lipopolysaccharides et les peptidoglycanes sont des déclencheurs du système

proPO (Soderhall, Aspan, et Duvic, 1990; Yoshida, Ochiai, et Ashida, 1986). Notamment, une sérine protéase d'une taille de 36 kDa purifiée des cellules sanguines d'une espèce d'écrevisse clive la prophénoloxidasase en deux peptides de 60 et 62 kDa, ce qui déclenche l'activité des phénoloxidasases (Aspan et Soderhall, 1991). Par contre, le fonctionnement de ce système semble à ce jour plus ou moins clair. D'autres sérine protéases ont été isolées chez l'écrevisse, où certaines ont un rôle dans l'activation du système des proPO, tandis que d'autres n'ont aucune fonction connue (Aspan et Soderhall, 1991). Les sérines protéases ayant un rôle à l'amont du système des proPO, les inhibiteurs de sérines protéases (SERPIN) en possèdent également un qui est d'inhiber cette cascade (Cerenius et Soderhall, 2004). En ce qui concerne les réactions de défense cellulaires, elles consistent en général en une activité de phagocytose ou d'encapsulation d'un microorganisme invasif.

La synthèse de deux types de molécules antimicrobiennes est présente chez la plupart des insectes: des peptides cycliques contenant des ponts disulfures et des peptides linéaires exempts de cystéines. Ces molécules, comme les lysozymes, sont produites par les cellules de l'intestin et les glandes salivaires (Hoffmann, Reichart, et Hetru, 1996).

### 3.0 Réponse non spécifique à un pathogène

Plusieurs mécanismes de défense jouent un rôle important chez les insectes, sans être impliqués dans une réponse immunitaire spécifique. Les protéases digestives jouent un rôle crucial dans la pathogénèse des organismes microbiens (Wang, Li, et Granados, 2004). Les sérines protéases, qui sont les endopeptidases digestives majeures chez les larves de lépidoptères, ont été caractérisées chez un grand nombre d'insectes. Les exopeptidases englobent les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Leurs activités ont bien été identifiées au niveau de l'intestin moyen de diverses espèces de lépidoptères (Terra *et al.*, 1996). Ces sérines protéases auraient donc un rôle à la fois au niveau de la réponse immunitaire (dans la cascade protéolytique) ainsi qu'au niveau de la réponse non spécifique à un pathogène.

D'autres protéines impliquées dans un mécanisme de défense, les protéines de choc thermiques (HSP) sont synthétisées très rapidement au sein d'une cellule ayant subi une perturbation après exposition à un agent de stress dans l'environnement (Bendena *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 2000). Une grande variété de stress environnemental, incluant la chaleur (Schlesinger, 1990), le froid (Goto et Kimura, 1998), l'osmolarité (Kultz, 1996), les polluants organiques (Sanders *et al.*, 1991), l'exposition aux rayons ultraviolets (Nepple et Bachofen, 1997) et l'anoxie (Myrmel *et al.*, 1994) a été rapportée comme inducteur des HSP chez des organismes divers. Les HSP sont groupées dans diverses familles selon la taille de leur protéine (Lewis *et al.*, 1999). Les membres de certaines familles de HSP sont surexprimés lorsqu'ils sont en présence d'un facteur de stress tandis que d'autres sont surexprimés seulement au cours de certains stades de développement de l'insecte (Mahroof *et al.*, 2005).



## 4.0 Tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*

### 4.1 Historique des invasions en Amérique du Nord

Les premiers épisodes d'infestations de la tordeuse des bourgeons de l'épinette ont débuté en 1704 dans le Nord-est de l'Amérique. Sept invasions se sont produites entre 1704 et 1877 dans cette région, ce qui fait un intervalle moyen de 29 ans (Blais, 1964; Blais, 1965; Blais, 1968). Depuis, trois autres invasions se sont produites dans l'est de l'Amérique du Nord. Cette espèce indigène s'attaque à plus de 25 essences de conifères au Canada seulement, dont huit espèces d'épinette, six de pin, cinq de sapin, trois de pruche, deux de mélèze et une de genévrier (Martineau, 1985), et constitue le plus grand insecte ravageur (Rose, 1994) tant au point de vue de la superficie touchée, de la quantité d'arbres détruits ou même de la fréquence et de la durée de l'infestation (Blais, 1974; Smirnoff, 1983a). Des études précédentes ont démontré que les épisodes de manifestation ne suivent pas un cycle régulier et que les intervalles entre ceux-ci peuvent varier d'une période de 30 à 80 ans (Blais, 1968). En 1967, une nouvelle émergence des populations dans toutes les régions de l'est du Canada a été répertoriée. Des infestations prolongées de la tordeuse peuvent endommager les branches et les cimes pour ainsi finir par tuer les arbres après plusieurs années de défoliations massives (Martineau, 1985; Rose, 1994). Les sapins succombent en moyenne après quatre années consécutives de graves défoliations et la mortalité est graduellement augmentée durant les cinq années qui suivent et ce, même après la fin de l'invasion (McLintock, 1955). Des traitements aériens ont été appliqués sur une très grande échelle, surtout avec des insecticides chimiques mais aussi biologiques. Cet épisode d'infestation a engendré des

pertes de plus de 14 milliards de dollars, représentant l'équivalent de 10 années d'exploitation forestière (Cerezke, 1991). Il a été évalué en 1973 que depuis le début du siècle, la tordeuse des bourgeons de l'épinette a engendré des pertes de 154 millions de mètre cube (Blais, 1973).

#### 4.2 Cycle de vie

La tordeuse des bourgeons de l'épinette comporte quatre différents stades de développement (Figure 1): l'œuf, la chenille (larve), la chrysalide et l'adulte (papillon) (Martineau, 1985). À la fin de l'été, les femelles déposent leurs œufs sur les aiguilles qui sont exposées aux rayons du soleil. Ces œufs se regroupent à la surface de l'aiguille, en groupe de 10 à 20. Leur incubation dure environ 10 jours. Après l'éclosion, la chenille hiberne sur l'arbre, cachée dans les cupules, les écailles des bourgeons, les lichens ou bien les anfractuosités de l'écorce. Ensuite, lorsque les bourgeons sont presque ouverts au printemps, ces chenilles délaissent leur endroit d'hivernage et migrent vers les aiguilles produites au cours de l'année précédente et vers les bourgeons ouverts où elles se nourrissent des fleurs staminées en quête de nourriture. Ces chenilles s'attaqueront aux jeunes aiguilles qui sortent à peine des bourgeons et tout en mangeant, elles sécrètent des fils de soie pour lier les aiguilles aux jeunes pousses. Une fois qu'elles ont complètement mangé les jeunes aiguilles, les chenilles se nourrissent du vieux feuillage (Rose, 1994). L'infection cause une couleur rouge aux arbres en été, due à leurs aiguilles mortes, suivie par la perte de celles-ci à l'automne par la pluie ou le vent. Lorsqu'elles sont complètement développées, les

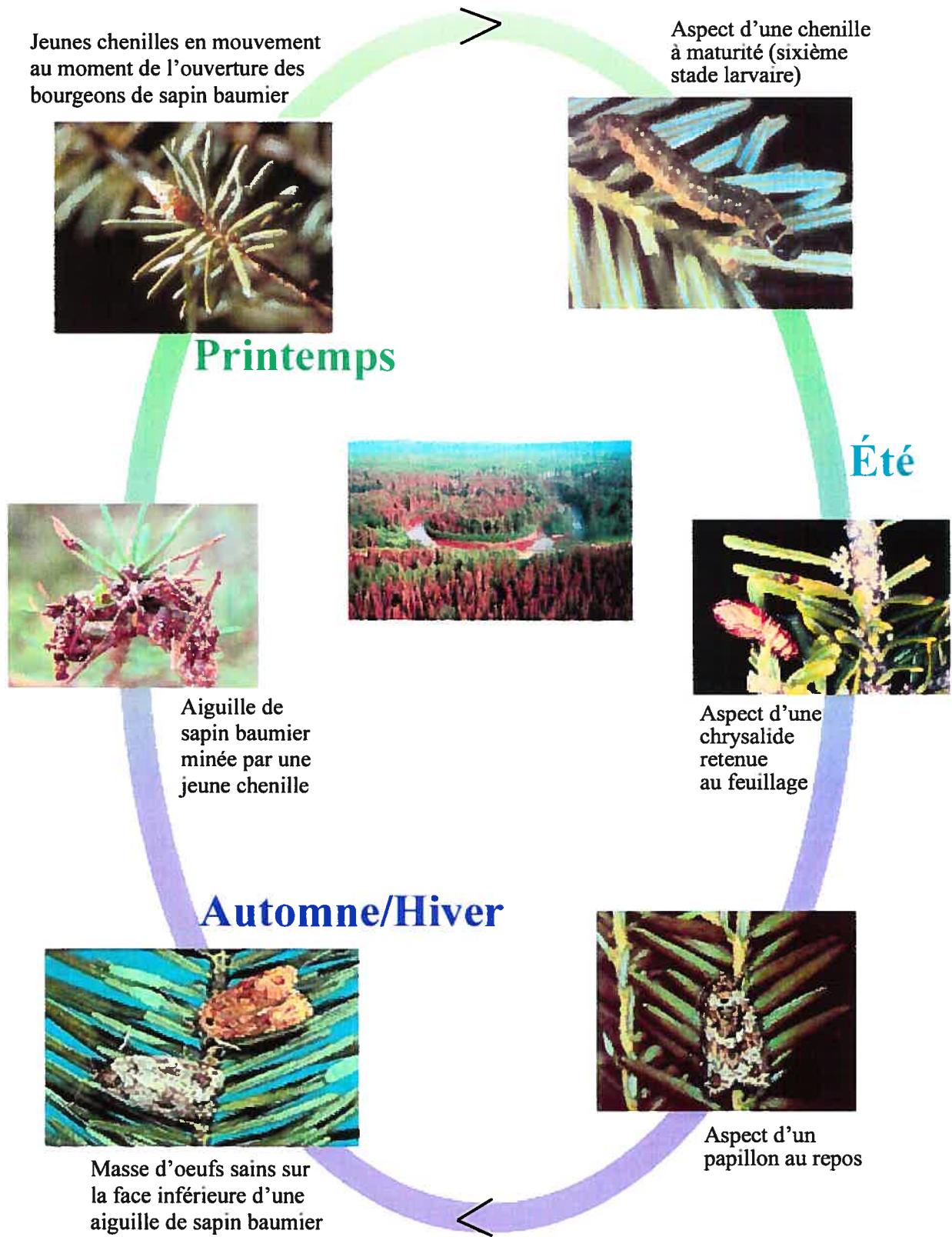


Figure 1: Cycle de vie de la tordeuse des bourgeons de l'épinette  
 Photographie gracieuseté de Joseph O'Brien et Jerald E. Dewey, USDA Forest Service

chenilles se transforment en chrysalides dans la cime, sur du feuillage ou sur des branches endommagées. À son stade adulte, la tordeuse est un petit papillon brun d'une taille d'environ 2 cm. Durant une période de deux semaines en juillet, après l'accouplement, la femelle peut pondre jusqu'à 200 oeufs par groupe de 15 à 50 sous les aiguilles (Cerezke, 1991). Ces œufs éclosent au bout de 10 jours et les larves sécrètent des cocons en soie afin de se protéger pour l'hiver, complétant le cycle de vie d'une année (Martineau, 1985). Le peuplement et la propagation naturelle de l'insecte se produit à tous les stades de développement (Rose, 1994). Les dégâts engendrés par la tordeuse des bourgeons de l'épinette se produisent au stade larvaire, lors de l'alimentation des chenilles, et sont accentués lors du dernier stade larvaire.

#### **4.3 Méthodes de gestion**

Plusieurs facteurs naturels permettent de limiter la croissance de la population de la tordeuse des bourgeons de l'épinette comme la présence d'entomophages (parasites, araignées, insectes et oiseaux) qui se nourrissent d'insectes quelque soit leur stade de développement. De plus, plusieurs micro-organismes infectent la tordeuse à divers stades (microsporidies, bactéries, virus et champignons entomopathogènes) et leur importance est variable selon la qualité du milieu et des facteurs climatiques. Le climat est également un bon facteur naturel de réduction des populations (Martineau, 1985). Par contre, lors de périodes épidémiques, les populations de *C. fumiferana* augmentent à un point tel que la répression naturelle n'est plus assez efficace pour garder ces populations à un niveau acceptable (Anonyme, 1991).

Par conséquent, le contrôle de ces populations d'insectes nécessite une répression artificielle. Les épandages aériens de divers types d'insecticides chimiques sont ainsi mentionnés depuis 1927 avec un contrôle à grande échelle initié dès 1940 avec le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) (Retnakaran *et al.*, 1982). Cependant, cet insecticide chimique s'est avéré néfaste pour l'environnement et ce malgré de nombreux ajustements afin de réduire le dosage lors des épandages (Retnakaran *et al.*, 1982). Finalement, la nature persistante de cet insecticide a mené à son remplacement par des composés tels le fénitrothion et le matacil qui se dégradent plus rapidement dans l'environnement (Blais, 1973; Prebble, 1976). Ainsi, le fénitrothion est devenu le moyen de lutte chimique majeur au Canada et aux États-Unis contre *C. fumiferana* (Blais, 1973) et ce jusqu'à très récemment. A partir des années 70, des essais d'épandages aériens à base d'une formulation contenant la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* ont été mis en place.

En 1974, des chercheurs du Centre de foresterie des Laurentides du Service canadien des forêts (SCF-CFL) ont mis au point une formulation économique et efficace de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, souche HD-1, le premier insecticide biologique contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Cerezke, 1991) qui est devenu depuis lors le principal insecticide biologique utilisé au Canada (Anonyme, 1991).

## 5.0 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

### 5.1 Historique

La découverte du bacille de Thuringe est attribuée à Ishiwata, en 1901 au Japon, au cours d'études sur le ver à soie (Federici, 2005). Peu de temps après, en Allemagne, Berliner découvre un bacille similaire capable de tuer les larves de la mouche méditerranéenne de la farine et décrit les propriétés de cette bactérie qu'il nomme *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915). Également en 1915, après la publication des travaux de Berliner, deux chercheurs japonais publient la description des microorganismes découverts par Ishiwata en 1901 et proposent le nom de *Bacillus sotto* (Aoki et Chigasaki, 1915). Depuis, de nombreuses espèces de *Bacillus thuringiensis* (Bt) ont été répertoriées, infectant diverses familles d'insectes (Lecadet *et al.*, 1999). L'effet entomopathogène de ces bactéries a été très tôt attribué à la capacité qu'ont ces microorganismes de produire des protéines cristallisées nommées delta-endotoxines (Heimpel, 1967). Ces toxines ont une activité très ciblée et spécifique sur leurs insectes hôtes. Toumanoff et Vago ont probablement été les premiers à décrire les effets létaux d'un bacille (*Bacillus cereus*) sur des larves sensibles du vers à soie (Toumanoff et Vago, 1953). En 1954, Angus montre que des inclusions protéiques de *Bacillus thuringiensis* sont toxiques pour des larves de lépidoptères, lorsqu'elles sont purifiées. Il démontre par le fait même l'activité entomopathogène des toxines protéiques de Bt (Angus, 1954).

## 5.2 Description

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie gram positive du sol, ayant une forme de bâtonnet, sporulante et aérobie facultative et qui est présente naturellement dans l'environnement (Dulmage, 1982). *B. thuringiensis* appartient à la famille *Bacillus* comprenant également *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* (Helgason *et al.*, 2000). *Bt* présente des similarités morphologiques et génétiques avec *B. cereus* (Dulmage, 1982). Cependant, même si le génome de *B. cereus* est très similaire à celui de *B. thuringiensis*, il ne possède pas de gènes codants pour des toxines insecticides, normalement présents sur un plasmide (Helgason *et al.*, 2000). C'est cette caractéristique qui distingue le plus *Bt* des autres *Bacillus* : l'inclusion cristalline (ou cristal) constituée de protéines insecticides qui sont produites à l'intérieur de la bactérie en même temps que la spore.

## 5.3 Cycle de vie du *Bt*

Le cycle de développement de *Bt* comporte deux phases distinctes, la première est végétative et est suivie d'une phase dite stationnaire. Durant la phase végétative, il y a multiplication exponentielle par scissiparité des cellules. La phase stationnaire peut conduire à la formation de spores, ce qui assure la conservation et la dispersion de *Bt*, avant de germer pour donner un nouveau cycle végétatif (Lacoursière et Boisvert, 2004). Lorsque la spore se retrouve dans un milieu favorable à sa croissance, elle se réhydrate et germe pour donner une cellule végétative en forme de bâtonnet (phase de multiplication ou végétative). À la suite de cette phase, les bactéries peuvent recommencer à sporuler (Lacoursière et Boisvert, 2004). C'est précisément à l'étape de

la sporulation que chaque bactérie produit des cristaux protéiques. Les endospores de *Bt* sont en mesure de subsister dans des conditions environnementales défavorables. Il a été montré que *Bt* est stable au moins dix ans sous forme de poudre sèche (de Barjac, 1977).

*Bt* semble persister dans le sol sous forme de spores et démontre très peu de multiplications dans la nature (Akiba, 1986; West *et al.*, 1985). L'étape de sporulation se déroulant en période de manque de nourriture ou de situation de stress, il semble peu probable que *Bt* utilise de l'énergie durant cette période afin de produire une structure protéique (toxines Cry) occupant 35% du poids total de la bactérie (Meadows, 1993). Les cellules végétatives ne peuvent pas se développer dans un environnement à pH élevé comme celui du tube digestif des insectes, mais cet environnement est cependant indispensable à l'activation des toxines. De ce fait, plusieurs facteurs résultant d'une infection par *Bt* chez les organismes affectés, comme la paralysie du système digestif, les divers changements biochimiques (baisse du pH vers une neutralité) ainsi que la perforation de la paroi intestinale induits par la toxine, permettent à la spore d'être au sein d'un milieu riche en éléments nutritifs qu'est le tube digestif où la germination et la multiplication peuvent prendre place (Lacoursière et Boisvert, 2004). De ce fait, sans la structure cristalline qui provoque ces conditions favorables, le *Bt* ne serait pas en mesure d'infecter un insecte sain et de se reproduire aisément (Meadows, 1993).

#### **5.4 Les différentes toxines sécrétées par *Bt***

Le mode d'action des toxines varie selon l'insecte ainsi que la souche bactérienne considérée mais nécessite toujours comme première étape l'ingestion par



l'insecte. *Bt* produit un large spectre de toxines dont les plus importantes sont une alpha-exotoxine, une bêta-exotoxine ainsi qu'une delta-endotoxine (Dulmage, 1981; Dulmage, 1982). La bêta-exotoxine est produite par plusieurs variétés de *Bt* et possède un pouvoir toxique reconnu pour les vertébrés (Lüthy et Ebersold, 1981). Les souches de *Bt* qui produisent une ou l'autre de ces exotoxines ne sont donc pas utilisées dans les programmes de lutte biologique.

Deux types de toxines sont considérés comme des endotoxines : les toxines Cry et les toxines Cyt. Les protéines Cyt sont des toxines présentes dans les inclusions cristallines de certaines souches de *Bt* qui sont actives sur les larves de diptères. Elles ne présentent aucune homologie avec les toxines Cry. Les souches de *Bt* produisant les endotoxines Cry ou Cyt sont utilisables en lutte biologique.

Le mode d'action du *Bt* chez les larves varie énormément d'une espèce à une autre : chez certaines, le cristal parasporal produit par le bacille cause une toxémie tandis que chez d'autres, l'activité du bacille est le résultat d'une action couplée entre les spores et les cristaux. Enfin, chez d'autres espèces, seules les spores sont responsables de la pathogénicité du *Bt* en provoquant une septicémie (Liu *et al.*, 1998; Roehrich, 1964; Smirnoff et Valero, 1972).

### **5.5 Mode d'action des toxines Cry**

Les protéines cristallisées produites par *Bt* durant la phase de sporulation ont une composante majeure de 27 à 140 kDa (protoxine) (Höfte et Whiteley, 1989). Après ingestion par un insecte sensible, le pH alcalin de l'intestin moyen va dissoudre les cristaux contenant la protoxine (Figure 2). La protoxine est activée par une

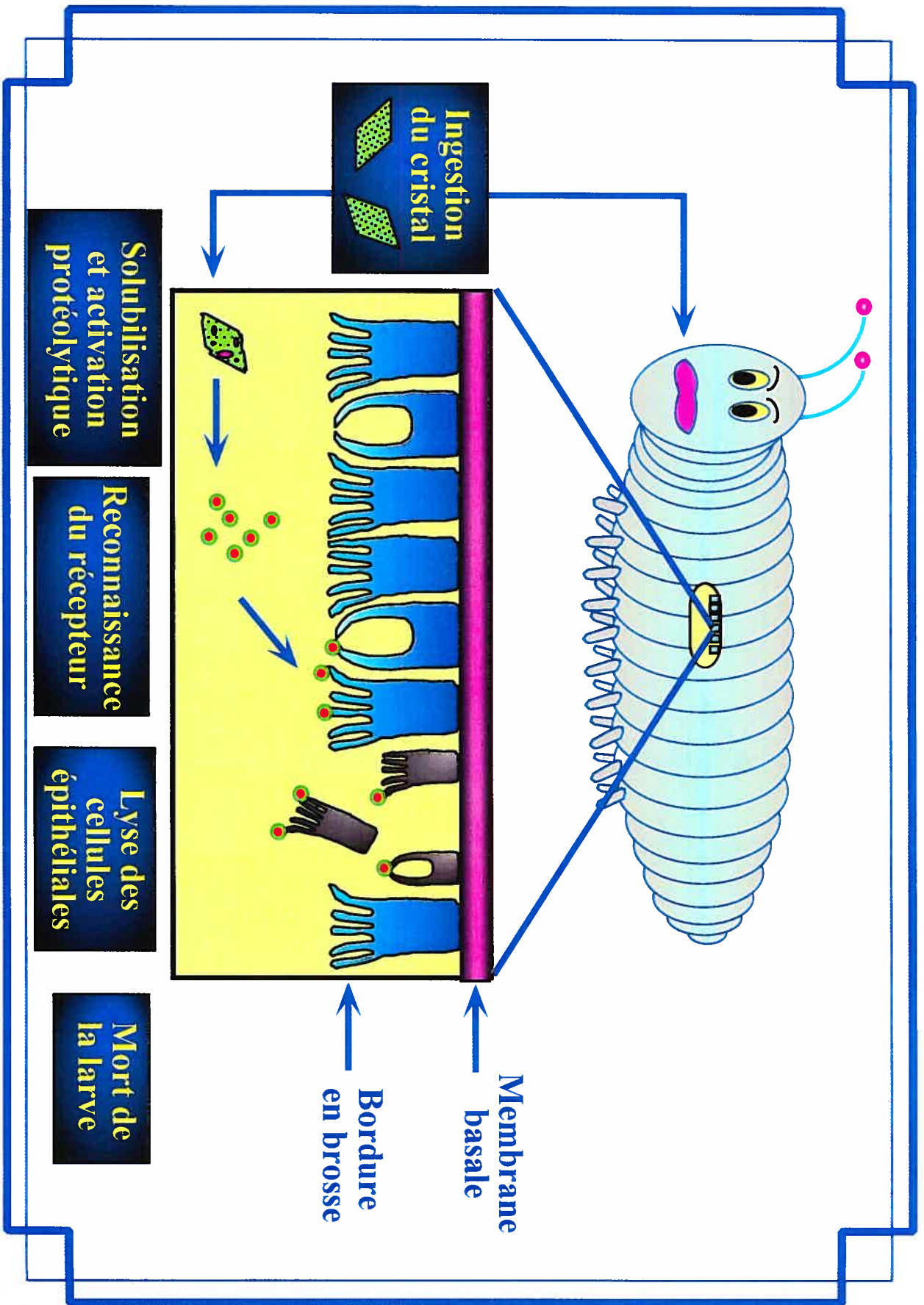


Figure 2. Mode d'action de la toxine Cry au niveau de l'intestin moyen

protéase intestinale de type trypsine qui permet un clivage protéolytique débutant à l'extrémité C-terminale et allant vers l'extrémité N-terminale (Milne et Kaplan, 1993; Nagamatsu *et al.*, 1984; Tojo et Aizawa, 1983).

Dans le cas de la sous-classe de toxines Cry1, la protoxine a une taille comprise entre 120-140 kDa qui est ultérieurement clivée en une toxine de 65 kDa (Masson *et al.*, 2002). L'activation de la protoxine semble se produire par une série de clivages protéolytiques, commençant à l'extrémité C-terminale et allant vers l'extrémité N-terminale jusqu'à ce qu'il y ait génération de la toxine (Chestukhina *et al.*, 1982; Choma *et al.*, 1990). La toxine activée va ensuite se lier à des récepteurs spécifiques présents à la surface de la bordure en brosse (Hofmann *et al.*, 1988; Masson *et al.*, 1995; Wolfersberger *et al.*, 1987), créant des pores (Masson *et al.*, 1999). Ces pores provoquent un changement ionique et une disruption de la fonction membranaire conduisant à la lyse cellulaire et à une septicémie due à la germination et à la multiplication des spores bactériennes dans l'hémolymphe de l'insecte (Knowles et Ellar, 1987; Liebig, Stetson et Dean, 1995).

Les étapes initiales de ce processus (solubilisation et formation des pores) constituent un mécanisme très rapide car il a été démontré qu'il y avait arrêt de l'alimentation de l'insecte dans les 15 premières minutes suivant l'ingestion du cristal protéique (Retnakaran *et al.*, 1982).

## 5.6 Les récepteurs de toxines Cry

L'élément le plus important qui détermine la spécificité d'une toxine Cry par rapport à un insecte donné est la liaison qui doit s'établir entre la toxine active et les

récepteurs spécifiques localisés sur la membrane épithéliale des microvillosités de l'intestin de cet insecte. Cette observation initiale a été faite chez plusieurs insectes (Hofmann *et al.*, 1988) et a conduit à la caractérisation de diverses familles de récepteurs des toxines Cry. Ainsi, chez *Manduca sexta*, il semble que le récepteur spécifique à la toxine Cry1Ab soit une protéine de type cadhérine d'un poids moléculaire de 210 kDa (Francis et Bulla, 1997), tandis que les récepteurs de Cry1Ac et de Cry1C seraient des aminopeptidases chez ce lépidoptère (Knight, Crickmore, et Ellar, 1994; Luo, Lu, et Adang, 1996; Masson *et al.*, 1995). Récemment il a été démontré que des glycolipides présents uniquement dans les membranes des invertébrés (nématodes et insectes) étaient des récepteurs spécifiques aux toxines *Bt* (Griffitts et Aroian, 2005). La nature des canaux ioniques par les toxines Cry chez l'insecte est encore très controversée (Masson *et al.*, 2002; Smedley, Armstrong, et Ellar, 1997; Van Frankenhuyzen *et al.*, 1991). De plus, malgré l'utilisation abondante de *Bt* dans plusieurs sphères de l'agriculture, il s'avère que les détails précis de la liaison de l'endotoxine aux cellules de l'intestin menant à la mort de l'insecte ne sont pas encore totalement compris (Ferré et Van Rie, 2002).

### 5.7 Famille des gènes Cry

Une première classification des protéines cristallisées de *Bt* a été proposée (Höfte et Whiteley, 1989) afin de nommer les deux classes majeures des gènes responsables: gènes *cry* (codant pour les protéines cristallisées Cry) et gènes *cyt* (codant pour les protéines cytolytiques Cyt). Cette classification a été mise à jour en 1998 et sert toujours de référence (Crickmore *et al.*, 1998). Cette nouvelle nomenclature a pris pour

exemple celle de la superfamille du cytochrome P450 (Nelson *et al.*, 1996). Le principe de cette méthode de nomenclature est d'assigner des noms aux membres de superfamilles de gènes en rapport à leurs degrés de divergence d'évolution, estimés par des arbres phylogénétiques (Crickmore *et al.*, 1998). La définition des protéines Cry est donc devenue plus large : ce sont des inclusions parasporales de nature protéique (cristal) de *Bt* qui produisent un effet toxique envers un organisme cible, ou alors toute protéine qui a une séquence similaire à n'importe quelle protéine Cry déjà connue. De la même façon, les protéines Cyt se décrivent comme étant une inclusion parasporale de nature protéique (cristal) de *Bt* qui produit une activité hémolytique, ou toute protéine ayant une séquence similaire à toute protéine Cyt déjà connue (Crickmore *et al.*, 1998). Les protéines d'un même groupe sont généralement toxiques pour une même catégorie d'insectes. Les toxines sont donc classées sur une base d'homologie de séquences d'acides aminés, où chaque protoxine obtient un nom Cry ou Cyt ainsi que quatre rangs hiérarchiques consistant en un numéro, une lettre majuscule, une lettre minuscule ainsi qu'un autre numéro (ex. : Cry25Aa1), dépendant de sa place dans l'arbre phylogénétique (de Maagd, Bravo, and Crickmore, 2001). De façon générale, les toxines Cry1 sont ainsi principalement toxiques pour les lépidoptères, les toxines Cry2 pour les lépidoptères et diptères, les toxines Cry3 pour les coléoptères et les toxines Cry4 pour les diptères (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2005).

## 6.0 Utilisations de *Bt* : épandage et plantes transgéniques

L'action très restreinte de ce biopesticide est à la base de son innocuité envers les espèces non-cibles (Retnakaran *et al.*, 1982). En effet, plusieurs études ont démontré le caractère inoffensif du *Bt* envers les vertébrés (McClintock, Schaffer, et Sjoblad, 1995; Retnakaran *et al.*, 1982; Valadares *et al.*, 2001; Yadzani *et al.*, 1982). Une autre étude a exposée que *Bt* n'est ni pathogène, ni allergène pour les vertébrés (Faust et Bulla, 1982). De plus, il semble que *Bt* disparaisse rapidement du tractus digestif des vertébrés (Faust et Bulla, 1982).

*Bt* est l'agent biologique le plus utilisé pour le contrôle des populations d'insectes ravageurs et est considéré comme une excellente alternative aux insecticides chimiques (Feitelson, Payne, et Kim, 1992). Ce biopesticide est de plus en plus utilisé grâce aux nombreux progrès technologiques récents qui permettent de produire des bactéries recombinantes contenant plusieurs gènes de toxines utilisées en épandage, ainsi qu'au développement de différentes espèces de plantes transgéniques exprimant des gènes de toxines de *Bt* (Koziel *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998).

### 6.1 Épandage

Les formulations commerciales à base de *Bt* utilisées dans le domaine de la foresterie sont essentiellement basées sur *Bt* subsp. *kurstaki* souche (HD-1) qui produit les toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2Aa (Dulmage, 1970). Cette formulation HD-1 est très efficace et largement utilisée contre les lépidoptères ravageurs des forêts, dont la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Van Frankenhuyzen *et al.*, 1991). En général, les spores et les cristaux sont parties intégrantes des préparations commerciales

de *Bt* (Dugal, 1986). Le fait que les cristaux protéiques soient dégradés rapidement lorsqu'ils sont exposés aux rayons ultraviolets impose d'effectuer plusieurs épandages différents sur un même site pour s'assurer que cette zone ait bien été couverte (de Maagd, Bosch, et Stiekema, 1999). De plus, l'arrosage de *Bt* ne couvre pas toutes les régions, ce qui fait que ce traitement s'avère inefficace contre plusieurs types d'insectes-cibles qui ne viennent pas en contact direct avec les cristaux.

## **6.2 Plantes transgéniques *Bt***

Plusieurs facteurs ont mené au développement de plantes transgéniques exprimant des protéines insecticides de *Bt*. En effet, l'utilisation de *Bt* par épandage est sans effet sur les insectes se nourrissant par minage, puisque ceux-ci ravagent les plantes de l'intérieur. Dans le cas des plantes transgéniques, les insectes ravageurs se nourrissant sur ces plantes sont obligatoirement en contact avec la toxine (de Maagd, Bosch, et Stiekema, 1999). De plus, dans les plantes transgéniques, la toxine est produite de manière continue et n'est pas sujette à la dégradation. Plusieurs gènes *Cry* ont été ainsi intégrés à des génomes de plantes ayant un intérêt commercial (Barton, Whiteley, et Yang, 1987; Vaeck *et al.*, 1987). En 1996, aux États-Unis, les premières plantes transgéniques *Bt* ont été commercialisées (Estruch *et al.*, 1997) tandis qu'à la même époque (1997), 27 pesticides microbiens étaient enregistrés par la U.S. Environmental Protection Agency (Schnepf *et al.*, 1998).

## 7.0 Résistance au *Bt*

La résistance aux insecticides est un problème qui n'est pas récent et l'utilisation intensive des pesticides chimiques a créé une situation où plus de 500 espèces d'insectes ont développé une multitude de résistance à différents pesticides au cours des années (Georghiou et Lagunes-Tejeda, 1991). L'utilisation à long terme ainsi qu'à grande échelle de *Bt* dans les champs (sous forme de spores et cristaux ou sous forme de plantes transgéniques) a amené la communauté scientifique à s'intéresser aux divers problèmes de résistance que son utilisation massive pourrait engendrer (Tabashnik *et al.*, 1994). Un scénario identique à celui des pesticides chimiques pourrait bien se développer au cours des prochaines années si aucune précaution n'est prise (Bauer, 1995; McGaughey et Whalon, 1992).

Depuis les années 80, différentes espèces d'insectes ont déjà révélé divers niveaux de résistance aux protéines cristallisées de *Bt* (Ferré *et al.*, 1995). Théoriquement, les insectes peuvent développer une forme de résistance à n'importe quelle étape du mécanisme de toxicité engendré par les toxines de *Bt* (de l'ingestion du cristal à la formation de pores dans les cellules épithéliales) (Martinez-Ramirez, Gould, et Ferré, 1999). Il existe plusieurs options pour que l'insecte évite l'action des toxines Cry (Tabashnik *et al.*, 1994; Tabashnik *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 1997). Ces scénarios peuvent être une mauvaise solubilisation du cristal ingéré, une activation protéolytique déficiente de la protoxine, une protéolyse exagérée (menant à la dégradation complète de la toxine), la séquestration de certaines molécules de la toxine par des sites de liaisons non-fonctionnels, un défaut dans les sites de liaison, un défaut dans la formation des pores ou même une augmentation de la réparation cellulaire



(Darboux *et al.*, 2002; Gahan, Gould, et Heckel, 2001; Heckel, 1994; Martinez-Ramirez, Gould, et Ferré, 1999; Oppert, 1999). La détermination et la caractérisation du ou des mécanismes de résistance présents dans chaque espèce de ravageurs peut s'avérer très difficile. De plus, une compréhension des mécanismes de résistance envers les toxines Cry doit être élaborée pour une multitude de toxines connues avec leurs spectres d'action distincts (Griffitts et Aroian, 2005). Par contre, des expériences toxicologiques très simples suggèrent qu'il existe un nombre limité de mécanismes de résistance pour plusieurs toxines Cry connues (Griffitts et Aroian, 2005). Malgré cela, les mécanismes de résistance demeurent parfois inconnus pour des lignées de laboratoire de plusieurs espèces d'insectes (Gould *et al.*, 1992; MacIntosh *et al.*, 1991; Moar *et al.*, 1995; Oppert *et al.*, 1997).

## 8.0 Exposition sublétales au *Bt*

Lorsqu'il y a arrosage ou épandage de *Bt* aux champs, certains organismes peuvent ingérer la toxine à des quantités qualifiées de sublétales. Ce phénomène peut également s'observer dans le cas de plantes transgéniques *Bt*. En particulier, plusieurs effets dus à une exposition sublétales de *Bt* chez la tordeuse des bourgeons d'épinette ont déjà été documentés, incluant l'arrêt de l'alimentation, la diminution de la masse de la larve ainsi qu'un temps de développement plus long (Alford et Holmes, 1986; Fast et Régnière, 1984; Retnakaran, Lauzon, et Fast, 1983; Van Frankenhuyzen et Nystrom, 1987). De plus, il a été montré que des populations de *C. fumiferana* ayant survécu dans des zones traitées au *Bt* présentaient une baisse du niveau de calcium, de l'activité phosphatase et une réduction des capacités reproductrices (Smirnoff, 1983b). La preuve que la résistance pouvait être induite par des faibles concentrations de préparations commerciales de *Bt* (Rahman *et al.*, 2004) a récemment été faite.

## 8.1 Résistance des insectes cibles

Des recherches effectuées sur des souches *Bt* auxquelles le ravageur *Heliothis virescens* est sensible ou résistant ont montré des changements pathologiques au niveau des cellules en colonne dans le cas d'une ingestion de la toxine Cry1Ac à laquelle cet insecte est sensible (Martinez-Ramirez, Gould, et Ferré, 1999). Ces dommages épithéliaux s'effectuent rapidement mais également de façon dépendante du temps (Martinez-Ramirez, Gould, et Ferré, 1999). Malgré des dommages épithéliaux importants, il est cependant possible pour l'insecte de se développer jusqu'à l'âge adulte, comme cela a déjà été rapporté pour *Galleria mellonella* (Hoppingarner et

Materu, 1964). La capacité des larves à remplacer rapidement les cellules et tissus endommagés pourrait jouer un rôle important dans le développement de la résistance des insectes aux doses sublétales de *Bt* (Martinez-Ramirez, Gould, et Ferré, 1999).

Il a été rapporté à Hawaii le premier cas de résistance aux champs, où des populations de *Plutella xylostella* ont présenté différents niveaux de susceptibilité à des formulations de *Bt* (Schnepf *et al.*, 1998). Les populations d'insectes provenant des zones hautement traitées présentaient beaucoup plus de résistance envers *Bt* que les populations traitées à des niveaux plus bas (Tabashnik *et al.*, 1994).

Une étude portant sur *Helicoverpa zea* montre que des effets sublétaux d'une espèce de maïs transgénique résultent en un développement larvaire plus long, des larves plus petites et une réduction de la fécondité de *H. zea* (Horner, Dively, et Herbert, 2003). Cette exposition à des doses modérées semble provoquer chez l'hôte des variations génétiques et physiologiques menant à un comportement de résistance (Horner, Dively et Herbert, 2003).

## **8.2 Effets des doses sublétales chez les insectes non-cibles**

Les insectes non ciblés par une toxine spécifique, mais potentiellement sensibles à celle-ci pourraient également développer de la résistance, à cause d'expositions répétées. En effet, ces insectes non ciblés se trouvant dans le même environnement que les insectes ciblés, leur exposition à la toxine est un problème lorsqu'on sait que ceci peut favoriser le développement de résistance ou des altérations du métabolisme. Selon une synthèse sur le sujet, les effets du *Bt* variété *israelensis* sur les organismes cibles

ainsi que les organismes non-cibles sont très difficiles à prévoir (Boisvert et Boisvert, 2000).

## Problématique

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*, famille Lepidoptera) est l'insecte ravageur des forêts de résineux le plus important d'Amérique du Nord (Rose, 1994). C'est lorsque l'insecte est au stade larvaire qu'il occasionne des dégâts majeurs en se nourrissant des différentes parties de l'arbre, autant des bourgeons que des vieilles aiguilles. La mort de l'arbre survient en moyenne cinq à sept ans après le début de l'infestation et ce, par défoliations répétées année après année (Martineau, 1985). *C. fumiferana* engendre des pertes environnementales et économiques majeures, étant donné toutes les utilités commerciales du sapin, tant pour le bois d'œuvre que pour les pâtes et papiers (Martineau, 1985). Dans le cadre des programmes de lutte contre cet insecte nuisible, plusieurs pesticides chimiques sont utilisés, comme le fénitrothion. Cependant, l'utilisation intensive de tels produits peut engendrer des problèmes environnementaux comme la pollution des nappes phréatiques, leur persistance dans l'environnement, une non-spécificité d'action entraînant des effets néfastes sur des insectes non-cibles ainsi que le développement de résistance de la part des insectes (Burgess, 1982; Lord, 2005).

Une bactérie entomopathogène présente dans le sol, le bacille de Thuringe (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) permet également de réduire de façon significative les populations de *C. fumiferana*. *Bt* produit plus de 35 sous-classes de protéines intracellulaires cristallisées (Cry) qui ciblent un large éventail d'insectes. L'absence de toxicité de ces protéines chez les vertébrés et leur grande spécificité d'hôtes rendent leur utilisation attrayante comme agent de lutte biologique commercial contre les insectes

ravageurs. En effet, à la différence des pesticides chimiques, *Bt* réduit au minimum les effets néfastes sur l'environnement. Ainsi une formulation commerciale de *Bt* a été développée et commercialisée (Dulmage, 1970) pour lutter contre plusieurs ravageurs forestiers dont la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Van Frankenhuyzen, 1993). Ce biopesticide qui contient plusieurs protéines Cry est largement utilisé dans les forêts nord américaines. En particulier depuis 1987, cet insecticide appliqué par voie aérienne constitue la méthode de lutte principale contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans la province de Québec (Anonyme, 1989).

### Hypothèse

Même s'il est largement établi que les toxines Cry ont un spectre d'action restreint, il est cependant nécessaire de s'assurer de leur innocuité vis-a-vis des insectes non-cibles présents dans le même environnement que *C. fumiferana*. Dans cette optique, la majorité des études antérieures se sont généralement limitées à mesurer la mortalité des insectes sans tenir compte d'effets plus subtils sur l'oviposition ou le développement morphologique des insectes non ciblés. Cependant, ces effets qui ne sont pas visibles immédiatement sont des facteurs importants pouvant affecter l'écologie et la dynamique des populations de ces insectes. Sur cette base, notre hypothèse est la suivante : l'intoxication sublétales d'un insecte détermine des changements spécifiques d'expression de certains gènes. Ces changements mèneront, au moins dans certains cas, à des variations mesurables (hausse ou baisse) des quantités d'ARN messagers (ARNm) correspondants à ces gènes. En retour, la mesure des

niveaux de ces ARNm chez des insectes non-cibles pourra éventuellement servir à détecter une réponse sublétales, mais potentiellement nocive, chez ces insectes.

Le premier objectif de notre étude consiste à créer une banque d'ADN complémentaire d'expression différentielle par hybridation suppressive soustractive de deux populations de larves de *C. fumiferana* (témoin et exposée à une dose sublétales de la toxine Cry1Ab) afin d'évaluer les effets plus subtils de la toxine au niveau moléculaire. Avec cette banque, on s'attend à mieux comprendre les effets de la toxine sur ses hôtes cibles.

Le deuxième objectif de notre étude consiste à identifier les gènes clés qui sont influencés négativement ou positivement par des doses sublétales de toxines afin de les utiliser dans le cadre d'études ultérieures comme marqueurs universels dans un programme de détection des effets sous-létaux sur des insectes non ciblés par ces toxines.

## **SECTION II – Méthodologie et résultats**



**Article :**

**Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of  
Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis***

(Accepté par Insect Molecular Biology, date de publication non-déterminée)

Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal  
exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*

Liliane Meunier<sup>1,2</sup>, Gabrielle Préfontaine<sup>2</sup>, Manuela Van Munster<sup>2</sup>, Roland  
Brousseau,<sup>1,2</sup> and Luke Masson<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec,  
Canada

<sup>2</sup>National Research Council of Canada, Biotechnology Research Institute, Montreal, Quebec,  
Canada

\* Corresponding author

Luke Masson

Biotechnology Research Institute  
National Research Council of Canada  
6100 Royalmount Ave,  
Montreal, Quebec,  
Canada, H4P 2R2  
Phone: 1-514-496-6150  
FAX 1-514-496-6213  
E-Mail: XXXXXXXXXX

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Choristoneura fumiferana*, subtractive hybridization,  
gene expression

Running title: Altered gene expression in response to Cry toxin exposure

**ABSTRACT**

*Bacillus thuringiensis* is a microbial control agent active against *Choristoneura fumiferana*, a lepidopteran defoliator of North American forests. Although the *B. thuringiensis* insecticidal crystal protoxins have a relatively narrow host range, there is concern about their impact on non-target species where intoxication effects may not be overt. Larval toxicity effects can be assessed at the molecular level by determining altered transcriptional profiles in response to sublethal toxin exposure in sensitive insects. Subtraction hybridization libraries were created using two larval populations, control and toxin-fed and were characterized by sequencing 1091 clones. Differential mRNA expression of selected clones, as measured by quantitative-PCR, identified a number of metabolic and stress-related genes that were either transcriptionally enhanced or repressed after toxin exposure.

## INTRODUCTION

The entomopathogenic bacterium, *Bacillus thuringiensis* (Bt), produces a variety of insecticidal crystal (Cry) proteins toxic to a number of lepidopteran, coleopteran and dipteran larvae. Bt is an efficient insect control agent; it has been developed commercially for the control of various agronomical insect pests (Saade *et al.*, 1996, Moar *et al.*, 1990) and represents an important alternative to chemical insecticides (Feitelson *et al.*, 1992). After ingestion by a susceptible insect, the protoxin crystal is solubilized in midgut digestive fluid and the soluble protein processed to an active Cry toxin by gut proteases. After activation, toxins bind to specific receptors on the midgut brush border epithelial cell surface, aggregate (van Rie *et al.*, 1990, Masson *et al.*, 1995, Rausell *et al.*, 2004) and integrate into the cell membrane where they create specific ion channels (Masson *et al.*, 1999, Schwartz *et al.*, 1997, Gazit, 1998, Slatin and Abrams, 1990) causing osmotic imbalance, cell swelling and ultimately lysis (Knowles and Ellar, 1987).

Although Cry toxins are known to have a narrow host range, their effects on non-target insects remain a controversial environmental issue (Losey *et al.*, 1999, Hilbeck, 2001, Romeis *et al.*, 2004). However, apart from overt effects like mortality, sublethal effects resulting in potential decreased fitness such as altered oviposition or reduced fecundity can easily be overlooked. An assessment of the transcriptional response of toxin sensitive cells exposed to sublethal Cry protoxin levels would aid in our understanding of both the Cry toxin's mode of action and potential insect resistance mechanisms to intoxication. In terms of non-target insect effects, a survey of genes

showing altered transcriptional profiles could potentially be used as universal Cry toxin stress markers for non-target insects.

In North American forests, insect outbreaks are the major agents of natural disturbances (Logan *et al.*, 2003) having a commercial negative impact approximately five times greater than forest fires (Dale *et al.*, 2001). In particular, one major lepidopteran forestry pest, the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) is a severe defoliator of conifers with damages evaluated in the billions of dollars (Rose, 1994). *B. thuringiensis* strain HD-1 is a commercial formulation containing a variety of Cry protoxins including Cry1Ab and is currently used in the field to control *C. fumiferana* populations (van Frankenhuyzen, 1993). The present study describes the construction and partial characterization by sequencing and mRNA quantification of a suppression subtraction hybridization library between a non-prototoxin exposed control larval population of *C. fumiferana* and a Cry1Ab prototoxin exposed population.

## RESULTS

### *Subtractive library analysis*

A cDNA subtractive library enriched in clones differentially expressed from *C. fumiferana* after treatment with Cry1Ab protoxin was created. A total of 1091 clones derived equally from forward and reverse subtractions were fully sequenced from which 623 clones were determined to be unique clones, while the remaining 468 clones represented either replicates or contiguous sequences. At this level of redundancy it is reasonable to assume that sufficient clones were sequenced to provide fairly complete coverage of the library. GenBank nucleotide homology searches (BLASTN) on all 623 clones to determine gene identification was not fruitful due to poorly conserved nucleotide sequences between insect species (in particular between lepidoptera and diptera). Alternatively homology at the protein level in GenBank was determined using BLASTX. In order to reduce the number of non-insect matches, an arbitrary E-value threshold ( $e^{-15}$ ) was chosen. A majority of the clones did not have a known function attached to them but showed significant homology to various sequences from *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* and *D. pseudoobscura* (data not shown). Of the 623 clones, 171 sequences (27%) had a significant BLASTX match associated with a function ( $\leq e^{-15}$ ) and were further analyzed using the Gene Ontology Consortium software (Ashburner *et al.*, 2001) which describes gene function corresponding to activities from any organism (Table 2). Among the 171 sequences, 156 sequences presented a significant match (E-value  $\leq e^{-5}$ ) for a known molecular function or biological process. As shown in Figure 1, 54% of the clones with a significant match had a molecular function related to a catalytic activity (kinases, helicases,

endopeptidases, etc.). The two other major functions represented in the subtractive library were proteins involved in binding functions (ABC transporter, gelsolin, troponin, etc.) (15%) or involved in structural functions (ribosomal proteins, actin related proteins and ubiquitin) (15%). Four clones, representing 3% of the subtractive bank, play a role in the stress response of the insect. Several genes coding for proteins associated with the insect midgut were also identified. For example, two clones showed a significant BLASTX score with two different chitin binding proteins from *Trichoplusia ni*, which are major components of the peritrophic membrane (Supplementary Material Table S1). Moreover, proteolytic enzymes specific to the midgut (e.g. carboxypeptidases) and involved in digestion were also found. Several proteins involved in potential Cry toxin recognition and putative binding receptors such as aminopeptidase and cadherin proteins were identified. Among 14 clones sequenced having significant homology with aminopeptidases of *Manduca sexta*, *Spodoptera litura*, *Lymantria dispar* and *Epiphyas postvittana*, four different isoforms of aminopeptidases were defined using the PolyDot software. Moreover, four clones having a significant homology with larval trypsin-like proteases were detected. These enzymes are involved in the proteolysis of the Cry protoxins and lead to the activation of the toxin (Milne and Kaplan, 1993). Eight clones having sequence homology with various serpins, which are a superfamily of serine protease inhibitors, and eight clones with sequence homology to another superfamily of catalytic enzymes, the cytochrome P450 family, were detected (Supplementary Material Table S1).

### ***Q-PCR analysis***

To examine altered transcriptional patterns resulting from protoxin exposure in two different biological replicates, 17 clones, reflecting the distribution of molecular functions in the subtractive library, were randomly selected for quantitative PCR analysis. Each pair of oligonucleotide primers (Table 1), designed to amplify a specific clone, was tested for target specificity by PCR and was found to produce the predicted sized fragment (data not shown). The expression levels of each selected gene were measured simultaneously with the house keeping genes (PLPA2, L32). Since it was found that both house keeping genes gave similar normalization results, consequently, all expression data was normalized only to PLPA2.

Based on Q-PCR analyses, the 17 clones were classified into three different groups according to the type of expression observed (Table 3). Nine clones were considered as over expressed compared to the control after protoxin exposure (Table 3). In particular, gene expression of the two selected serine protease inhibitors appeared to be the most enhanced after Cry1Ab protoxin treatment (2.5 to 10.4-fold change). Four more clones showed an over expression profile after protoxin exposure in both biological replicates: a clone having sequence homology with an antifreeze protein of *C. fumiferana*, a cytochrome P450 protein of *Depressaria pastinacella*, an esterase from *Plutella xylostella*, and a protein involved in DNA-repair. Three clones with homology to the growth factor related protein (IDGF), an initiation factor and a gene of unknown function showed an enhanced expression profile in one replicate but showed little or no increase in transcription in the other replicate (Table 3).



Among the selected group of genes, five clones showed a stable expression profile i.e. there was no change in their expression between the control groups and the insects exposed to the protoxin (Table 3). More specifically, a clone with sequence homology to an aminopeptidase N, a known receptor protein for *Bt* toxin, was not affected by the protoxin treatment (0.9 and 1.1 differential expression ratio). Similar expression profiles were observed for clones having homology with a chitin receptor, with a hydroxydehydrogenase related protein, an ATPase protein and an ATP binding cassette (ABC).

In contrast to genes showing enhanced or stable transcription after Cry1Ab treatment, one clone showing sequence homology with a lipase from *Antheraea yamamai* and another clone with homology to a metalloprotease precursor both showed decreased transcriptional activity in both biological replicates (0.1-0.1-fold and 0.4-0.13-fold) respectively. In addition, a clone showing homology to a heat shock protein of *Antheraea yamamai* was also significantly repressed (Table 3).

## DISCUSSION

One major difficulty in assessing the ecological impact of a biopesticide is that the lack of an immediate effect on a particular insect (e.g. death or cessation of feeding) does not necessarily correlate with a lack of a response at the molecular level. Sublethal effects, particularly during long term Cry toxin exposure from transgenic plants, could potentially lead to important changes in insect physiology such as reduction in overall size, a slower maturation or an altered oviposition (i.e. decreased fitness) that can, in the long term, alter the population dynamics (Harwood *et al*, 2005, Moreau and Beauce, 2001). One possible approach to determine potential susceptibility to intoxication would be to conduct toxin binding assays to midgut epithelial cells, however this in itself may not be conclusive. Although toxin binding is required for toxicity, binding does not necessarily result in actual toxicity (non-functional binding). Therefore there is a need for other molecular indicators of toxicity. In order to study the molecular response of *C. fumiferana* larvae when exposed to a sublethal dose of Cry1Ab protoxin, a subtracted library was created in order to directly focus on genes showing altered transcriptional responses (Diatchenko *et al.*, 1996). For this purpose, a large number of cDNA library clones were sequenced.

One striking observation from our data was large number of unmatched sequences, however given the current bias in the insect databanks towards dipteran sequences, this result was expected. Putative functionality could be attributed to only 171 or 27% of the 623 unique sequenced clones. In this group, 156 were directly matched to a molecular function or biological process using Gene Ontology software which divided these clones into three major and four minor groups. Genes showing

catalytic activity were most represented group (54%) while those having homology with binding functions or with structural functions were equally represented (15% each). Interestingly, this pattern of functional distribution for catalytic and binding functions is similar to that found in *Diabrotica virgifera virgifera* midguts using an expression sequence tag (EST) approach (Siegfried *et al.*, 2005). These groups are what would be expected of proteins that would be potentially expressed in insect guts.

In order to gain insight into the actual transcriptional response of *C. fumiferana*, we used a Q-PCR method to analyze the expression profile of 17 clones representative of the overall functional distribution within the library. Among the clones selected, five did not show any transcriptional changes after protoxin treatment (Table 3). Most of these clones are involved in binding functions and are components of cellular membranes within the gut such as aminopeptidases. Both cadherins and aminopeptidases are proteins involved in the binding of the Cry1A toxin of the midgut epithelial cell layer in lepidopteran species (Vadlamudi *et al.*, 1995, Yaoi *et al.*, 1997). Thus alterations (masking) in toxin receptor levels does not seem to be a response of the larvae to intoxication, however it would be important to test other aminopeptidases present in our subtractive library as other isoforms could react differently. Another clone similar to the peritrophic membrane chitin binding protein 1 from *Trichoplusia ni* (Wang *et al.*, 2004) did not show any differential expression after protoxin treatment. This protein is present in the peritrophic membrane, which covers the insect gut and acts as a protective barrier to all microorganisms present in the gut lumen (Peters, 1992). Two other clones with functions related to a binding activity (ATPase and an ATP-binding cassette) were not affected by the protoxin treatment. The ATP-binding

cassette (ABC) transporters are part of a family of transmembrane proteins which have two ABC motifs containing two adenosine triphosphate (ATP) binding sites. They were identified in a large variety of organisms including *Drosophila melanogaster* (Kuwana *et al.*, 1996, Higgins, 1992, Ames and Lecar, 1992), and are implicated in a wide range of functions, including multi-drug resistance (Chen *et al.*, 1986). The presence of some clones in the subtractive library showing unaltered transcriptional profiles is not surprising since even though the suppression subtractive hybridization technique is a method to enrich in rare transcripts (Diatchenko *et al.*, 1996) between two populations, some common genes still make it through the selection process.

Results of the Q-PCR analysis showed that six of the selected clones had an enhanced expression after the protoxin treatment in both biological replicates (Table 3). The transcriptional activity of two clones similar to serine protease inhibitors (serpins) of *Bombyx mori* and *Lonomia obliqua* were strongly enhanced after protoxin treatment. Serpins are involved in the defense immune system of insects (Bode and Huber, 1992, Zou and Jiang, 2005). Indeed, phenoloxidases, implicated in defense response, are regulated via a serine protease pathway, which is activated by microbial surface molecules (Soderhall *et al.*, 1994). It has been shown that a serine protease from *Bombyx mori* acts as an antiviral agent against nucleopolyhedrovirus (Nakazawa *et al.*, 2004) and that reduced levels of gut serine proteases may play a role in resistance to a *B. thuringiensis* toxin (Griffitts and Aroian, 2005). It is not clear at this point whether the two over expressed serpins were actions elicited by the Cry protein itself to block a serine protease modulated host defense response (e.g. decreased phenoloxidase conversion) or an attempt by the insect to reduce protoxin proteolysis/activation.

Another interesting result was the enhanced expression of the *C. fumiferana* antifreeze protein. Antifreeze proteins are present in cold-adapted organisms, protecting them from low temperature freezing (Du *et al.*, 2003), and are found primarily in polar fish (Raymond and DeVries, 1977). However, this protein has also been isolated primarily from coleopterans but has been found in a few lepidopteran insects including *C. fumiferana* (Liou *et al.*, 1999, Tyshenko *et al.*, 1997). The transcriptional enhancement of this gene after the protoxin treatment is presumably a result of a generalized response to stress by this insect. One clone having a strong protein homology with a cytochrome P450 of the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella* (Li *et al.*, 2004) was also enhanced after treatment when analyzed by Q-PCR (Table 3). Cytochrome P450 is a superfamily of ubiquitous proteins known to be involved in a variety of metabolic processes including insecticide metabolism and consequently insecticide resistance (Feyereisen, 1999). Two clones enhanced in both biological replicates, having sequence homology with an esterase of *Plutella xylostella* and another clone similar to a protein first identified in the zebra fish *Danio rerio* (Allende *et al.*, 1996) showed increased expression. The superfamily of esterases are involved in a wide range of reactions, including detoxification (Ranson *et al.*, 2002) and play a crucial role in the insect's defense mechanism after exposure to natural chemical insecticides (Feyereisen, 1999). Recently, a novel Cry toxin resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* was proposed involving the overproduction of toxin binding esterase (Gunning *et al.*, 2005). Interestingly, the clone present in the zebra fish has a strong homology (E-value =  $5e^{-43}$ ) with a nucleus-associated protein involved in DNA damage repair in mammals (Lerch-Gaggl *et al.*, 2002). Its overexpression in *C.*

*fumiferana* suggests that a DNA repair response is induced when the larvae are exposed to protoxin.

Three additional clones (two having homology with proteins involved in cell growth i.e. growth factor and translation initiation factor) were overexpressed in one biological replicate but not in the other when analyzed by Q-PCR (Table 3). The reason for this discrepancy between the two biological replicates is unclear but may be due to a variation in the temporal expression of a gene (the downside of a spike in expression). Indeed, a time course study of protoxin exposed insect larvae would confirm this hypothesis.

Three clones, among the 17 tested by Q-PCR, were considered as repressed (Table 3). The most striking was the strong transcriptional repression of the lipase homologous clone (Table 3). Lipases are implicated in lipid degradation during an apoptotic response (Lu *et al.*, 2005). Recently, it was shown that a *Bombyx mori* lipase could inhibit viral activity of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus suggesting its potential as a physiological barrier against viruses (Ponnuvel *et al.*, 2003). Paradoxically, in a sensitive insect like *C. fumiferana*, protoxin exposure may inhibit lipase expression thus preventing its use in a defense mechanism. It would be interesting to analyze lipase gene expression insects resistant to Cry toxins to see if lipase levels play a role in toxin resistance.

A clone similar to a heat shock protein of *Antheraea yamamai*, which is synthesized in cells after exposure to environmental stress was also repressed (Bendena *et al.*, 1991). Furthermore another clone associated with a metalloprotease precursor showed decreased transcription (Table 3). Metalloproteases are part of the protease

(hydrolase) family. In the tsetse fly, the vector for African trypanosome, the zinc-metalloprotease is associated with pathogen establishment (Yan *et al.*, 2002). It was shown that its level of expression was not affected by the presence of the pathogen in the insect and that this enzyme was probably related to digestive functions and does not apparently exhibit an immune response profile (Yan *et al.*, 2002).

In conclusion, our study shows that the cellular stress response elicited by sublethal Cry1Ab protoxin ingestion, as determined at the transcriptional level, is related primarily to alterations in metabolic activities in the insect. Many enzyme-related genes were either enhanced or repressed while various putative binding proteins did not show altered expression levels after protoxin exposure. Expression profiling of homologues of the genes showing altered transcriptional expression in this study is needed using other susceptible lepidopteran larvae to assess whether the observed responses are universal. In that way potential stress markers can eventually be exploited to examine the effect (if any) of Cry toxins in non-target insects.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Insects and infection treatment*

*Choristoneura fumiferana* larvae were fed on a modified McMorran Grisdale diet and maintained at  $22\pm 3$  °C with a photoperiod of 16:8 (light:dark). Cry1Ab protoxin was produced and purified as described elsewhere (Masson *et al.*, 1995). A population of 4<sup>th</sup> instar larvae were subdivided into two groups. All larvae were starved for four hours then one group was given a small bolus of diet containing 1  $\mu$ l of buffer + 25mM sucrose + 35 ng Cry1Ab protoxin (protoxin-fed). Larvae from the second (control) group was fed 1  $\mu$ l of buffer + 25mM sucrose only. Only those larvae which ate the entire bolus were separated and put back on diet for 18 hours. Midguts from diet fed larvae were removed by dissection and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *RNA extraction*

Messenger RNA (mRNA) was extracted from frozen midguts using an Oligotex Midi kit (Qiagen) and further purified using a RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. The quality and quantity of mRNA was determined by spectroscopic measurements at 230, 260 and 280 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). In addition, quality and integrity of mRNA was verified on a 2% agarose gel.



### ***Suppression subtractive hybridization***

In order to enrich for differentially expressed populations of mRNA, RNA subtraction libraries were created using a PCR-select cDNA Subtraction Kit (Clontech). Two libraries were made: a forward (enriched in overexpressed or induced mRNA by the protoxin treatment) and a reverse (enriched in under-expressed or suppressed mRNA by the protoxin treatment) cDNA library. Briefly, double-stranded DNA was prepared from 2  $\mu$ g of mRNA isolated from protoxin-fed and control populations. To create the forward library, mRNA from protoxin-fed larvae was used as the tester population and control mRNA as the driver. The same initial quantity of mRNA material was used to create the reverse library, but with the tester and driver populations reversed. After the second strand synthesis, the cDNA was digested with *Rsa* I (15 units/sample). For each library, two separate ligations were made: tester cDNA was ligated to adaptors 1 and 2R (provided in the Clontech kit). A first hybridization was made using an excess of driver and either group of tester at 68°C for eight hours. After mixing both samples together (tester with 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> adaptors with fresh denatured driver), a second hybridization was performed at 68°C overnight. Differentially expressed cDNAs were amplified by a first PCR using primers complementary to both adaptors 1 and 2R. PCR was performed using following conditions: 75°C for 5 min followed by 27 cycles at 94°C for 30 sec, 66°C for 30 sec and 72°C for 1.5 min. In addition, nested PCR was performed as followed: 12 cycles at 94°C for 30 sec, 68°C for 30 sec and 72°C for 1.5 min. Product lengths of both PCRs were verified on a 2% agarose gel.

### ***Subtracted library construction***

After purification of PCR amplicons (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), digestion with *Not* I (specific for adaptor 1) and *Eag* I (specific for adaptor 2R) was performed following manufacturer's instructions (Amersham-Pharmacia). The digested fragments were subsequently ligated into the QuanTox vector (Q-Biogene) followed by electroporation into TOPO competent *Escherichia coli* cells (Qiagen). After selection on LB agar plates containing ampicillin (100 mg/ml) and IPTG (100 mM), individual colonies were picked and grown overnight at 37°C in LB broth containing ampicillin (100 mg/ml). Recombinant plasmid DNA was prepared using a mini-prep kit (Qiagen) and the presence of an insert was verified by PCR using the T3 and T7 promoter sequences on either side of the cloning site of the vector followed by electrophoresis in a 1% agarose gel.

### ***Sequencing and analysis***

DNA sequencing of the cloned subtracted cDNA inserts was done using the universal T3 and T7 primers on 1091 clones. After removal of duplicate sequences, 623 unique sequences were further analyzed (Genbank accession numbers DY453024 to DY453646). Sequence analyses were performed using ABIview (Carver, T., Cambridge, UK) and Vectorstrip softwares (Curwen, V., Cambridge, UK) followed by BLASTN and BLASTX analysis (Altschul et al., 1990). Sequence fragments showing similarities with aminopeptidase N were compared using PolyDot from the EMBOSS software suite (Rice *et al.*, 2000).

### ***Single-stranded cDNA synthesis***

After a DNase I treatment (Deoxyribonuclease I, 1U/500 ng of mRNA, Invitrogen, California, USA), purified mRNA samples from either the protoxin-fed or control populations were reverse transcribed with 0.5  $\mu$ g of oligo(dT)<sub>12-19</sub> (SuperScript First-Strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA product was treated with RNase to remove remaining RNA. From the final volume reaction, 2  $\mu$ l were removed and electrophoresed through a 1% agarose gel to check for cDNA synthesis. The reverse transcriptase product was adjusted to a 200  $\mu$ l final volume for use in Q-PCR analysis. A negative and a positive control (provided with the kit) was used for each RT reaction.

### ***Single-stranded cDNA quantitation***

Specific primers used in Quantitative-PCR (Q-PCR) were designed (Sequence analysis program, Informagen, SA) and synthesized (Integrated DNA Technologies, USA) in order to amplify a 100-150 base pair (bp) PCR product (Table 1). All primers used in Q-PCR (on cDNA) had a melting temperature between 48-50°C and were initially tested on *C. fumiferana* genomic DNA to confirm their specificity. Primer optimization was performed using four primer concentrations (0.2 to 0.8 mM) for both forward and reverse primers. One primer concentration (0.6 mM) for the lower threshold cycle value (Ct) was selected for all experiments. With the latter concentration, no primer-dimer

formation was observed. DNA master SYBR Green I Mix (including Taq DNA polymerase, dNTP, MgCl<sub>2</sub> and SYBR Green I dye, Roche Molecular Biometrics) was used to quantify cDNA relative expression. Each 20 µl reaction contained 10 µl of master mix, 0.6 µM of each specific primer (forward and reverse), 2.6 µl of RNase-free water and 5 µl of diluted cDNA.

Initial denaturation was performed in a real-time cycler (Rotor-Gene 2000; Corbett Research, Sydney, Australia) at 95°C for 15 min followed by 45 cycles of amplification at 94°C for 15 sec, 48-50°C for 15 sec and 72°C for 15 sec. Fluorescence was measured at the end of each extension step at 72°C. Subsequently, a melting curve was recorded between 65°C and 95°C with an initial hold of 45 sec, followed by a hold of 5 sec. A negative control (no cDNA) was performed for each run to check the quality and specificity of the amplification. In addition, melting curves analyses were done after each run to give the annealing temperature of every product (Table 1). There were no unspecific products or primer-dimers formation after 45 cycles of amplification and efficiency of the reaction for each specific product was calculated using the Rotor-Gene 3000 software (Table 1).

### ***Data analysis***

Quantification of the relative mRNA levels was performed with the Rotor-gene quantification software. A mathematical model was used to calculate the relative expression ratio between the two populations (protoxin-fed and control) (Pfaffl, 2001). The crossing point (Cp) of each sample included in the run was determined. The Cp is defined as the point at which the fluorescence rises appreciably above the background

fluorescence (Pfaffl, 2001). The expression of each clone was normalized (Vandesompele *et al.*, 2002) against two housekeeping gene sequences (Feng *et al.*, unpublished) obtained from the *C. fumiferana* genome: acidic calcium-independent phospholipase A2 (PLPA2; accession number: DQ238110) and 60S ribosomal protein L32 (L32; accession number DQ238111) .

Serial dilutions were made to create standard curves for each cloned amplicon including the housekeeping genes. Accordingly, dilutions (1:5, 1:25, 1:125, 1:625 and 1:3125) of cDNA from the control population were used to build a relative standard curve of the control cDNA population. A 1:125 dilution of cDNA from both treated and control populations were used to quantitate the relative mRNA levels.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Alberto Mazza for technical assistance, Qili Feng and Normand Jolicoeur for informatics support. The financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under the Biocontrol Research Network is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- Allende, M. L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N. and Hopkins, N. (1996) Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. *Genes Dev* **10**:3141-3155.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.
- Ames, G. F. and Lecar, H. (1992) ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters. *Faseb J* **6**:2660-2666.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Butler, H., Cherry, J.M., Corradi, J., Dolinski, K., Eppig, J.T., Harris, M., Hill, D.P., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Reiser, L., Rhee, S., Richardson, J.E., Richter, J., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. and Yoon, J. (2001) Creating the gene ontology resource: Design and implementation. *Genome Res.* **11**:1425-1433.
- Bendena, W.G., Ayme-Southgate, A., Garbe, J.C. and Pardue, M.L. (1991) Expression of heat-shock locus hsr-omega in nonstressed cells during development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **144**:65-77.
- Bode, W. and Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* **204**:433-51.
- Chen, C. J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. and Roninson, I.B. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**:381-389.
- Dale, V., Joce, L., McNulty, S., Neilson, R.P., Ayres, M.P., Flannigan, M.D., Hanson, P.J., Irland, L.C., Lugo, A.E., Peterson, C.J., Simberloff, D., Swanson, F.J., Stocks, B.J. and Wotton, B.M. (2001) Climate change and forest disturbance. *BioScience* **51**:723-734.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:6025-6030.
- Du, N., Liu, X.Y. and Hew, C.L. (2003) Ice nucleation inhibition - Mechanism of antifreeze by antifreeze protein. *J. Biol. Chem.* **278**:36000-36004.

- Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Bio/Technol* **10**:271-275.
- Feyereisen, R. (1999) Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* **44**:507-533.
- Gazit, E., LaRocca, P., Sansom, M.S.P. and Shai, Y. (1998) The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**:12289-12294.
- Griffitts, J.S. and Aroian, R.V. (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* **27**:614-624.
- Gunning, R.V., Dand, H.T., Kemp, F.C., Nicholson, I.C. and Moores, G.D. (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2558-2563.
- Harwood, J.D., Wallin, W.G., and Obrycki, J.J. (2005) Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Mol Ecol* **14**: 2615-1623.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**:67-113.
- Hilbeck, A. (2001) Implications of transgenic, insecticidal plants for insect and plant biodiversity. *Persp. Plant Ecol. Evol. Syst.* **4**:43-61.
- Knowles, B.H. and Ellar, D.J. (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim Biophys Acta* **924**:509-518.
- Kuwana, H., Shimizu-Nishikawa, K., Iwahana, H. and Yamamoto D. (1996) Molecular cloning and characterization of the ABC transporter expressed in Trachea (ATET) gene from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* **1309**:47-52.
- Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman P. and Duncan, S.A. (2002) Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. *J Biol Chem* **277**: 45347-45355.
- Li, W., Zangerl, A.R., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2004) Characterization and evolution of furanocoumarin-inducible cytochrome P450s in the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *Insect Mol Biol* **13**:603-613.



- Liou, Y.C., Thibault, P., Walker, V.K., Davies, P.L. and Graham, L.A. (1999) A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochem* **38**:11415-11424.
- Logan, J.A., Regniere, J. and Powell, J.A. (2003) Assessing the impacts of global warming on forest pest dynamics. *Frontiers Ecol Environ* **1**:130-137.
- Losey, J.E., Rayor, L.S. and Carter, M.E. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* **399**:214.
- Lu, Z.X., Gaudet, D.A., Frick, M., Puchalski, B., Genswein, B. and Laroche, A. (2005) Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *J Biochem Mol Biol* **38**:420-31.
- Masson, L., Lu, Y.J., Mazza, A., Brousseau, R. and Adang, M.J. (1995) The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J Biol Chem* **270**:20309-20315.
- Masson, L., Tabashnik, B. Liu, B. Brousseau, R. and Schwartz, J.L. (1999) Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J Biol Chem* **274**:31996-32000.
- 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 delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* **23**:663-673.
- Moar, W.J., Masson, L. Brousseau, R. and Trumble J.T. (1990) Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl Environ Microbiol* **56**:2480-2483.
- Moreau, G. and Beauce, E. (2001) Developmental polymorphism: a major factor for understanding sublethal effects of *Bacillus thuringiensis*. *Ent Exp Appl* **98**: 133-140.
- Nakazawa, H., Tsuneishi, E., Ponnuvel, K.M., Furukawa, S., Asaoka, A., Tanaka, H., Ishibashi, J. and Yamakawa, M. (2004) Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology* **321**:154-162.
- Peters, W. (1992) Peritrophic Membranes, Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.

- Ponnuvel, K.M., Nakazawa, H., Furukawa, S., Asaoka, A., Ishibashi, J., Tanaka, H. and Yamakawa, M. (2003) A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J Virol* **77**:10725-10729.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H. and Feyereisen, R. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* **298**:179-181.
- Rausell, C., Garcia Robles, I., Sanchez, J., Munoz Garay, C., Martinez Ramirez, A.C., Real, M.D. and Bravo, A. (2004) Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim Biophys Acta* **1660**:99-105.
- Raymond, J.A. and DeVries, A.L. (1977) Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:2589-2593.
- Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends Genet* **16**:276-277.
- Romeis, J., Dutton, A. and Bigler, F. (2004) *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) *J. Insect Physiol.* **50**: 175-183.
- Rose, A.H. and Linquist, O.H. (1994) Insectes des Epinettes, du sapin et de la Pruche de l'est du Canada. Ressources Naturelles Canada, Service Canadien des Forets, Direction des sciences et du developpement durable.
- Saade, F.E., Dunphy, G.B. and Bernier, R.L. (1996) Response of the carrot weevil, *Listronotus oregonensis* (Coleoptera: Curculionidae), to strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biol Control* **7**:293-298.
- Schwartz, J.L., Lu, Y.J., Söhnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. and Adang, M.J. (1997) Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Letts* **412**:270-276.
- Siegfried, B.D., Waterfield, N. and French-Constant, R.H. (2005) Expressed sequence tags from *Diabrotica virgifera virgifera* midgut identify a coleopteran cadherin and a diversity of cathepsins. *Insect Mol Biol* **14**:137-143.
- Slatin, S.L., and Abrams, C.K. (1990) Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **169**:765-772.

- Soderhall, K., L. Cerenius, and M.W. Johansson. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Ann N Y Acad Sci* 712:155-161.
- Tyshenko, M.G., Doucet, D., Davies, P.L. and Walker, V.K.. 1997. The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nature Biotechnol* 15:887-890.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I.H., Ji, T.H. and Bulla, L.A. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 270: 5490-5494.
- van Frankenhuyzen, K. (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*, In *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. (Entwistle, P.F., Cory, J.S., Mailey, M. and Higgs, S. eds), pp. 1-35. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert. H. (1990) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl Environ Microbiol* 56:1378-1385.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1-12.
- Wang, P., Li, G. and Granados, R.R. (2004) Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochem Mol Biol* 34:215-227.
- Yan, J., Cheng, Q., Li, C.B. and Aksoy, S. (2002) Molecular characterization of three gut genes from *Glossina morsitans morsitans*: cathepsin B, zinc-metalloprotease and zinc-carboxypeptidase. *Insect Mol Biol* 11:57-65.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H. and Sato, R. (1997) Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur J Biochem* 246:652-657.
- Zou, Z. and Jiang, H. (2005) *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *J Biol Chem* 280: 14341-14348.

**Table 1. List of primers used in Q-PCR**

Clones	GenBank hit	Sequence <sup>a</sup>	Product size (bp)	PCR efficiency+1
1A-D1	Serpin	F-5' GCTTCCGCTAACACTATCAATA R-5' GTCGCCCTCGTCCGAAAT	161	1.95±0.03
1B-A6	Translation initiation factor	F-5' AGAGGAATCGCCTATGG R-5' GACTGAGCCTGAGCTATAACG	101	2.03±0.02
1B-E1	Unknown function	F-5' CAATCCACGCACTAACTGGA R-5' ACCGCGATTTTACGCATATC	168	2.04±0.03
1C-A6	Esterase	F-5' GTCATGTTCTCGTGTGG R-5' ACACCACCTGCTCAATACC	131	2.00±0.00
1C-B8	Hydroxydehydrogenase	F-5' GTTACCACCCTGTCTCACC R-5' GAATTCTCTCGGCATTGG	102	1.98±0.01
1C-C2	Cytochrome P450	F-5' CGTCCGTTACTTGTTTGTTTA R-5' CTCGAGCCGCGTGACTAT	125	2.08±0.02
1C-C8	Growth factor	F-5' CCGAGATTCTTAGACTTGACG R-5' TACGCCCTCCGTCTTCC	110	2.02±0.01
1C-D3	Antifreeze protein	F-5' CAGGACGCTAGCCTATTCT R-5' GCATCGCATGCTCAGTTTC	164	2.00±0.01
1D-C8	ABC receptor	F-5' CACTTGCTTCAGTTAACACG R-5' CTTAGCCACGGACAACG	122	2.02±0.01
1D-D11	Heat shock	F-5' ACCGGCAGTAGACTTGACC R-5' ATGCCGGTGCAATAGCC	197	1.97±0.02
1D-E7	DNA repair	F-5' GGCTGTCCACAATTTGAT R-5' ATCCGCTGTTTTGGTGGT	103	2.02±0.02
1E-C1	Aminopeptidase	F-5' GTAGTTGAGGATCTGCATACG R-5' GATGAGTTCAACGCCTACC	120	1.95±0.00
1G-F1	Serpin	F-5' GGAATGTATTCCAGTCAAGC R-5' TCTTCACTCATCATGTCAGG	139	2.05±0.03
3A-F11	Lipase	F-5' CTGTCTGACCAACATCTGC R-5' CCATGTGCAGTGAGTTACC	143	1.86±0.01
3B-E1	Chitin binding protein	F-5' TTA CTG CAG TCT GAT TGG R-5' GAGGCACAGAGTTCAACG	154	2.04±0.00
3C-D7	Metalloprotease precursor	F-5' ACACCTGGCCTAACACC R-5' AACTTGATGCAGGTGTGC	133	2.02±0.01
3E-G1	ATPase	F-5' GAGTTCCTGACCAAGTTCG R-5' GCTTGAGCATCTCCTTGG	124	2.02±0.04
PLPA2	DQ238110	F-5' CTGCATGGAGTCCAGAACA R-5' CTGACCAACTGGGAATGGT	173	1.99±0.02
L32	DQ238111	F-5' GAGCCTTCTCTGGAAGGT R-5' CCATGAACGAGGGCGACTT	155	1.93±0.03

<sup>a</sup> F= Forward primer, R= Reverse.

Table 2. Molecular function distribution<sup>a</sup>

Function	No. of sequences	Function	No. of sequences
<b>Catalytic activity</b>	<b>84 total</b>	<b>Binding activity</b>	<b>24 total</b>
1,4-alpha-glucan branching enzyme	1	Actin binding	5
Acetyl-CoA C-acetyltransferase	1	ATP binding	1
Acyl-CoA desaturase	1	Calcium ion binding	5
Alcohol dehydrogenase	1	Cooper ion binding	1
Alpha-amylase	1	DNA binding	1
Aryl/estrone sulfotransferase	1	Fatty acid binding	2
ATP dependent helicase	2	Polysaccharide/chitin binding	2
ATPase	4	RNA binding	5
Carboxylesterase/cholinesterase	4	Cell adhesion molecule activity	2
Cytochrome-c oxidase	2	<b>Structural molecule activity</b>	<b>24 total</b>
Cytokine	1	Cytoskeletal constituent	4
Dehydrogenase	2	Ribosomal constituent	20
DNA polymerase processivity factor	1	<b>Translation regulator activity</b>	<b>6 total</b>
DNA-directed RNA polymerase	1	Translation elongation factor	3
GTPase	3	Translation initiation factor	3
Hydrolase	10	<b>Transporter activity</b>	<b>6 total</b>
Lipase	5	Creatine:sodium symporter	1
Methionyl-tRNA aminoacylation	1	Protein transporter	2
Monoxygenase	4	Transporter	3
Oxidoreductase	4	<b>Stress response</b>	<b>4 total</b>
Peroxidase	1	Defence	2
Phosphoserine phosphatase	1	Chaperone activity	2
Protein disulfide isomerase	1	<b>Enzyme regulator activity</b>	<b>8 total</b>
Protein kinase	2	Serine proteinase inhibitor	8
Protein-tyrosine kinase	1		
Stearoyl-CoA 9-desaturase	1		
Sterol carrier	1		
Transferase	2		
ubiquitin activating/conjugating	1		
Peptidase	23		

<sup>a</sup> As designated by the Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>)

**Table S1. GenBank Characterization of the SSH library (E-value <  $e^{-15}$ )**

Clones	GenBank accession	E-Value	Homology	Organism
3E-C10	AAW40900	$4^{e-15}$	1,4-alpha-glucan branching enzyme	<i>Cryptococcus neoformans</i>
3B-D5	CAA67343	$3^{e-56}$	40-kDa V-ATPase subunit	<i>Manduca sexta</i>
3A-G6	CAA47610	$9^{e-32}$	H(+)-transporting ATPase	<i>Manduca sexta</i>
3E-G1	CAA45706	$1^{e-44}$	H(+)-transporting ATPase	<i>Manduca sexta</i>
3B-G12	CAD27758	$1^{e-29}$	Putative V-ATPase	<i>Anopheles gambiae</i>
3A-F10	CAB55499	$5^{e-47}$	Vacuolar ATPase subunit H	<i>Manduca sexta</i>
1G-B1	NP_004291	$5^{e-43}$	Acid phosphatase 1 isoform c	<i>Homo sapiens</i>
1B-E12	AAV84201	$2^{e-22}$	O-phosphoserine phosphatase	<i>Culicoides sonorensis</i>
1A-E10	AAS90632	$4^{e-42}$	Actin	<i>Cydia pomonella</i>
3E-C12	AAA82604	$1^{e-24}$	Actin	<i>Diphyllbothrium dendriticum</i>
1C-H11	CAA50674	$1^{e-29}$	Actin related protein	<i>Drosophila melanogaster</i>
1B-H8	AAP36272	$1^{e-55}$	Actin related protein	Synthetic construct
3E-F12	AAF44709	$5^{e-19}$	Acyl-CoA delta-9 desaturase	<i>Argyrotaenia velutinana</i>
1F-C4	AAF71515	$5^{e-29}$	AiC2 chymotrypsinogen	<i>Agrotis ipsilon</i>
1E-G2	AAC36149	$4^{e-24}$	Chymotrypsinogen-like protein	<i>Plodia interpunctella</i>
3B-C4	AAA84423	$1^{e-57}$	Trypsin	<i>Choristoneura fumiferana</i>
3E-D11	AAF24228	$8^{e-56}$	Trypsin-like PiT2c precursor	<i>Plodia interpunctella</i>
1E-B3	NP_584674	$1^{e-96}$	Alanyl tRNA synthetase	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
1C-G1	NP_058968	$9^{e-17}$	Aldehyde dehydrogenase	<i>Rattus norvegicus</i>
3A-H6	AAP97394	$4^{e-53}$	Alpha-amylase 3	<i>Diatraea saccharalis</i>
3A-D7	AAF37558	$2^{e-48}$	Aminopeptidase 1	<i>Helicoverpa punctigera</i>
1E-D4	AAK69605	$1^{e-82}$	Aminopeptidase N	<i>Spodoptera litura</i>
1D-C12	CAA66466	$3^{e-62}$	Aminopeptidase N	<i>Manduca sexta</i>
1E-C1	BAA33715	$4^{e-53}$	Aminopeptidase N	<i>Bombyx mori</i>
1E-D11	CAA66466	$4^{e-33}$	Aminopeptidase N	<i>Manduca sexta</i>
3B-D2	CAA61452	$7^{e-27}$	Aminopeptidase N	<i>Manduca sexta</i>
1E-F10	AD31184	$3^{e-18}$	Aminopeptidase N 2	<i>Lymantria dispar</i>
1D-B6	AAD31184	$3^{e-18}$	Aminopeptidase N 2	<i>Lymantria dispar</i>
1D-B12	AAF99701	$2^{e-48}$	Aminopeptidase N	<i>Epiphyas postvittana</i>
1C-A9	AAF99701	$8^{e-36}$	Aminopeptidase N	<i>Epiphyas postvittana</i>
1B-F3	AAF99701	$2^{e-35}$	Aminopeptidase N	<i>Epiphyas postvittana</i>
1A-F8	AAF99701	$8^{e-15}$	Aminopeptidase N	<i>Epiphyas postvittana</i>
1G-B7	AAY54259	$1^{e-23}$	Carboxylesterase	<i>Bombyx mori</i>
3E-A11	AAY54259	$4^{e-27}$	Carboxylesterase	<i>Bombyx mori</i>
3A-E6	AAY54259	$5^{e-27}$	Carboxylesterase	<i>Bombyx mori</i>
1C-A6	BAC10285	$4^{e-22}$	Esterase	<i>Plutella xylostella</i>
1D-A10	AAF86612	$2^{e-17}$	Antifreeze protein precursor	<i>Choristoneura fumiferana</i>
1C-D3	AAF86612	$3^{e-17}$	Antifreeze protein precursor	<i>Choristoneura fumiferana</i>
1F-D2	P14297	$9^{e-68}$	Arylphorin beta subunit precursor	<i>Manduca sexta</i>
3E-G3	AAA29305	$6^{e-52}$	Arylphorin beta subunit precursor	<i>Manduca sexta</i>
3C-B11	AAC06038	$2^{e-64}$	Beta-glucosidase precursor	<i>Spodoptera frugiperda</i>
3D-G8	AAC06038	$2^{e-60}$	Beta-glucosidase precursor	<i>Spodoptera frugiperda</i>
3C-H9	AAC06038	$3^{e-36}$	Beta-glucosidase precursor	<i>Spodoptera frugiperda</i>
3A-E12	AAC06038	$4^{e-27}$	Beta-glucosidase precursor	<i>Spodoptera frugiperda</i>

3A-D4	AAG26008	$1^{e-45}$	Beta-glucosidase precursor	<i>Tenebrio molitor</i>
3A-H1	AAP13852	$5^{e-47}$	Glucosidase	<i>Bombyx mori</i>
3C-C11	AAP13852	$4^{e-46}$	Glucosidase	<i>Bombyx mori</i>
1B-H3	AAG37912	$1^{e-15}$	Cadherin-related protein receptor <i>Bt-R1</i>	<i>Manduca sexta</i>
1A-G11	XP_394063	$4^{e-24}$	Similar to DE-cadherin	<i>Apis mellifera</i>
1B-C12	BAB79277	$4^{e-19}$	Calreticulin -binding protein	<i>Galleria mellonella</i>
3D-F5	CAF25190	$3^{e-40}$	Carboxypeptidase	<i>Helicoverpa armigera</i>
3A-F2	CAF25190	$3^{e-31}$	Carboxypeptidase	<i>Helicoverpa armigera</i>
3B-F4	CAF25189	$2^{e-39}$	Carboxypeptidase precursor	<i>Helicoverpa armigera</i>
3D-E10	AAS82583	$1^{e-22}$	Midgut carboxypeptidase A1	<i>Trichoplusia ni</i>
1D-H4	AAS82583	$7^{e-16}$	Midgut carboxypeptidase A1	<i>Trichoplusia ni</i>
1G-F12	AAC24041	$1^{e-33}$	Casein kinase II alpha subunit	<i>Spodoptera frugiperda</i>
1G-F6	AC24317	$7^{e-33}$	Cellular retinoic acid binding protein	<i>Manduca sexta</i>
1E-D1	BAD26694	$2^{e-16}$	Cellular retinoic acid binding protein	<i>Plutella xylostella</i>
1B-H5	AAS12599	$5^{e-53}$	Chitin synthase	<i>Spodoptera frugiperda</i>
1A-E2	AAN39123	$1^{e-34}$	Cytochrome oxidase subunit I	<i>Molippa nibasa</i>
3C-F11	AAG01168	$9^{e-21}$	Cytochrome oxidase subunit III	<i>Samia cynthia ricini</i>
1E-A7	AAP83689	$8^{e-40}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
1A-A2	AAP83689	$5^{e-39}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
1D-H11	AAP83689	$2^{e-38}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
1C-C2	AAP83689	$2^{e-38}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
1G-E1	AAP83689	$2^{e-37}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
1C-A10	AAP83689	$6^{e-34}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
1E-A10	AAP83689	$4^{e-23}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
3B-C5	AAP83688	$6^{e-15}$	Cytochrome P450	<i>Depressaria pastinacella</i>
3B-B5	AAC35429	$1^{e-43}$	Diapause associated protein 2	<i>Choristoneura fumiferana</i>
3A-B7	AAK56552	$6^{e-28}$	Ecdysone oxidase	<i>Spodoptera littoralis</i>
1F-H1	BAB21109	$3^{e-57}$	Elongation factor 1 delta	<i>Bombyx mori</i>
1F-B1	AAM53446	$7^{e-23}$	Elongation factor 1-alpha	<i>Holorusia rubiginosa</i>
1A-B8	AAL83698	$9^{e-51}$	Translation elongation factor 2	<i>Spodoptera exigua</i>
1G-F8	AAP22070	$6^{e-30}$	Eukaryotic translation initiation	<i>Homo sapiens</i>
1B-A6	XP_395455	$9^{e-64}$	Similar to eukaryotic translation initiation	<i>Apis mellifera</i>
1B-E9	AAK85401	$1^{e-69}$	Translation initiation factor eIF4A	<i>Spisula solidissima</i>
3E-G4	AAF44717	$7^{e-18}$	Ferritin	<i>Manduca sexta</i>
1A-F3	Q27319	$6^{e-18}$	Gelsolin, cytoplasmic	<i>Homarus americanus</i>
1G-H3	CAA53295	$2^{e-24}$	Gelsonin	<i>Drosophila melanogaster</i>
1D-F3	CAD33827	$2^{e-66}$	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Plutella xylostella</i>
1G-D10	AAT91474	$5^{e-43}$	H3 histone family 3A	<i>Felis catus</i>
1B-D2	AAG30945	$1^{e-16}$	Heat shock protein hsp20.4	<i>Bombyx mori</i>
1D-D11	BAD18974	$4^{e-98}$	Heat shock protein Hsp70	<i>Antheraea yamamai</i>
3E-A1	AAG44959	$4^{e-15}$	Hexamerin 2	<i>Corcyra cephalonica</i>
1C-B8	Q28719	$2^{e-39}$	12-hydroxydehydrogenase	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
1C-C8	BAB16695	$2^{e-25}$	IDGF like protein	<i>Bombyx mori</i>
1E-H6	AAF21642	0	Inebriated protein	<i>Manduca sexta</i>

1F-D10	AAO85806	2 <sup>e-46</sup>	Integrin beta 1	<i>Pseudoplesia includens</i>
1E-E1	AAF19266	1 <sup>e-33</sup>	Juvenile hormone binding protein 36kDa	<i>Bombyx mori</i>
3B-G7	CAD23378	4 <sup>e-18</sup>	Juvenile hormone diol kinase	<i>Manduca sexta</i>
3E-A8	AAN17506	3 <sup>e-31</sup>	Laccase 1	<i>Manduca sexta</i>
3E-B9	BAD22559	1 <sup>e-20</sup>	Lipase	<i>Antheraea yamamai</i>
3A-F11	BAD22559	6 <sup>e-55</sup>	Lipase	<i>Antheraea yamamai</i>
1C-F5	BAD22559	7 <sup>e-44</sup>	Lipase	<i>Antheraea yamamai</i>
3C-B6	BAC00960	1 <sup>e-16</sup>	Lipase-1	<i>Bombyx mori</i>
3E-H1	AAV84257	4 <sup>e-61</sup>	Triacylglycerol lipase	<i>Culicoides sonorensis</i>
1B-C8	AAK19154	7 <sup>e-23</sup>	Macrophage migration inhibitory factor	<i>Amblyomma americanum</i>
3E-G5	BAA03016	6 <sup>e-61</sup>	Mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase	<i>Rattus norvegicus</i>
3A-F4	AAV91412	4 <sup>e-19</sup>	Myosin 2 light chain	<i>Lonomia obliqua</i>
1F-C5	AAH04587	3 <sup>e-66</sup>	Pabpc1 protein	<i>Mus musculus</i>
3B-E1	AAR06265	1 <sup>e-16</sup>	Peritrophic membrane chitin binding	<i>Trichoplosia ni</i>
1E-H2	AAR06266	3 <sup>e-23</sup>	Peritrophic membrane chitin binding	<i>Trichoplosia ni</i>
1D-E7	NP_571105	5 <sup>e-43</sup>	DNA repair	<i>Danio rerio</i>
3C-F8	NP_776994	5 <sup>e-57</sup>	Poly(A) binding protein, nuclear 1	<i>Bos taurus</i>
1G-C11	XP_216517	7 <sup>e-49</sup>	Similar to poly(A)-binding protein	<i>Rattus norvegicus</i>
3B-C3	AAC24190	1 <sup>e-19</sup>	Potassium coupled amino acid transporter	<i>Manduca sexta</i>
1D-F4	AAU84942	1 <sup>e-24</sup>	Probable transport protein Sec61	<i>Toxoptera citricida</i>
3E-C6	AAT99314	5 <sup>e-30</sup>	Profilin	<i>Bombyx mori</i>
1F-D3	XP_394715	5 <sup>e-25</sup>	Profilin	<i>Apis mellifera</i>
1F-G7	BAD13316	4 <sup>e-35</sup>	Proliferating cell nuclear antigen	<i>Hyphantria cunea</i>
1G-B6	NP_491995	9 <sup>e-18</sup>	Protein disulfide isomerase	<i>Caenorhabditis elegans</i>
1E-E11	AAO92284	1 <sup>e-29</sup>	Putative beta thymosin	<i>Dermacentor variabilis</i>
1D-G3	BAB33421	6 <sup>e-17</sup>	Putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>
1E-H9	AAP93585	1 <sup>e-40</sup>	Putative thioredoxin peroxidase	<i>Apis mellifera ligustica</i>
1A-A8	NP_957222	3 <sup>e-70</sup>	RAB family member rab-7	<i>Danio rerio</i>
3A-C6	AAH85270	7 <sup>e-24</sup>	RAB11B, member RAS oncogene family	<i>Mus musculus</i>
1G-D5	AAH20654	5 <sup>e-31</sup>	RAB8B, member RAS oncogene family	<i>Homo sapiens</i>
3D-F6	AAC47136	1 <sup>e-25</sup>	Retinol dehydratase	<i>Spodoptera frugiperda</i>
1D-F8	AAT01911	2 <sup>e-23</sup>	40S ribosomal protein S27A	<i>Lonomia obliqua</i>
1C-B5	AAV91388	3 <sup>e-40</sup>	Ribosomal protein 17	<i>Lonomia obliqua</i>
1A-H4	AAV91469	2 <sup>e-22</sup>	Ribosomal protein 31	<i>Lonomia obliqua</i>
3D-E9	AAV91386	3 <sup>e-73</sup>	Ribosomal protein L1	<i>Lonomia obliqua</i>
1E-B9	AAM53949	5 <sup>e-16</sup>	Ribosomal protein L13A	<i>Lonomia obliqua</i>
3C-D4	BAD26689	7 <sup>e-45</sup>	Ribosomal protein L18A	<i>Plutella xylostella</i>
3D-A9	AAV34838	1 <sup>e-63</sup>	Ribosomal protein L27	<i>Bombyx mori</i>
3B-H6	BAD26663	2 <sup>e-54</sup>	Ribosomal protein L36A	<i>Plutella xylostella</i>
1F-B2	AAV34849	2 <sup>e-33</sup>	Ribosomal protein L36A	<i>Bombyx mori</i>
3C-E4	AAV34815	2 <sup>e-15</sup>	Ribosomal protein L6	<i>Bombyx mori</i>
1A-H7	AAV34819	5 <sup>e-46</sup>	Ribosomal protein L9	<i>Bombyx mori</i>



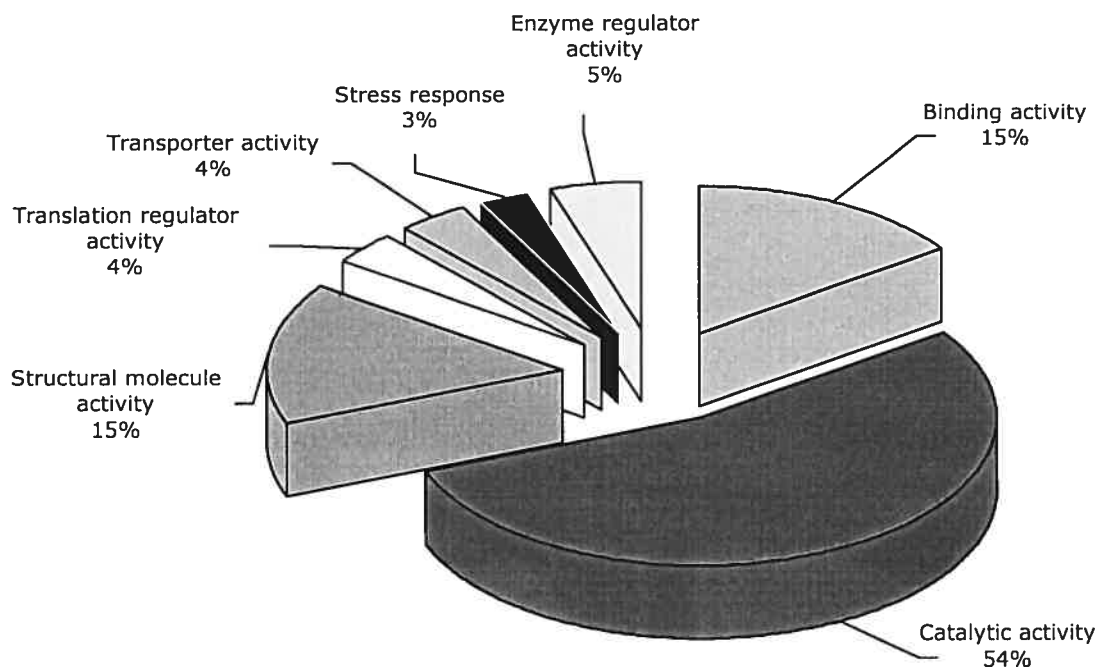
1F-E3	AAM53951	2 <sup>e-32</sup>	Ribosomal protein S13	<i>Choristoneura parallela</i>
1G-B9	AAV34876	3 <sup>e-28</sup>	Ribosomal protein S18	<i>Bombyx mori</i>
3C-G1	AAV34881	4 <sup>e-35</sup>	Ribosomal protein S24	<i>Bombyx mori</i>
3D-B2	AAV34881	8 <sup>e-20</sup>	Ribosomal protein S24	<i>Bombyx mori</i>
1A-H6	AAV34888	1 <sup>e-36</sup>	Ribosomal protein S30	<i>Bombyx mori</i>
3A-D6	AAB06459	1 <sup>e-23</sup>	Ribosomal protein S6	<i>Manduca sexta</i>
1A-C5	AAK92178	2 <sup>e-82</sup>	Ribosomal protein S7	<i>Spodoptera frugiperda</i>
1B-F2	AAL62472	2 <sup>e-54</sup>	Ribosomal protein S8	<i>Spodoptera frugiperda</i>
1F-G12	BAD26659	2 <sup>e-24</sup>	Ribosomal protein S8	<i>Plutella xylostella</i>
3A-C5	CAH04121	9 <sup>e-26</sup>	Ribosomal protein S2e	<i>Papilio dardanus</i>
1B-D9	AAA28603	9 <sup>e-36</sup>	RNA helicase	<i>Drosophila melanogaster</i>
1A-G1	NP_597437	5 <sup>e-55</sup>	RNA helicase	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
1F-F10	CAD70701	5 <sup>e-45</sup>	RNA polymerase II large subunit	<i>Drosophila guanche</i>
1C-A11	AAV91432	3 <sup>e-17</sup>	Serine protease 1	<i>Lonomia obliqua</i>
1B-B12	AAD40672	1 <sup>e-25</sup>	Serpin	<i>Hyphantria cunea</i>
1G-F1	AAV91429	1 <sup>e-65</sup>	Serpin 2	<i>Lonomia obliqua</i>
1G-C5	AAV91429	7 <sup>e-23</sup>	Serpin 2	<i>Lonomia obliqua</i>
1E-H4	AAO21506	9 <sup>e-28</sup>	Serpin 3b	<i>Manduca sexta</i>
1A-D1	AAF61252	2 <sup>e-24</sup>	Serpin-2	<i>Bombyx mori</i>
1B-H11	AAF61252	8 <sup>e-18</sup>	Serpin-2	<i>Bombyx mori</i>
1F-C8	AAF61252	1 <sup>e-16</sup>	Serpin-2	<i>Bombyx mori</i>
1D-B1	BAB33293	1 <sup>e-40</sup>	Serpin-like protein (SEP-LP)	<i>Bombyx mori</i>
3A-E10	XP_392776	6 <sup>e-36</sup>	Similar to glutamate dehydrogenase	<i>Apis mellifera</i>
1E-A2	AAT72922	5 <sup>e-26</sup>	Sterol carrier protein	<i>Spodoptera littoralis</i>
1F-E10	AAT72922	3 <sup>e-25</sup>	Sterol carrier protein	<i>Spodoptera littoralis</i>
1F-A5	AAQ88395	3 <sup>e-16</sup>	Synaptic vesicle 2-like protein 2	<i>Ctenocephalides felis</i>
1C-H8	BAC99978	2 <sup>e-41</sup>	Translationally controlled tumor protein	<i>Bombyx mori</i>
3C-C12	AAV91416	4 <sup>e-15</sup>	Troponin C 2	<i>Lonomia obliqua</i>
1D-E5	AAH44032	0	U2af2-prov protein	<i>Xenopus laevis</i>
1B-D4	AAL91103	0	Ubiquitin	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
1D-G6	BAD66842	1 <sup>e-40</sup>	Ubiquitin-like protein	<i>Antheraea yamamai</i>
1G-G6	NP_998632	3 <sup>e-33</sup>	Ubiquitin-activating enzyme E1C	<i>Danio rerio</i>
3A-H12	AAN39701	4 <sup>e-75</sup>	Z9-desaturase	<i>Choristoneura parallela</i>
1D-C8	BAA83106	3 <sup>e-35</sup>	ABC transporter	<i>Drosophila melanogaster</i>
1E-D5	NP_507118	3 <sup>e-25</sup>	Acyltransferase 3 family	<i>Caenorhabditis elegans</i>
1A-D11	AAF42917	4 <sup>e-18</sup>	Apoptosis-related protein PNAS-2	<i>Homo sapiens</i>
1G-B4	SNFF5K	3 <sup>e-27</sup>	Proteasome endopeptidase complex	<i>Drosophila melanogaster</i>
3C-D7	AAK07478	8 <sup>e-17</sup>	Putative zinc-metalloproteinase precursor	<i>Glossina morsitans morsitans</i>
3E-B1	AAK07478	1 <sup>e-16</sup>	Putative zinc-metalloproteinase precursor	<i>Glossina morsitans morsitans</i>
1G-A11	XP_517933	1 <sup>e-56</sup>	S-phase kinase-associated protein	<i>Pan troglodytes</i>
1E-F4	NP_005413	1 <sup>e-16</sup>	Tectorin alpha precursor	<i>Homo sapiens</i>

**Table 3. Relative expression ratio normalized with PLPA2 in each biological replicate.**

Clones <sup>a</sup>	BR1 <sup>b</sup>	BR2
<b>Enhanced</b>		
Serpin (1A-D1)	7.72±0.00	6.20±1.78
Serpin (1G-F1)	10.38±0.29	2.49±0.73
Antifreeze protein (1C-D3)	7.55±0.08	4.61±0.00
Cytochrome P450 (1C-C2)	7.17±0.05	3.87±0.00
Esterase (1C-A6)	2.78±0.31	4.29±0.38
DNA repair (1D-E7)	2.29±0.01	3.06±0.00
Growth factor (1C-C8)	3.54±0.08	1.84±0.29
Translation initiation factor (1B-A6)	2.27±0.12	1.15±0.08
Unknown function (1B-E1)	1.41±0.13	3.74±0.24
<b>Stable</b>		
Chitin binding protein (3B-E1)	1.24±0.15	1.62±0.38
Aminopeptidase (1E-C1)	0.89±0.05	1.08±0.14
Hydroxydehydrogenase (1C-B8)	0.64±0.09	0.67±0.06
ATPase (3E-G1)	0.41±0.09	0.76±0.04
ABC (1D-C8)	0.34±0.17	1.08±0.00
<b>Repressed</b>		
Heat shock (1D-D11)	0.48±0.01	0.20±0.01
Metalloprotease precursor (3C-D7)	0.42±0.01	0.13±0.01
Lipase (3A-F11)	0.11±0.02	0.09±0.02

<sup>a</sup> A gene was considered differentially expressed if its relative expression or the reciprocal (1/R) is twofold or greater. Each value represents the average of two to three experiments and the ± sign indicates the standard error of the mean.

<sup>b</sup> BR= Biological replicat



**Figure 1. Breakdown of the different known molecular functions in the subtractive library as assigned by the Gene Ontology software**

**SECTION III- Discussion**

## Discussion

Lors de l'utilisation de toxines *Bt* aux champs comme biopesticide, il existe une forte probabilité pour que des insectes dits non-cibles entrent en contact avec ces toxines bactériennes à des doses sublétales. Ce problème a été récemment discuté dans le cas particulier des larves du papillon monarque (*Danaus plexippus*), une espèce non-ciblée par les toxines *Bt*, mais qui pourrait être affectée indirectement par la présence aux champs de maïs transgénique *Bt* (Losey, Rayor, et Carter, 1999). Cependant, même si les conséquences de ces expositions ne sont pas directement visibles (car ne résultent pas en la mort de l'insecte), il existe des effets plus subtils tels qu'un temps de développement plus long des larves (Siegfried, Spencer, et Nearman, 2000; Van Frankenhuyzen et Nystrom, 1987) associé à des changements métaboliques (Smirnov, 1983) qui peuvent conduire à des changements de dynamique de populations (Kempton, Lowe, et Bintliffe, 1980; Pery, Mons, et Garric, 2004).

À ce jour, la majorité des études concernant l'évaluation de la sensibilité d'un insecte à une toxine Cry se fait par la mesure du taux de la mortalité (Lambert *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1990; Tabashnik *et al.*, 2000). De plus, les spectres d'hôtes des diverses classes de toxines Cry ont été étudiés au niveau de l'interaction entre la toxine et des récepteurs de l'insecte (Ferré *et al.*, 1991; Haider et Ellar, 1987; Van Rie *et al.*, 1989). En effet, cette interaction spécifique entre une toxine donnée et un récepteur présent sur la membrane épithéliale de l'intestin de l'insecte est considérée comme étant déterminante dans la mise en place du spectre d'hôte et donc, de la sensibilité d'un insecte vis-à-vis de cette toxine (Van Rie *et al.*, 1990). Cependant, même si la

susceptibilité d'un insecte à une toxine Cry dépend obligatoirement d'une liaison de la toxine au récepteur de cellules épithéliales, cette liaison ne cause pas obligatoirement cette susceptibilité. Hormis des expériences de bioessais et les travaux d'interactions toxine-récepteur afin de déterminer la toxicité d'une protéine Cry envers un insecte donné, il existe peu d'études sur la réponse transcriptionnelle de l'insecte suite à l'ingestion d'une toxine *Bt*. Il n'existe présentement aucune donnée quantitative quant à la réponse transcriptionnelle chez l'insecte lorsqu'il est exposé à une dose sublétales de toxine Cry.

Nous avons ainsi choisi d'étudier la réponse transcriptionnelle de 17 gènes chez des larves de *C. fumiferana* après une exposition sublétales à la toxine Cry1Ab de *Bt* en utilisant la technique de la PCR en temps réel à quantification relative. Au vu des résultats obtenus, les études pourront être étendues à d'autres insectes sensibles ou résistants à la toxine Cry1Ab afin de voir si les mêmes gènes répondent de façon similaires. Ces gènes pourraient être alors utilisés comme marqueurs universels chez des insectes non-cibles dans un programme d'évaluation des risques liés à l'utilisation de *Bt* aux champs.

## **1.0 Protocole experimental**

### **1.1 Choix de la dose de toxine**

Il existe différentes unités de mesure permettant d'évaluer l'effet d'une molécule toxique sur un insecte donné. Les deux unités les plus utilisées sont la LD50 qui est la dose de la molécule appliquée tuant 50% de la population testée, et la ED50 qui est la dose requise pour produire un effet spécifique sur 50% d'une population testée. Dans le cas de *C. fumiferana*, la ED50 de la toxine Cry1Ab (mesurant une dysfonctionnalité du système intestinal de l'insecte) est estimée entre 13-17 ng de toxine Cry1Ab active/larve (van Frankenhuyzen et Nystrom, 2002). Dans notre étude, nous avons ainsi choisi d'utiliser une dose de 35 ng de protoxine Cry1Ab/larve ce qui correspond à environ une concentration de 17 ng de toxine active/larve (après clivage protéolytique).

### **1.2 Administration du traitement**

Les expériences de Q-PCR ont été réalisées sur au moins deux réplicats biologiques avec six réplicats techniques par réplicat biologique pour chaque gène étudié. Les expériences sont réalisées sur des larves de *C. fumiferana* au stade L4 (c'est-à-dire le dernier stade avant la transformation en chrysalide) car elles sont sensibles à la toxine à ce stade de leur développement (van Frankenhuyzen et Nystrom, 2002) et les dissections des intestins sont plus faciles en raison de leur taille. Les larves sont mises à jeûner pour quelques heures afin de faciliter l'ingestion rapide de la toxine. Celle-ci est administrée sous forme soluble dans un tampon nourricier. Après ingestion, les larves sont placées sur un milieu nourricier pendant 24h avant d'être disséquées. L'intestin (lieu principal où s'effectuent les différentes étapes de reconnaissance, liaison de la

toxine et réactions enzymatiques) est prélevé afin d'en extraire l'ARN messenger pour les analyses ultérieures.



## 2.0 Banque d'ADN complémentaire

Afin de bien comprendre les processus biologiques dirigés par l'expression différentielle de certains gènes chez un organisme précis, il demeure essentiel de comprendre la régulation moléculaire de ceux-ci (Diatchenko *et al.*, 1996). Les gènes qui sont différentiellement exprimés se doivent d'être identifiés, clonés et puis étudiés en détail par la suite. Les méthodes de soustraction d'ADN traditionnelles permettent d'isoler et d'identifier des gènes exprimés différentiellement de façon efficace (Duguin et Dinauer, 1990; Hara *et al.*, 1991; Hendrick *et al.*, 1984). Par contre, ces méthodes ne permettent pas d'obtenir des transcrits présents en faibles quantités (rares) dans une population donnée. De ce fait, elles passent à côté de plusieurs changements d'expression très subtils au niveau cellulaire, mais non négligeables quant aux processus biologiques qui en découlent. C'est pourquoi nous avons utilisé l'hybridation suppressive soustractive (SSH) afin d'identifier tous les acteurs de la réponse transcriptionnelle (Diatchenko *et al.*, 1996) engendrée par le traitement à la toxine Cry1Ab de *Bt*. Cette méthode permet de sélectionner les fragments amplifiés ciblés qui sont différentiellement exprimés, tout en supprimant de façon simultanée les ADN amplifié non ciblés. La banque d'ADN complémentaire SSH, créée à partir de deux populations de larves (témoin et exposée à une dose sublétales de la toxine Cry1Ab), nous a permis d'isoler et de caractériser 1091 séquences. Ces séquences proviennent à proportions égales des deux bibliothèques que nous avons créées : «Forward» (enrichie en gènes surexprimés après exposition à la toxine) et «Reverse» (enrichie en gènes sous-exprimés après exposition à la toxine). Les 1091 séquences analysées comportent 623 séquences uniques ainsi que 468 qui sont des réplicats ou des séquences faisant partie

de mêmes contigs (séquences se recoupant entre elles). Le fait d'obtenir une certaine redondance dans la banque nous indique que nous avons analysé suffisamment de clones pour avoir une idée précise de la composition de cette banque (Diatchenko *et al.*, 1999). Afin de faciliter les analyses ultérieures et d'augmenter le niveau de spécificité des séquences, nous avons été contraints d'éliminer certaines séquences en raison de leur petite taille. Les séquences d'insectes que nous avons analysées avaient donc une taille minimale de 100 pb afin de pouvoir être utilisées ultérieurement en PCR quantitative.

### 3.0 Analyse des séquences

L'analyse des séquences s'est réalisée en plusieurs étapes. Nous avons d'abord procédé à des alignements d'acides nucléiques (BlastN) dans une banque publique (GenBank) (Altschul *et al.*, 1990). Cette méthode n'a pas été très fructueuse puisque le niveau de conservation des séquences d'acides nucléiques entre les diverses espèces d'insectes est très faible. En procédant à un alignement par acides aminés (BlastX) avec un seuil de criblage élevé (E-value  $< e^{-15}$ ), nous avons obtenu de meilleurs résultats, même si seulement 171 des 623 séquences uniques ont pu être caractérisées avec ce seuil de criblage. Nous avons pu classer 156 de ces 171 séquences en différents groupes, grâce au logiciel Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2001). Nous avons pu ainsi remarquer qu'une majorité des gènes présents à l'intérieur de notre librairie, auxquels une fonction a pu être assignée, est relié à des activités catalytiques.

#### 4.0 Profils d'expression

Afin d'établir un lien entre l'exposition sublétales de la toxine de *Bt* et la réponse métabolique chez l'insecte, il importe de connaître le profil d'expression des gènes clés. Les expériences de PCR quantitatives sont de mise lorsqu'il est question de quantification rapide et précise d'un gène spécifique (Heid *et al.*, 1996). De plus, cette méthode requiert une quantité minimale de matériel de départ. Les gènes sélectionnés ont été classés en trois catégories en fonction du profil d'expression obtenu: gènes surexprimés, gènes stables ainsi que les gènes réprimés lorsque l'insecte est mis en contact avec une dose sublétales de la protoxine Cry1Ab.

#### 4.1 Gènes surexprimés

Six des clones sélectionnés ont présenté une augmentation de leur niveau de transcription lorsque analysés en Q-PCR 24h suivant la fin du traitement par la toxine Cry1Ab. Deux de ces clones, présentant des homologies de séquences avec des inhibiteurs de sérines protéases (SERPIN), ont montré le plus grand niveau de surexpression. Les sérines protéases font partie du mécanisme de régulation des phénoloxidases qui sont impliquées dans une réponse de défense lorsqu'il y a présence d'un corps étranger (Soderhall, Cerenius, et Johansson, 1994). La détection de ces corps étrangers se fait *via* des molécules de reconnaissance dans le sang (hémolymphe) chez les invertébrés (Kanost et Jiang, 1997). Ces molécules provoquent une induction du système d'activation des prophénoloxidases (proPO), ce qui peut mener à l'activation de divers systèmes de défense au sein de l'organisme (Soderhall et Cerenius, 1998). Après l'activation du système des proPO, la bactérie est noircie dans l'hémolymphe de

l'hôte par un dépôt de mélanine due à l'action même des phénoloxidasés qui sont des oxidoréductases (Soderhall et Cerenius, 1998). Ces sérines protéases, qui activent les proPO, ont déjà été identifiées chez plusieurs insectes dont *Drosophila melanogaster* (Chosa *et al.*, 1997) ainsi que *B. mori* (Ashida et Dohke, 1980) et ont un poids moléculaire de 30 kDa. Le fait que les SERPIN soient surexprimées lors du traitement laisse suggérer une inhibition de la cascade des phénoloxidasés déclenchée par la présence de la toxine dans l'intestin de l'insecte. Par contre, il se peut que ce soit également une façon pour l'insecte de réduire l'activation protéolytique (réalisée également par des sérines protéases intestinales) de la toxine et ainsi diminuer son pouvoir pathogène. Malgré tout, les données de surexpression de ces deux SERPIN potentielles nous montrent clairement l'importance d'une régulation enzymatique lors du traitement par la toxine. Il a été rapporté récemment chez *Bombyx mori* l'induction d'une activité antivirale, dirigée contre un nucleopolyhedrovirus, par une sérine protéase présente dans le suc digestif (Nakazawa *et al.*, 2004). La sérine protéase aurait donc un rôle antiviral et la SERPIN aurait comme effet de ralentir cette réponse chez l'insecte.

Un autre gène ayant des homologues avec la séquence nucléotidique d'une protéine antigèle décrite chez *C. fumiferana* (Liou *et al.*, 1999; Tyshenko *et al.*, 1997) présente lui aussi une surexpression de sa transcription après le traitement par la toxine. Cette protéine est présente habituellement chez des organismes adaptés aux températures très basses, les protégeant des températures inférieures à 0°C (Du, Liu, et Hew, 2003). Les protéines antigèles ont déjà été isolées chez des poissons (Fletcher, Hew, et Davies, 2001), des plantes (Breton *et al.*, 2000), chez certains coléoptères mais

également chez des lépidoptères, dont *C. fumiferana* (Liou *et al.*, 1999; Tyshenko *et al.*, 1997). Ces protéines ont pour effet de diminuer le point de congélation des fluides extracellulaires, permettant à la larve de survivre à ces conditions (Doucet *et al.*, 2002). Le fait que ce gène soit surexprimé lors de l'exposition à la toxine peut correspondre à une réponse de stress et même de défense généralisée chez l'insecte.

Faisant partie d'une superfamille de gènes, les cytochromes P450 sont impliqués dans une multitude de processus métaboliques incluant la réponse métabolique aux insecticides (Feyereisen, 1999). Cette famille est probablement la mieux connue des gènes impliqués dans une réponse environnementale (Berenbaum, 2002). Ces gènes ont de nombreuses fonctions: ils catalysent des transformations oxydatives comme les monooxygénations, des oxydations de type NO-synthase, des déhydrogénations ainsi que des oxydations de type peroxydases (Mansuy, 1998). De ce fait, cette superfamille d'enzymes participe à une très grande variété de transformations, incluant la biosynthèse ainsi que les réactions de détoxification. L'expression du cytochrome P450 est régulée par une multitude de facteurs, passant des stades de développement aux expositions à des substances endogènes ou exogènes (Berenbaum, 2002). Dans notre librairie, un clone présente une forte homologie avec un cytochrome P450 de *Depressaria pastinacella* (Li *et al.*, 2004). Chez cet organisme, le cytochrome P450 est médiateur de détoxification de composés présents dans les plantes tel que le furanocoumarin (Li *et al.*, 2004). Chez les insectes, les réactions catalysées par les cytochromes P450 sont d'une grande importance pour la détoxification des pesticides. (Berenbaum, 2002; Feyereisen, 1999; Scott, 1999). Plusieurs clones similaires au cytochrome P450 de *Depressaria pastinacella* ont été identifiés dans notre librairie.

L'analyse en Q-PCR d'un de ces clones montre une surexpression transcriptionnelle lors du traitement par la toxine.

Un clone similaire à une estérase a également présenté une augmentation de son profil de transcription suite au traitement. La superfamille des estérases est également impliquée dans les mécanismes de détoxification (Ranson *et al.*, 2002) et joue un rôle crucial dans les mécanismes de défense des insectes après une exposition aux pesticides chimiques (Feyereisen, 1999). Ceci nous montre qu'une réponse de détoxification semble se mettre en place lors de l'exposition à une dose sublétales de la toxine chez la larve.

Une surexpression d'un clone associé à un mécanisme de réparation de l'ADN se produit aussi après le traitement. Sa séquence nucléotidique possède une forte homologie avec un gène du poisson zèbre (Lerch-Gaggl *et al.*, 2002). Il semblerait donc qu'une réponse impliquée dans la réparation de l'ADN serait induite après le traitement.

Trois clones ont montré une surexpression du niveau de transcription dans un seul des deux réplicats biologiques étudiés. Ces résultats non-similaires nous mènent à certaines hypothèses : une efficacité du traitement moins optimale dans un réplicat biologique que dans l'autre, les larves n'étaient pas exactement au même stade dans les deux réplicats, ou même la présence d'une variation temporelle au niveau de l'expression de ces gènes. Des études complémentaires incluant des temps de prélèvements de l'intestin plus courts (<24h) après le traitement avec un suivi en Q-PCR de ces gènes pourraient nous éclairer sur ce point. En effet, la majorité des étapes importantes de l'interaction toxines-cellules intestinales s'effectue dans les premières heures après ingestion (Angsuthanasombat, Crickmore, et Ellar, 1991; Segura *et al.*,

2000). Il est donc possible que le pic de transcription se soit déjà produit dans certains cas et que la phase de 'récupération' après ce traitement subléthal soit enclenchée comme il a été démontré dans d'autres cas (Loeb *et al.*, 2001; Spies et Spence, 1985). Ces trois gènes ont les fonctions suivantes: deux sont impliqués dans divers mécanismes de croissance cellulaire et un est associé à un facteur d'initiation de la transcription. Étant donné que les réplicats biologiques ne produisent pas les mêmes résultats, aucune conclusion ne peut être tirée quant à leur rôle dans le mécanisme de stress ou de défense chez l'insecte.

#### 4.2 Gènes stables

Sur les 17 clones analysés en Q-PCR, cinq n'ont démontré aucun changement transcriptionnel après exposition à la toxine. Ils sont tous associés ou reliés à des fonctions d'adhésion ainsi qu'à des composantes membranaires. Les aminopeptidases et les cadhérines sont impliquées dans la liaison (récepteurs) des toxines Cry1A sur la membrane épithéliale des lépidoptères (Vadlamudi *et al.*, 1995; Yaoi *et al.*, 1997). On observe donc que malgré la présence de toxine Cry1Ab dans l'intestin, il n'y a aucune altération quant à la régulation des récepteurs spécifiques à cette toxine. Un autre clone similaire à une protéine de liaison de la membrane péritrophique de *Trichoplusia ni* (Wang, Li, and Granados, 2004) ne semble pas être régulé différemment en présence de la toxine. La membrane péritrophique couvre l'intérieur de l'intestin et agit comme une barrière de protection contre divers microorganismes présents dans la lumière intestinale (Peters, 1992). Deux autres clones ne semblent pas affectés non plus par le traitement et sont tous deux impliqués dans une activité de récepteur: une V-



ATPase décrite chez *Manduca sexta* (Novak *et al.*, 1992) et un transporteur ABC. Les ATPase sont des pompes situées dans les membranes plasmiques. Ces pompes sont impliquées dans la formation des canaux protoniques (Zheng *et al.*, 1992). Les protéines ABC, quant à elles, font partie d'une famille de protéines transmembranaires ayant deux motifs ABC qui contiennent chacun deux sites de liaisons à adénosine triphosphate (ATP). Elles ont été identifiées chez divers organismes et sont impliquées dans un très large spectre de fonctions, dont la résistance multi drogue (Chen *et al.*, 1986).

La présence au sein de notre librairie de clones n'ayant aucune altération transcriptionnelle a été surprenante. En effet, un des buts de faire une librairie par hybridation suppressive soustractive est d'obtenir des fragments différentiellement exprimés dans deux populations données, soit l'une ayant subi un traitement et l'autre étant la population témoin. Mais quoique cette méthode tende à enrichir une librairie en des fragments rares (Diatchenko *et al.*, 1996), il est bien possible que certains gènes communs aux deux populations puissent être quand même sélectionnés.

### **4.3 Gènes réprimés**

Nous avons observé trois clones présentant une diminution de leurs niveaux de transcriptions lorsque l'insecte était en présence de la toxine Cry1Ab. Le gène présentant la plus forte répression de son niveau de transcription correspond à un clone ayant des homologies de séquences avec une lipase. Les lipases sont impliquées dans divers processus cellulaires, dont la dégradation des lipides lors de réponses apoptotiques (Lu *et al.*, 2005). Il a été également démontré chez *Bombyx mori* que les lipases pouvaient exercer une activité antivirale contre les nucléopolyhedrovirus

(Ponnuvel *et al.*, 2003). Cette étude suggère que les lipases pourraient avoir un rôle comme barrière physiologique contre certains virus. Comme observé avec la SERPIN, il semble y avoir une inhibition de cette activité lors de l'exposition à la toxine étant donné que le taux de transcription des lipases est diminué. Il pourrait donc y avoir une inhibition de l'expression de la lipase par la toxine afin de contourner l'un des mécanismes de défense de l'insecte.

Il semble également qu'un clone, associé aux protéines de choc thermique de *Antheraea yamamai*, soit sous-exprimé après le traitement. Cette protéine est synthétisée par les cellules après une exposition à un stress environnemental (Bendena *et al.*, 1991).

Un clone associé à un précurseur d'une métalloprotéase présente également un niveau de transcription plus faible suite au traitement par la toxine. Il a été montré que les métalloprotéases (hydrolases) étaient associées à l'établissement du pathogène chez la mouche tsétsé, le vecteur du trypanosome africain (Yan *et al.*, 2002). Cette étude a montré que le niveau d'expression de ce gène n'était pas affecté par la présence d'un pathogène chez l'insecte et que cette enzyme était d'abord reliée à des fonctions digestives (Yan *et al.*, 2002).

## Conclusions

Notre étude portant sur l'exposition de larves sensibles de *Choristoneura fumiferana* à la toxine Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* administrée à une dose sub létale nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1. Un total de 1091 clones ont été isolés grâce à la construction d'une librairie d'ADN complémentaire créée par hybridation suppressive soustractive. Plusieurs clones étaient présents en répliquats dans cette banque, ce qui laisse croire que la majorité de la réponse transcriptionnelle a été couverte par cette procédure.
2. Plusieurs gènes semblent être surexprimés ou réprimés suite au traitement par la toxine Cry1Ab. Les gènes différentiellement exprimés se situent en majorité dans le cadre d'une fonction enzymatique catalytique. Plusieurs clones ayant des homologies de séquences avec des gènes impliqués dans la réponse immunitaire des insectes semblent activés suite à l'ingestion de la toxine par l'insecte. En ce qui a trait aux récepteurs spécifiques à la toxine, aucun changement transcriptionnel n'a pu être mis en évidence. Notre étude réalisée sur un échantillon de 17 clones tirés de notre librairie a donc montré que la réponse cellulaire créée par l'administration d'une dose sub létale est d'abord reliée à des modifications transcriptionnelles au niveau des activités métaboliques chez l'insecte.

Dans l'avenir, il serait intéressant de prolonger cette recherche chez des organismes ciblés et non ciblés par cette toxine bactérienne. De ce fait, il pourra être évalué si ces gènes peuvent être utilisés comme marqueurs universels d'une réponse génique de l'insecte lorsque celui-ci est en contact avec la toxine. Un des défis de ce travail sera la recherche de séquences d'ADN spécifique à ces marqueurs chez des insectes possédant un génome qui n'est pas encore séquencé. Bien entendu, plus le temps avancera, plus il y aura des séquences identifiées et associées à des fonctions spécifiques, ce qui rendra cette tâche plus facile.

De plus, l'utilisation des biopuces d'ADN permettrait d'obtenir une vue plus globale de la réponse transcriptionnelle présente chez l'insecte lors d'un tel traitement en permettant l'analyse d'un grand nombre de gènes de façon simultanée.

**SECTION IV – BIBLIOGRAPHIE**

- Akiba, Y.** (1986). Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*. VI. Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in the soil. *Applied Entomology and Zoology*, **21**: 76-80.
- Alford, A. R., and Holmes, J. A.** (1986). Sublethal effects of carbaryl, aminocarb. fenitrothion, and *Bacillus thuringiensis* on the development and fecundity of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, **79**: 31-34.
- Almeida, R. P., and Purcell, A. H.** (2003). Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**(2): 264-71.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**(3): 403-10.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore, N., and Ellar, D. J.** (1991). Cytotoxicity of a cloned *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVB toxin to an *Aedes aegypti* cell line. *FEMS Microbiology Letters*, **67**(3): 273-6.
- Angus, T. A.** (1954). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*, **173**(4403): 545-6.
- Anonyme** (1989). Politique d'utilisation des pesticides en milieu forestier, Gouvernement du Québec (Di15).
- Anonyme** (1991). Aménager pour mieux protéger les forêts: un projet de stratégie. Ministère de l'énergie et des ressources. Gouvernement du Québec.
- Aoki, N., and Chigasaki, Y.** (1915). Ueber das Toxin von sog. Sotto-Bacillen. *Mitteilungen aus der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Universität zu Tokyo*, **14**: 59-80.
- Aronson, A. I., Beckman, W., and Dunn, P.** (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiology Reviews*, **50**: 1-24.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Butler, H., Cherry, J. M., Corradi, J., Dolinski, K., Eppig, J. T., Harris, M., Hill, D. P., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Reiser, L., Rhee, S., Richardson, J. E., Richter, J., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G., and Yoon, J.** (2001). Creating the gene

ontology resource: Design and implementation. *Genome Research*, **11**(8): 1425-33.

- Ashida, M., and Brey, P.T.** (1998). Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In "Molecular mechanisms of immune responses in insects". Eds: Brey, P.T. and Hultmark, D. Chapman and Hall, London.
- Ashida, M., and Dohke, K.** (1980). Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, **10**: 37-47.
- Ashida, M., Ishizaki, Y., and Iwahana, H.** (1983). Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or beta-1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **113**(2): 562-8.
- Aspan, S., and Soderhall, K.** (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochemistry*, **21**: 363-73.
- Barton, K. A., Whiteley, H. R., and Yang, N.-S.** (1987). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, **85**: 1103-09.
- Bauer, L. S.** (1995). Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Florida Entomologist*, **78**(3): 414-42.
- Bendena, W. G., Ayme-Southgate, A., Garbe, J. C., and Pardue, M. L.** (1991). Expression of heat-shock locus hsr-omega in nonstressed cells during development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, **144**(1): 65-77.
- Berenbaum, M. R.** (2002). Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology*, **28**(5): 873-96.
- Berliner, E.** (1915). Über die Schlaffuscht der Mehlmottenraupe. *Z. Ang. Entomology*, **2**: 29-56.
- Blais, J. R.** (1964). History of spruce budworm outbreaks in southeastern Quebec and northern Maine. *Canadian Department of Forestry Forest Entomology and Pathology Branch Bi-monthly Progress Report*, **20**(5): 1-2.
- Blais, J. R.** (1965). Spruce budworm outbreaks in the past three centuries in the Laurentides Park, Quebec. *Forest Science*, **11**: 130-138.

- Blais, J. R.** (1968). Regional variation in susceptibility of eastern North American forests to budworm attack based on history of outbreaks. *The Forestry Chronicle*, **44**: 1-6.
- Blais, J. R.** (1973). Control of spruce budworm, current and future strategies. *Bulletin of the Entomological Society of America*, **19**: 208-13.
- Blais, J. R.** (1974). The policy of keeping trees alive via spray operations may hasten the recurrence of spruce budworm outbreaks. *The Forestry Chronicle*. **50**: 19-21.
- Boisvert, M., and Boisvert, J.** (2000). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology*, **10**: 517-61.
- Breton, G., Danyluk, J., Ouellet, F., and Sarhan, F.** (2000). Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. *Biotechnology Annual Review*, **6**: 59-101.
- Burges, H. D.** (1982). Control of insects by bacteria. *Parasitology*, **84**: 79-117.
- Cerenius, L., and Soderhall, K.** (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**: 116-26.
- Cerezke, H.F.** (1991). Tordeuse des bourgeons de l'épinette. *Ressources Naturelles Canada*.
- Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B.** (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **47**(3): 381-9.
- 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* of delta-endotoxin molecular structure. *Archives of Microbiology*, **132**: 159-62.
- Choma, C. T., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Pozsgay, M., Raynor, T., and Kaplan, H.** (1990). Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *European Journal of Biochemistry*, **189**(3): 523-7.



- Chosa, N., Fukumitsu, T., Kujimoto, K., and Ohnishi, E.** (1997). Activation of prophenoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**: 61-68.
- 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**(3): 807-13.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. and Dean, D.H.** (2005). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Dale, V.H., Joyce, L., McNulty, S., Neilson, R. P., Ayres, M. P., Flannigan, M. D., Hanson, P. J., Irland, L. C., Lugo, A. E., Peterson, C. J., Simberloff, D., Swanson, F. J., Stocks, B. J., and Wotton, B. M.** (2001). Climate change and forest disturbance. *BioScience*, **51**: 723-34.
- Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M. H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J. F., and Pauron, D.** (2002). Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **99**(9): 5830-5.
- de Barjac, H.** (1977). Qu'est-ce que le *Bacillus thuringiensis*. *La défense des végétaux revue des groupements de protection des cultures*, **185**: 124-34.
- de Maagd, R. A., Bosch, D., and Stiekema, W. J.** (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*, **4**: 9-13.
- 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**(4): 193-9.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D.** (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(12): 6025-30.

- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y. F. C., and Siebert, P. D.** (1999). Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. *cDNA Preparation and Characterization*, **303**: 349-380.
- Doucet, D., Tyshenko, M. G., Davies, P. L., and Walker, V. K.** (2002). A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana*. *European Journal of Biochemistry*, **269**: 38-46.
- Du, N., Liu, X. Y., and Hew, C. L.** (2003). Ice nucleation inhibition - Mechanism of antifreeze by antifreeze protein. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(38): 36000-4.
- Dugal, J.** (1986). Évaluation des effets de l'insecticide biologique *Bacillus thuringiensis berliner* sur la faune vertébrée du Québec. In " Service des études écologiques, Ministère du loisir, de la chasse et de la pêche". Gouvernement du Québec.
- Duguin, J. L., and Dinauer, M. C.** (1990). Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Research*, **18**(9): 2789-92.
- Dularay, B., and Lackie, A. M.** (1985). Haemocytic encapsulation and the prophenoloxidase-activation pathway in the locust *Schistocerca gregaria* forsk. *Insect Biochemistry*, **15**: 827-34.
- Dulmage, H. T.** (1970). Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *Alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **15**: 232-39.
- Dulmage, H. T.** (1981). Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In "Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980" (H. D. Burges, Ed.), pp. 949. Academic Press, New York.
- Dulmage, H. T.** (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Nature. In "Microbial and viral pesticides" (E. Kurstak, Ed.), pp. 720. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Estruch, J. J., Carozzi, N. B., Desai, N., Duck, N. B., Warren, G. W., and Koziel, M. G.** (1997). Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*, **15**(2): 137-41.
- Falcon, L. A.** (1971). Use of Bacteria for Microbial Control. In "Microbial control of insects and mites" (H. D. Burges, and N. W. Hussey, Eds.), pp. 67-95. Academic press, London and New York.

- Fast, P. G., and Régnière, J.** (1984). Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: *Tortricidae*). *The Canadian Entomologist*, **116**: 123-30.
- Faust, R. M., and Bulla, L. A.** (1982). Bacteria and their toxins as insecticides. In "Microbial and viral pesticides" (E. Kurstak, Ed.), pp. 720. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Federici, B. A.** (2005). Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, **89**(1): 30-8.
- Feitelson, J. S., Payne, J., and Kim, L.** (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Bio/Technology*, **10**: 271-75.
- Ferré, J., Escriche, 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.
- Ferré, J., Real, M. D., Van Rie, J., 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 of the United States of America*, **88**(12): 5119-23.
- Ferré, J., and Van Rie, J.** (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, **47**: 501-33.
- Feyereisen, R.** (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, **44**: 507-33.
- Fletcher, G. L., Hew, C. L., and Davies, P. L.** (2001). Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annual Review of Physiology*, **63**: 359-90.
- 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**: 541-50.
- Gahan, L. J., Gould, F., and Heckel, D. G.** (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, **293**(5531): 857-60.
- Georghiou, G. P., and Lagunes-Tejeda, A.** (1991). The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. In "Food and Agriculture Organization of the United Nations".

- Goto, S. G., and Kimura, M. T.** (1998). Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *J. Insect Physiology*, **44**: 1233-39.
- Gould, F., Martinez-Ramirez, A., Anderson, A., Ferre, J., Silva, F. J., and Moar, W. J.** (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**(17): 7986-90.
- Griffitts, J. S., and Aroian, R. V.** (2005). Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays*, **27**(6): 614-24.
- Haider, M. Z., and Ellar, D. J.** (1987). Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin. *Biochemical Journal*, **248**(1): 197-201.
- Hara, E., Kato, T., Nakada, S., Sekiya, S., and Oda, K.** (1991). Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Research*, **19**(25): 7097-104.
- Heckel, D. G.** (1994). The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. *Biocontrol Science and Technology*, **4**: 405-17.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**(10): 986-94.
- Heimpel, A. M.** (1967). A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology*, **12**: 287-322.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., and Kolsto.** (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(6): 2627-30.
- Hendrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. L., and Davis, M. M.** (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, **308**: 149-53.

- Hoffmann, J. A., Reichart, J. M., and Hetru, C.** (1996). Innate immunity in higher insects. *Innate immunity*, **8**: 8-13.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S., and Van Mellaert, H.** (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**(21): 7844-8.
- Höfte, H., and Whiteley, H. R.** (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews*, **53**(2): 242-55.
- Hoppingarner, R., and Materu, M. E. A.** (1964). The toxicology and histopathology of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Galleria mellonella* (Linnaeus). *Journal of Insect Pathology*, **6**: 26-30.
- Horner, T. A., Dively, G. P., and Herbert, D. A.** (2003). Development, survival and fitness performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in MON810 Bt field corn. *Journal of Economic Entomology*, **96**(3): 914-24.
- Jackson, A. D., Smith, V. J., and Peddie, C. M.** (1993). In vitro phenoloxidase activity in the blood of *Ciona intestinalis* and other ascidians. *Developmental and Comparative Immunology*, **17**(2): 97-108.
- Kanost, M. R., and Jiang, H.** (1997). Serpins from an insect, *Manduca sexta*. *Advances in experimental medicine and biology*, **425**: 155-61.
- Kempton, R. A., Lowe, H. J. B., and Bintcliffe, E. J. B.** (1980). The relationship between fecundity and adult weight in *Myzus persicae*. *Journal of Animal Ecology*, **49**, 917-26.
- Knight, P. J., Crickmore, N., and Ellar, D. J.** (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, **11**(3): 429-36.
- Knowles, B. H., and Ellar, D. J.** (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **924**: 509-18.

- Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Grenshaw, 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.** (1992). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, **11**: 195-200.
- Kristiansen, B., and Lewis, C.** (1986). Bacterial insecticides: recent developments. *Trends in Biotechnology*, **4**: 56-58.
- Kultz, D.** (1996). Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat-shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cells. *Cell Physiology*, **40C**: 1181-93.
- Lacey, L. A., and Goettel, M. S.** (1995). Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*, **40**(1): 3-27.
- Lacoursière, J.O., and Boisvert, J.** (2004). Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Ministère de l'Environnement, Québec.
- Lambert, B., Höfte, H., Annys, K., Jansens, S., Soetaert, P., and Peferoen, M.** (1992). Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(8): 2536-42.
- Lang, L., Miskovic, D., Lo, M., and Heikkila, J.** (2000). Stress-induced, tissue specific enrichment of *hsp 70* mRNA accumulation in *Xenopus laevis* embryos. *Cell Stress and Chaperones*, **5**: 36-44.
- Lecadet, M. M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., and Thiéry, I.** (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, **86**(4): 660-72.
- Leonard, C., Soderhall, K., and Ratcliffe, N. A.** (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem*, **15**: 803-10.
- Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P., and Duncan, S. A.** (2002). Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and

mammalian cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(47): 45347-55.

- Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billinhurst, Z., and Depledge, M. H.** (1999). Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, **8**: 351-68.
- Liebig, B., Stetson, D. L., and Dean, D. H.** (1995). Quantification of the effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on short-circuit current in the midgut of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, **41**: 17-22.
- Li, W., Zangerl, A. R., Schuler, M. A., and Berenbaum, M. R.** (2004). Characterization and evolution of furanocoumarin-inducible cytochrome P450s in the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *Insect Molecular Biology*, **13**(6): 603-13.
- Liou, Y. C., Thibault, P., Walker, V. K., Davies, P. L., and Graham, L. A.** (1999). A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, **38**(35): 11415-24.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Moar, W. J., and Smith, R. A.** (1998). Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(4): 1385-89.
- Loeb, M. J., Martin, P. A., Hakim, R. S., Goto, S., and Takeda, M.** (2001). Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Physiology*, **47**(6): 599-606.
- Lord, J. C.** (2005). From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, **89**(1): 19-29.
- Losey, J. E., Rayor, L. S., and Carter, M. E.** (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae [letter]. *Nature*, **399**: 214.
- Lu, Z. X., Gaudet, D. A., Frick, M., Puchalski, B., Genswein, B., and Laroche, A.** (2005). Identification and characterization of genes differentially expressed in

- the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**(4): 420-31.
- Luo, K., Lu, Y.-J., and Adang, M. J.** (1996). A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26**: 783-791.
- Lüthy, P., and Ebersold, H. R.** (1981). *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin: histopathology and molecular mode of action. *In* "Pathogenesis of invertebrate microbial diseases", pp. 235-267. Allenheld, Osmun.
- MacIntosh, S. C., Stone, T. B., Jokerst, R. S., and Fuchs, R. L.** (1991). Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**(20): 8930-3.
- Mahroof, R., Zhu, K.Y., D., Neven, L., Subramanyam, B., and Bai, J.** (2005). Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **141**: 247-56.
- Mansuy, D.** (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P-450. *Comparative Biochemistry and Physiology, C*. **121**: 5-14.
- Martineau, R.** (1985). "Insectes nuisibles des forêts de l'est du Canada." Éditions Marcel Bouquet Inc., Ottawa.
- 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**: 239-46.
- Masson, L., Lu, 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**(35): 20309-15.
- 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 Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1594**(2): 266-75.

**Masson, L., Tabashnik, B., Liu, B., Brousseau, R., and Schwartz, J. L.** (1999).

Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 31996-2000.

**McClintock, J. T., Schaffer, C. R., and Sjoblad, R. D.** (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science*, **45**: 95-105.

**McGaughey, W. H., and Whalon, M. E.** (1992). Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, **258**: 1451-55.

**McLintock, T. L.** (1955). "How damage to balsam fir develops after a spruce budworm epidemic." pp 75. United States Department of Agriculture and Forest Services.

**Meadows, M. P.** (1993). *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In "*Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice." (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs, Eds.), pp. 193-220. John Wiley and Sons Ltd.

**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 delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **23**(6): 663-73.

**Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K., and Adang, M. J.** (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental microbiology*, **61**: 2086-92.

**Myrmel, T., McCully, J. D., Malkin, L., Krukenkamp, I. B., and Levitsky, S.** (1994). Heat shock protein 70 mRNA is induced by anaerobic metabolism in rat hearts. *Circulation*, **90**: 299-305.

**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*, **43**(3): 611-19.

- Nakazawa, H., Tsuneishi, E., Ponnuvel, K. M., Furukawa, S., Asaoka, A., Tanaka, H., Ishibashi, J., and Yamakawa, M.** (2004). Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. *Virology*, **321**(1): 154-62.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W.** (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6**(1): 1-42.
- Nepple, B. B., and Bachofen, R.** (1997). Induction of stress proteins in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS Microbiology Letters*, **153**: 173-80.
- Novak, F. J. S., Graf, R., Waring, R. B., Wolfersberger, M. G., Wieczorek, H., and Harvey, W. R.** (1992). Primary structure of V-ATPase subunit B from *Manduca sexta* midgut. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1132**, 67-71.
- Oppert, B.** (1999). Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **42**(1), 1-12.
- Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., and McGaughey, W. H.** (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(38): 23473-6.
- Pery, A. R., Mons, R., and Garric, J.** (2004). Energy-based modeling to study population growth rate and production for the midge *Chironomus riparius* in ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology*, **13**(7): 647-56.
- Peters, W.** (1992). "Peritrophic Membranes." *Zoophysiology* (Springer, Ed.), vol. 30, Berlin, New York.
- Ponnuvel, K. M., Nakazawa, H., Furukawa, S., Asaoka, A., Ishibashi, J., Tanaka, H., and Yamakawa, M.** (2003). A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, **77**(19): 10725-9.
- Prebble, M.L.** (1976). Aerial control of forest insects in Canada. *Information Canada*, Ottawa.

- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., Sarjan, M., Asgari, S., and Schmidt, O.** (2004). Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **101**(9): 2696-99.
- Ranson, H., Claudianos, C., Orтели, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H., and Feyereisen, R.** (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, **298**(5591): 179-81.
- Retnakaran, A., Lauzon, A., H., and Fast, P.** (1983). *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **34**: 233-39.
- Retnakaran, A., Wilson, G., Ennis, T. J., Fast, P. G., Arif, B. M., and Tyrell, D. I.** (1982). "Developpement de methodes environnementalement acceptables pour le controle des ravageurs forestion." Institut pour la repression des ravageurs forestiers, rapport FPM-X-62.
- Roberts, D. W., and St Leger, R. J.** (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, **54**: 1-70.
- Roehrich** (1964). A comparative study of the sensitivity of three Lepidoptera (*Tortricidae*) to commercial preparations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Pathology*, **6**: 186-97.
- Rose, A. H.** (1994). "Insectes des épinettes, du sapin et de la pruche de l'est du Canada." Ed.Rev.1994 ed., Ressources naturelles Canada, service canadien des forets, direction des sciences et du developpement durable.
- Sanders, B. M., Martin, L. S., Nelson, W. G., Phelps, D. K., and Welch, W.** (1991). Relationship between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope for growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Environmental Research*, **31**: 81-97.
- Schlesinger, M. J.** (1990). Heat shock proteins: a mini review. *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 1211-14.

- 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**(3): 775-806.
- Schnepf, H. E., Tomczak, K., Ortega, J. P., and Whiteley, H. R.** (1990). Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**(34): 20923-30.
- Scott, J. G.** (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **29**: 757-77.
- Segura, C., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Orduz, S.** (2000). Activation pattern and toxicity of the Cry11Bb1 toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(1): 56-62.
- Siegfried, B. D., Spencer, T., and Nearman, J.** (2000). Baseline susceptibility of the corn earworm (Lepidoptera: *Noctuidae*) to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, **93**(4): 1265-8.
- Smedley, D. P., Armstrong, G., and Ellar, D. J.** (1997). Channel activity caused by a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin preparation depends on the method of activation. *Molecular and Membrane Biology*, **14**(1): 8-13.
- Smirnoff, W. A.** (1983a). Characteristics of a highly concentrated *Bacillus thuringiensis* formulation against spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* clemens (lepidoptera: *tortricidae*). *The Canadian Entomologist*, **115**: 443-44.
- Smirnoff, W. A.** (1983b). Residual effects of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticide treatments on spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clements). *Crop Protection*, **2**(2): 225-30.
- Smirnoff, W. A., and Valero, J. R.** (1972). Metabolic disturbances in *Choristoneura fumiferana* Clemens infected by *Bacillus thuringiensis* alone or with added chitinase. *Revue canadienne de Biologie*, **31**(3): 163-9.
- Smith, V. J., and Soderhall, K.** (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, **15**(4): 251-61.

- Soderhall, K.** (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods? *Developmental and Comparative Immunology*, **6**(4): 601-11.
- Soderhall, K., Aspan, A., and Duvic, B.** (1990). The proPO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Research in immunology*, **141**(9): 896-907.
- Soderhall, K., and Cerenius, L.** (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Innate immunity* **10**: 23-8.
- Soderhall, K., Cerenius, L., and Johansson, M. W.** (1994). The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **712**: 155-61.
- Spies, A. G., and Spence, K. D.** (1985). Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. *Tissue and Cell*, **17**(3): 379-94.
- Sylvester, E. S.** (1980). Circulative and propagative virus transmission by aphids. *Annual Review of Entomology*, **25**: 257-86.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., and Lobo de Souza, M.** (2005). Baculoviruses - re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K., and Adang, M. J.** (1994). Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **91**(10): 4120-4.
- Tabashnik, B. E., Johnson, K. W., Engleman, J. T., and Baum, J. A.** (2000). Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ja in a strain of diamondback moth adapted to artificial diet. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(1): 81-3.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **94**(24): 12780-5.

- 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**(2): 564-69.
- Terra, W. R., Ferreira, C., Hordao, B. P., and Dillon, R. J.** (1996). Digestive enzymes. In "Biology of the insect midgut." (M. J. Lehane, and P. F. Billingsley, Eds.), pp. 153-194. Chapman and Hall, London, New York.
- Tojo, A., and Aizawa, K.** (1983). Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(2): 576-80.
- Toumanoff, C., and Vago, C.** (1953). Research on the toxic effect of *Bacillus cereus* var. *alesti* for silkworms. *Annales de l'Institut Pasteur*, **84**(3): 623-30.
- Tyshenko, M. G., Doucet, D., Davies, P. L., and Walker, V. K.** (1997). The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nature Biotechnology*, **15**(9): 887-90.
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I. H., Ji, T. H., and Bulla, L. A.** (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(10): 5490-94.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beukeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., and Leemans, J.** (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **328**: 33-7.
- Valadares, G., Whittome, A. B., Shore, B., and Levin, D. B.** (2001). Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1-like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(3), 1035-43.
- Van Frankenhuyzen, K.** (1993). The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In "Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice" (P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. Mailey, and S. Higgs, Eds.), pp. 1-35. John Wiley and Sons, New York.

- 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**(6): 1650-55.
- Van Frankenhuyzen, K., and Nystrom, W.** (1987). Effect of temperature on mortality and recovery of spruce budworm (Lepidoptera: *Tortricidae*) exposed to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *The Canadian Entomologist*, **119**: 941-954.
- van Frankenhuyzen, K., and Nystrom, C.** (2002). The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. <http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., and Van Mellaert, H.** (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *European Journal of Biochemistry*, **186**(1-2): 239-47.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., and Van Mellaert, H.** (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1378-85.
- Wang, P., Li, G., and Granados, R. R.** (2004). Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(3): 215-27.
- West, A. W., Burges, H. D., Dixon, T. J., and Wyborn, C. H.** (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spores inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, **17**: 657-65.
- Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., Giordana, B., and Hanozet, M.** (1987). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **86A**(2): 301-8.

- Wright, D. J., Iqbal, M., Granero, F., and Ferré, 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**(5): 1814-19.
- Yadzani, S. S., Kumar, K., Mahto, D. N., and Singh, R.** (1982). Recent advances in bacterial control of insects. *Pesticides*, **19**(9): 5-6.
- Yan, J., Cheng, Q., Li, C. B., and Aksoy, S.** (2002). Molecular characterization of three gut genes from *Glossina morsitans morsitans*: cathepsin B, zinc-metalloprotease and zinc-carboxypeptidase. *Insect Molecular Biology*, **11**(1): 57-65.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H., and Sato, R.** (1997). Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *European Journal of Biochemistry*, **246**(3): 652-7.
- Yoshida, H., Ochiai, M., and Ashida, M.** (1986). Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **141**(3): 1177-84.
- Zheng, X. Y., Spaeth, D. D., Harvey, W. R., and Wolfersberger, M. G.** (1992). Dicyclohexylcarbodiimide reacts specifically with the 16kDa subunit of larval *Manduca sexta* midgut vacuolar-type ATPase. *Journal of Experimental Biology*, **165**: 273-8.