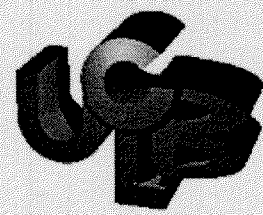


**enssib**  
Ecole Nationale Supérieure  
des Sciences de l'Information  
et des Bibliothèques



Université  
Claude Bernard  
Lyon I

**DESS Informatique Documentaire**  
**Rapport de recherche bibliographique**

**Toxines de *Bacillus thuringiensis* et plantes  
génétiquement modifiées : lutte contre les  
insectes ravageurs**

**Christophe LIENARD**

Sous la direction du  
**Professeur Alain PUGIN**

*Laboratoire de Biochimie des interactions plantes/micro-organismes*  
INRA de Dijon

**Année 1999**





**enssib**  
Ecole Nationale Supérieure  
des Sciences de l'Information  
et des Bibliothèques



Université  
Claude Bernard  
Lyon I

**DESS Informatique Documentaire**  
**Rapport de recherche bibliographique**

**Toxines de *Bacillus thuringiensis* et plantes  
génétiquement modifiées : lutte contre les  
insectes ravageurs**

**Christophe LIENARD**

Sous la direction du  
**Professeur Alain PUGIN**

*Laboratoire de Biochimie des interactions plantes/micro-organismes*  
INRA de Dijon

**Année 1999**

1999  
17  
15

**Toxines de *Bacillus thuringiensis* et plantes génétiquement modifiées : lutte contre les insectes ravageurs**

**RESUME** Parmi les biopesticides, les protéines insecticides de *Bacillus thuringiensis* occupent une place prépondérante. Cependant, leur efficacité à long terme est remise en cause par l'adaptation possible des insectes cibles à ces toxines. La méthodologie et les résultats d'une recherche bibliographique visant à faire le point sur ce biopesticide, sont décrits dans ce rapport.

**DESCRIPTEURS** *Bacillus thuringiensis*, gène cry, toxine, insecte, insecticide microbien

***Bacillus thuringiensis* and genetically altered plants : fight against ravaging insects**

**ABSTRACT** Among biopesticides, insecticidal *Bacillus thuringiensis* proteins occupy a leading place. Nevertheless, their efficiency could deteriorate in the long-term, over the possible adaptation of the target insects. The methodology and results of a bibliographic research dealing with scientific advancements about this biopesticide, are described in this report.

**DESCRIPTORS** *Bacillus thuringiensis*, cry gene, toxin, insect, microbial insecticide

## Abréviations employées

A. aegypti : *Aedes aegypti*  
APN : aminopetidase  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
B. mori : *Bombyx mori*  
Bt : *Bacillus thuringiensis*  
C. fumiferana : *Choristoneura fumiferana*  
C. pipiens : *Culex pipiens*  
C. quinquefasciatus : *Culex quinquefasciatus*  
C. scripta : *Chrysomela scripta*  
E. coli : *Escherichia coli*  
H. armigera : *Heliothis armigera*  
H. virescens : *Heliothis virescens*  
H. zea : *Helicoverpa zea*  
INPI : Institut National de la Propriété industrielle  
M. sexta : *Manduca sexta*  
N. tabacum : *Nicotiana tabacum*  
P. fluorescens : *Pseudomonas fluorescens*  
P. xylostella : *Plutella xylostella*  
S. exigua : *Spodoptera exigua*  
S. littoralis : *Spodoptera littoralis*  
S. litura : *Spodoptera litura*

## Table des matières

### I - Méthodologie

---

A. Définition et analyse du sujet .....	6
B. Recherche manuelle .....	6
C. Recherche automatique	
1. Interrogation des Bases de Données sur CD-Rom .....	8
2. Utilisation d'Internet .....	9
a. Les bases d'articles (accès libre) .....	10
AGRICOLA .....	10
ARTICLE@INIST .....	10
UNCOVER .....	11
b. Les bases de Brevets (accès libre) .....	12
BASE INPI .....	12
IBM PATENTS .....	12
USPTO WEB PATENT DATABASES .....	12
c. Les bases payantes .....	13
INSIDE .....	13
3. Interrogation du serveur de Bases de Données DIALOG .....	14
4. Sources complémentaires .....	17
CD-Rom Doc Thèses .....	17
Usenet .....	17
5. Analyse et conclusion de la recherche .....	17
a. Pertinence de l'interrogation et des résultats obtenus .....	17
b. Coûts financiers et horaires .....	19
c. Conclusion .....	21

### II - Synthèse bibliographique

---

Introduction .....	22
A. Panorama des nouvelles souches bactériennes, toxines, et constructions de plantes résistantes .....	23
B. Production des protéines Cry et Cyt de <i>Bacillus thuringiensis</i> , outils du génie génétique .....	23

1. Transcription et traduction .....	23
2. Expression des toxines Bt dans différents systèmes bactériens .....	24
3. Outils du génie génétique .....	24
C. Mécanismes de formation et d'action des toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	25
1. Formation des toxines .....	25
2. Structure des toxines et spécificité des différents domaines .....	26
3. Activité des toxines .....	27
4. Mécanismes d'action .....	27
5. Potentialisation de la toxicité .....	29
D. Résistance des insectes aux toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	30
1. Développement de la résistance .....	30
2. Restauration partielle de la sensibilité aux toxines Bt .....	31
3. Stratégies de lutte .....	32
Conclusion .....	33

### **III - Bibliographie**

---

Partie 1 : Références utilisées dans la synthèse .....	34
Partie 2 : Références non utilisées dans la synthèse, et classées par thèmes .....	40
Ingénierie .....	40
Action des toxines .....	41
Récentes découvertes de toxines et souches de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	42
Nouvelles plantes résistantes .....	45
Résistance des insectes vis-à-vis des toxines .....	46
Autres .....	46
<b>Annexes</b> .....	<b>48</b>

## **I - Méthodologie**

Cette recherche bibliographique a été menée pour le professeur Alain PUGIN, qui est responsable de l'unité associée INRA / Université de Bourgogne, et travaille au Laboratoire de Biochimie des interactions plantes/micro-organismes à l'INRA de Dijon. Ses travaux concernent l'étude au niveau moléculaire des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis des pathogènes. En outre, son enseignement à l'Université (module de Génie Biomoléculaire) et ses conférences grand public de diffusion de l'information scientifique nécessitent de faire régulièrement le point sur l'avancée des connaissances. J'ai donc proposé mes services au professeur PUGIN afin de lui procurer une source d'informations complémentaire.

### **A. Définition et analyse du sujet**

Il n'était pas possible d'aborder l'ensemble des domaines traités dans son enseignement ; aussi, nous avons convenu de circonscrire le champ des recherches à un thème précis. Mon vif intérêt pour son module (en maîtrise), et tout particulièrement pour la partie traitant des plantes transgéniques, a orienté dans un premier temps le sujet. Il s'agissait de la transgénèse utilisée dans le cadre de la protection des récoltes. Le thème, jusque là assez ouvert, a été ciblé après quelques recherches préliminaires, sur une arme majeure pour la lutte biologique contre les insectes ravageurs : la famille de bactéries *Bacillus thuringiensis* (Bt) et les multiples protéines à activités insecticides (delta-endotoxines) qu'elles synthétisent. La transgénèse de ces toxines dans divers hôtes à fort potentiel économique (maïs, coton, tabac, riz etc.) constitue un aspect essentiel du sujet ; cependant, il a été jugé important de traiter également les toxines Bt dans leur ensemble, en sortant du contexte des plantes transgéniques.

Plusieurs grands axes de recherche ont ainsi été dégagés :

- un récapitulatif des plus récentes découvertes et travaux sur Bt, en matière de souches, toxines, et plantes transgéniques exprimant ses protéines insecticides.
- le mode de formation et d'action de ces toxines.
- l'étude du développement de résistances chez les insectes suite à l'emploi des toxines Bt, ainsi que les mécanismes de cette résistance et les stratégies mises en œuvre pour préserver l'efficacité des biopesticides reposant sur Bt.

Cette recherche bibliographique étant un travail de mise à jour des connaissances actuelles, seules les publications les plus récentes (datant de l'année 1998 ou 1999) seront retenues.

## B. Recherche manuelle

Un cours de recherche documentaire spécialisée, effectué sur les exemplaires papier des *Chemical Abstracts* a permis de réaliser une bonne approche du sujet. Par des critères de recherche simples et très généraux, plusieurs références ont été retenues, le critère de date de publication n'étant pas dans un premier temps essentiel. Le principal objectif de cette recherche manuelle était en effet de me familiariser avec mon thème de recherche; aussi, le choix s'est tout d'abord porté sur des publications datant parfois de plusieurs années, mais abordant des aspects différents et complémentaires (mécanismes de toxicité des protéines Bt, développement de résistances vis-à-vis de ces molécules, stratégies envisagées et/ou adoptées pour les combattre, etc.). Dans un second temps, la consultation des *Chemical Abstracts* s'est restreinte à l'année en cours, pour ne plus retenir que des publications incorporables au rapport de recherche bibliographique.

*Chemical Abstracts* indexe 14 000 revues, et les brevets d'une trentaine de pays, dans plus de 50 langues. Différents index sont disponibles. Le General Subject Index est un recueil semestriel qui autorise une recherche sur les noms communs, le dernier en date couvrant le premier semestre 1998 (il existe aussi des index guides cumulés quinquennaux). Cet index fournit un numéro de notice, qui permet de retrouver la publication (références bibliographiques et résumés) dans les fascicules hebdomadaires. Pour le deuxième semestre 1998, l'absence de General Subject Index a nécessité une recherche fastidieuse sur les seuls volumes hebdomadaires, mais a fourni quelques autres références plus récentes. Les mots clés utilisés ont été « *Bacillus thuringiensis* » et « toxines ».

11 articles et 6 brevets ont été jugés intéressants pour ce début de recherche.

L'analyse des résumés a permis de dégager certains termes qui revenaient presque systématiquement dans les publications : « *Bacillus thuringiensis* », « cry proteins », « crystal proteins », « toxins », « endotoxins ». Par ailleurs, les différents travaux se référaient à de multiples toxines de Bt. Tous les aspects du sujet reposant sur ces molécules (synthèse, effets, mode d'utilisation...), il a paru indispensable d'en avoir une bonne vue d'ensemble (différencier les diverses familles de protéines insecticides chez Bt, connaître leurs activités respectives etc.) pour démarrer cette recherche de façon structurée. Une classification des toxines de Bt, de préférence la plus récente possible, a été recherchée sur Internet, grâce au moteur de recherche Alta Vista.

### *Equation de recherche*

**(toxin\* OR (crystal OR cry\*) NEAR protein\*) AND thuringiensis AND nomenclature AND 1998**

Avec comme critère de tri :  
**nomenclature AND 1998**

Dix pages Web ont été sélectionnées par Alta Vista, sur lesquelles une s'est avérée particulièrement intéressante puisqu'il s'agissait de la publication en ligne de l'article de Crickmore et al. sur la révision de la nomenclature des toxines de Bt.

Ces toxines ont été intensivement étudiées pour leurs propriétés insecticides et leur niveau naturellement élevé de production. Une première nomenclature de ces protéines a été élaborée sur la base de leurs activités insecticides et distinguent 4 classes :



- les gènes CryI, codant des protéines toxiques aux lépidoptères ;
- les gènes CryII, codant des protéines toxiques aux lépidoptères et aux diptères ;
- les gènes CryIII, codant des protéines toxiques aux coléoptères ;
- les gènes CryIV, codant des protéines toxiques aux diptères seuls.

Une révision de cette nomenclature a été proposée (10). Les auteurs décrivent en outre les protéines Cyt, qui tout comme les protéines Cry, sont des inclusions parasporales de Bt, mais possèdent une activité hémolytique. Sur la base de ces deux nomenclatures, une équation de recherche couvrant l'ensemble des toxines Bt a pu être établie, en vue d'une interrogation du serveur de bases de données DIALOG et des différentes sources d'information sur Internet.

Une deuxième approche est apparue nécessaire, visant d'une part à ne pas omettre des éléments importants du sujet, et d'autre part à restituer le contexte de chaque publication utilisée dans la synthèse (ce qui n'était pas forcément possible avec la publication elle-même). J'ai donc cherché parmi les premières références obtenues celles traitant les toxines de Bt dans leur ensemble, et correspondant au type « Review ». Dans cette catégorie d'articles, le ou les auteurs retracent l'évolution d'un domaine scientifique précis, en récapitulant les découvertes majeures réalisées sur le sujet. Deux publications très récentes correspondaient à ces critères : « *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins : Molecular mode of action. », de Rajamohan et al. (obtenue par le biais des *Chemical abstracts*), et « *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins », de Schnepf et al.

## C. Recherche automatique

### 1. Interrogation des Bases de Données sur CD-Rom

Plusieurs bases de données sont disponibles en réseaux sur CD-Rom à la bibliothèque de l'Université Claude Bernard Lyon1, section Sciences. Les bases *PASCAL* (multidisciplinaire) et *BIOLOGICAL ABSTRACTS* (version CD-Rom de *Biosis*, décrite plus loin) ont été interrogées, grâce au logiciel Winspirs et à son moteur de recherche Spirs. Elles présentent l'avantage de ne pas être payantes, contrairement au serveur DIALOG, et disposent de différents index et thésaurus. L'utilisation du Master Index en ligne de *Biosis* ou du thésaurus papier de Pascal ont permis d'employer des mots clés spécifiques de la base. Cependant, le Master Index n'est pas exhaustif, la troncature a donc été nécessaire pour englober tous les termes désirés.

La gratuité de consultation a autorisé divers tests quant à la pertinence des interrogations (se reporter à la partie 5. *Analyse et conclusion de la recherche*).

#### □ PASCAL

*Equation de recherche*

thuringiensis & (toxin\* | insect\*) & DA=1998

25 références pertinentes ont été obtenues sur les 55 sélectionnées (soit un taux de pertinence de 45.45 %).

## ❑ BIOLOGICAL ABSTRACTS

*Equation de recherche*

**thuringiensis and (cry\* or cyt\*) and PY=1998**

58 publications ont été retenues par cette interrogation, sur un total de 88 références (taux de pertinence de 62.5 %).

### 2. Utilisation d'Internet

Au même titre que la recherche manuelle sur *Chemical Abstracts*, Internet s'est révélé être un outil de choix pour « débroussailler » le sujet. Plusieurs moteurs de recherche par mots clés ont été utilisés :

**Alta Vista** <URL : <http://www.altvista.digital.com>>

**HotBot** <URL : <http://www.hotbot.com>>

ainsi que le métamoteur Metacrawler (qui expédie les requêtes à AltaVista, WebCrawler, Excite, Yahoo, Infoseek et Lycos).

**Metacrawler** <URL : <http://www.metacrawler.com>>

Les informations les plus nombreuses et les plus intéressantes ont été la plupart du temps fournies par Alta Vista. Hormis celles trouvées sur les bases de données, peu de références de 1998 ou 1999 ont été directement signalées par l'intermédiaire d'Internet. En revanche, une masse conséquente d'informations (moins récentes) a pu être rassemblée par ce biais sur mon sujet. Le niveau et la nature des documents électroniques obtenus ont varié considérablement (des exposés de vulgarisation à la mise en ligne des travaux de tel ou tel chercheur), ce qui a permis d'avoir une vision assez étendue du sujet.

Le système d'interrogation des bases de données sur CD-Rom a été appliqué au moteurs de recherche. Plusieurs références ont été trouvées sur des sites créés par les laboratoires ou les chercheurs eux-mêmes, comme par exemple deux publications de Andow et al. (4,5) (<URL : [http://www.entsoc.org/reprints/jee\\_tocs/all\\_jeetocs.html](http://www.entsoc.org/reprints/jee_tocs/all_jeetocs.html)>), une publication de Sachs et al (142) (URL : <http://agfacts.tamu.edu/~jbenedic/CS382.htm>>) ou une publication de Crickmore et al. (<URL : [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/rev.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/rev.html)>).

Cependant, toutes ces références ont également été trouvées par les bases de données en ligne.

Internet a également apporté une aide précieuse de part les contacts qu'il est possible d'établir grâce aux listes de diffusion, aux forums, et les nombreuses bases de données en lignes accessibles gratuitement.

Le site de M. Jean-Pierre LARDY (<URL : <http://urfist.univ-lyon1.fr/gratuits.html>>) présente une liste importante de ces bases.

## ❑ AGRICOLA

<URL : <http://www.nal.usda.gov/ag98/index/agricola-e.html>>

➤ *AGRICOLA* (AGRICultural OnLine Access) est une base de données bibliographiques dont l'un des principaux fondateurs est la *National Agricultural Library*. Les enregistrements décrivent les publications et ressources englobant tous les aspects de l'agriculture et des disciplines associées : ingénierie agricole, économie, alimentation et nutrition, entomologie, biologie végétale et animale etc.

➤ La base de données d' *AGRICOLA* est organisée en deux jeux de données bibliographiques regroupant 3,5 millions d'enregistrements : le « *Online Public Access Catalog* » qui contient entre autres les citations pour les livres, le matériel audiovisuel et les publications en série, et le « *Journal Article Citation Index* » qui contient les citations pour les articles de journaux, les chapitres de livres, les rapports etc. Les deux jeux de données sont mis à jour quotidiennement.

*Equation de recherche*

**thuringiensis & (1998 + 1999)& (toxin + toxins + insecticidal)**

L'équation ne peut contenir pour l'instant que six termes (cet inconvénient doit être supprimé prochainement). De plus, la troncature n'est pas disponible, ce qui handicape de façon importante les recherches.

Pour 49 références sélectionnées, 26 ont été retenues, soit un taux de pertinence : 53.06%.

## ❑ ARTICLE@INIST

<URL : <http://form.inist.fr/public/fre/conslt.htm>>

➤ *Article@INIST* donne accès aux catalogues (articles et monographies) de l'*Institut de l'Information Scientifique et Technique* pour retrouver la référence d'un article, d'une revue, d'un ouvrage, d'un rapport ou d'un congrès. Cinq millions de notices bibliographiques sont référencées, et la mise à jour est quotidienne.

➤ Le moteur de recherche utilisé par *Article@INIST* est Search 97® de Verity.

Les opérateurs booléens et la troncature illimitée ont été utilisés, mais l'espace réservé à l'équation de recherche est réservé à un nombre donné de caractères. Les mots clés de l'équation rencontrés le moins souvent dans les articles déjà étudiés (comme certaines toxines) ont du être retirés de l'équation.

*Equation de recherche*

**thuringiensis and (toxin\* or (cristal near protein\*) or cry1\* or cry2\* or cry3\* or cry9\*)**

La recherche a été effectuée sur les années 1998 et 1999, 76 références ont été sélectionnées

en réponse à l'interrogation, sur lesquelles 45 se sont avérées pertinentes. Le taux de pertinence est de 59,21%

## ❑ UNCOVER

<URL : <http://uncweb.carl.org:80/>>

➤ *UnCover* (Denver, Colorado) est un service de livraison en ligne d'articles de périodiques. Cette base de données indexe 18 000 périodiques en langue anglaise et de disciplines variées, ce qui représente une information descriptive de 8 800 000 articles parus depuis 1988. 5 000 citations sont ajoutées quotidiennement. Les articles apparaissent dans *UnCover* en même temps que la parution dans le périodique. Leur livraison est assurée en 24 ou 48h maximum par fax, souvent en moins d'une heure.

➤ Plusieurs services sont proposés, dont *UnCover Reveal* (service d'alerte automatique qui délivre dans la boîte e-mail de l'utilisateur le sommaire des périodiques spécifiés), *Reveal* (permet à l'utilisateur de créer une stratégie de recherche), *UnCover S.O.S.* (possibilité d'envoyer sa requête par fax, téléphone ou e-mail).

➤ La recherche sur *UnCover* est gratuite, chaque article commandé coûte 10\$ US, plus les royalties, plus un supplément pour le fax si la commande ne provient pas des Etats-Unis ou du Canada. Un droit à l'année de 900\$ fait bénéficier le souscripteur d'une réduction de 2\$ par article. Le service *UnCover Reveal* coûte 25\$ à l'année.

Une recherche booléenne et par troncature illimitée pour les années 1998-1999 a été effectuée, sur l'ensemble des champs.

*Equation de recherche*

**thuringiensis and (toxin\* or (crystal near protein\*)) or cry1\* or ery1\* or cry2\* or cry3\* or cry4\* or cry5\* or cry6\* or cry7\* or cry8\* or cry9\* or cyta\* or cytb\* or cytm\* or cyt1\* or cyt2\*)**

Cette équation a sélectionné 42 références dont 32 ont semblé pertinentes de prime abord. Cependant, cette évaluation s'est exclusivement reposée sur le titre, le résumé n'étant pas fourni. Un recoupement avec d'autres sources a éliminé 7 références sur les 32, aboutissant à un taux de pertinence de 59,52 %.

### *b/ Les bases de Brevets (accès libre)*

Avec un rythme moyen de 300 dépôts par an, les brevets jouent un rôle central dans le développement des biotechnologies végétales. De nombreuses bases de brevets sont mises en lignes gratuitement sur Internet ; les Etats-Unis étant la principale source des brevets concernant mon sujet de recherche bibliographique, un accent sera mis sur les bases de leurs brevets.

## ❑ BASE INPI

<URL : <http://www.inpi.fr/inpi/html/inbrevet.htm>>

- Cette base autorise l'accès aux brevets français des deux dernières années.

L'emploi des opérateurs booléens et de la troncature n'a pas été possible, d'où une équation très large ; cependant, le nombre de brevets français délivrés n'ayant pas de commune mesure avec les Etats-Unis, seuls 9 documents ont été sélectionnés, sur lesquels 4 ont été gardés (taux de pertinence : 44.44 %).

## ❑ IBM PATENTS

<URL : <http://www.inpi.fr/inpi/html/inbrevet.htm>>

- L' *IBM Intellectual Property Network* donne accès à plus de 2 millions de brevets américains délivrés depuis 1971, et à plus de 1,4 millions de documents du *World Intellectual Property Office* (WIPO) et du *European Patent Office* (EPO). La mise à jour est hebdomadaire. La consultation de la base est gratuite, seule la commande de brevets est facturée ; en outre la base autorise la visualisation de certaines pages (plus de 40 millions de pages sont scannées).

*Equation de recherche*

**thuringiensis and (toxin\* or insect\*) and (1998 or 1999)**

29 références ont été retenues sur les 87 sélectionnées (taux de pertinence : 33.33 %).

## ❑ USPTO WEB PATENT DATABASES

<URL : <http://www.uspto.gov/patft/index.html>>

- L'*USPTO* (US Patent and Trademark Office) est une entité fédérale à but non lucratif, et constitue l'un des 14 bureaux du Département du Commerce Américain (DOC). Le PTO a évolué en une agence gouvernementale unique.

- L'*USPTO Web Patent Databases* autorise la consultation de trois bases de brevets en accès libre : la *US Patent Full Text Database* (qui contient les brevets américains enregistrés depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1976), la *US Patent Bibliographic Database* (concernant les premières pages des brevets enregistrés depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1976) et la *AIDS Patent Database* (une base de données en texte intégral et images des brevets relatifs au SIDA, enregistrés par les organismes du Japon, de l'Europe, et des Etats-Unis).

*Equation de recherche*

**thuringiensis and (cryi\$ or cry1\$ or cry2\$ or cry3\$ or cry4\$ or cry5\$ or cry6\$ or cry7\$ or cry8\$ or cry9\$ or cyta\$ or cytb\$ or cytm\$ or cyt1\$ or cyt2\$)**

Sur 48 références sorties, 19 ont été retenues.

c/ Les bases payantes

J'ai profité d'une période d'essai dont bénéficiait l'ENSSIB pour tester l'intérêt de la base de données INSIDE, que j'ai pu, dans ces conditions, consulter gratuitement.

❑ **INSIDE**

<URL : <http://inside.bl.uk:443/>>

➤ Cette base de données repose sur le fonds détenu par la *British Library*, et donne accès à plus de 250 000 journaux. Sa croissance annuelle est supérieure à 2 millions d'articles, et sa mise à jour est journalière. Les articles y sont catalogués dans les 72 heures qui suivent leur réception à partir d'un journal ou d'une conférence.

➤ Le service Inside Web, qui donne accès à la base, requière un abonnement annuel (5 050,00 FHT pour un mot de passe); 87,30 FHT en plus des droits de copie sont demandés pour la livraison d'un document en 2 heures par fax..

*Equation de recherche*

**thuringiensis and (cryi\$ or cry1\$ or cry2\$ or cry3\$ or cry4\$ or cry5\$ or cry6\$ or cry7\$ or cry8\$ or cry9\$ or cyta\$ or cytb\$ or cytm\$ or cyt1\$ or cyt2\$)**

Cette première interrogation a fourni 54 documents correspondant au sujet de recherche, sur 62 sélectionnés; il est donc apparu nécessaire de l'élargir en ajoutant aux différentes toxines un « or toxin\$ », puis un « or insect\$ ». 62 publications ont été gardées sur les 113 références retenues par l'équation. Le taux de pertinence passe de 87,10% à 54,87%. Seules 8 références ont été rajoutées par cet élargissement, qui ne se justifiait peut-être pas, si l'on considère le faible silence mis en évidence.

### 3. Interrogation du serveur de Bases de Données DIALOG

Le serveur DIALOG comporte plusieurs centaines de bases parmi lesquelles son guide *DataBases* permet de faire un choix. Cependant, l'aspect multidisciplinaire du sujet (biologie végétale, biologie moléculaire, microbiologie, agriculture, agronomie, ...) rendrait la recherche manuelle très lourde. L'emploi de *DialIndex* (base 411) a permis dans un premier temps de sélectionner la supercatégorie (ensemble de bases se rapportant à un domaine) AllScience. Une interrogation unique (de préférence assez large) sur l'ensemble des bases de cette supercatégorie permet ensuite d'extraire les sources de données les plus intéressantes pour le sujet.

Un index recensant cet ensemble est disponible à l'adresse :

<URL : <http://library.DIALOG.com/bluesheets/html/blo.html>>.

Equation de recherche

S THURINGIENSIS AND INSECT? AND PY=1998 AND (CORN OR MAIZE OR COTTON OR TOBACCO OR RICE OR POTATO?)

Résultats de l'interrogation

Ref	Items	File
N1	169	654: US Pat.Full._1990-1998/Dec 15
N2	86	440: Current Contents Search(R)_1990-1998/Dec W2
N3	63	20: World Reporter_1997-1998/Dec 21
N4	62	16: IAC PROMT(R)_1972-1998/Dec 21
N5	57	50: CAB Abstracts_1972-1998/Nov
N6	56	34: SciSearch(R) Cited Ref Sci_1990-1998/Dec W2
N7	55	636: IAC Newsletter DB(TM)_1987-1998/Dec 21
N8	53	5: BIOSIS PREVIEWS(R)_1969-1998/Dec W1
N9	29	156: Toxline(R)_1965-1998/Nov
N10	29	319: Chem Bus NewsBase_1984-1998/Dec 21

La prise en compte de ces résultats a fait porter l'interrogation sur les bases 654, 440, 20, 16, 50, 34, 636, 5 auxquelles ont été rajoutées les bases 357 (*Derwent Biotechnology Abstracts*) et 348 (*European Patents Fulltext*).

La base 357 avait fourni certains résultats intéressants lors d'essais sur DIALOG, dans le cadre des TD de M. Lardy ; le choix de la base 348 est motivé par le manque de souplesse dans les possibilités d'interrogations de la base de brevets européens accessible par l'INPI.

DIALOG propose un guide pour chacune de ses bases sur Internet : ce sont les « Bluesheets », qui contiennent une description détaillée des techniques de recherche propres à chaque base, ainsi que les sujets couverts, les fréquences de mise à jour, un échantillon d'enregistrement, les coûts d'interrogation etc. Les « Bluesheets » sont disponibles à l'adresse :

<URL : <http://www.DIALOG.com>>

No.	Nom de la base	Description / domaine
654	<i>U.S. Patents Fulltext</i>	Brevets enregistrés par l'USPTO depuis 1974
440	<i>Current Contents Search®</i>	Version en ligne d' <i>ISI®'s popular Current Contents®</i> , qui couvre environ 6 500 journaux en sciences, sciences humaines, sciences sociales, et arts.
20	<i>World Reporter</i>	Base multidisciplinaire (dont l'agriculture et les biotechnologies) développée par trois compagnies leader dans le domaine de l'information : <i>DIALOG Corporation</i> , <i>Financial Times Information</i> et <i>Dow Jones&amp;Company</i> .
16	<i>IACSM PROMT®</i>	Couvre les événements internationaux et les activités des

compagnies publiques et privées dans plus de 60 domaines, dont l'agriculture et les biotechnologies.

- 50 *CAB Abstracts* Base de données sur l'agriculture se reposant sur plus de 14 000 périodiques dans les domaines relatifs à l'agriculture tels que les biotechnologies, les ressources génétiques, la production agricole, la nutrition humaine ou les sciences vétérinaires.
- 34 *SciSearch®* Contient les enregistrements publiés dans *Science Citation Index®* plus certains enregistrements de *Current Contents®*, dans de multiples disciplines dont l'agriculture, l'agro-alimentaire, la biochimie, la biologie, la génétique ou la microbiologie.
- 636 *IACSM Newsletter Database* Informations sur les compagnies, produits, marchés et technologies, le commerce et les différentes régions géopolitiques du monde. Cette base couvre entre autres les biotechnologies.
- 5 *BIOSIS Previews®* Contient les citations de *Biological Abstracts®*, et *Biological Abstracts/Reports, Reviews, and Meetings®*, les publications majeures de *BIOSIS®*. Parmi les domaines couverts se trouvent l'agriculture, la microbiologie, les biotechnologies, la biologie cellulaire, la botanique, la biochimie et la génétique.
- 357 *Derwent Biotechnology Abstracts* Couvre tous les aspects de la biotechnologie dont l'ingénierie génétique, biochimique, la fermentation et la culture cellulaire. Le quart des enregistrements est formé par les brevets.
- 348 *European Patents Fulltext* Brevets européens publiés depuis l'ouverture du *European Patent Office (EPO)* en 1978.

*Equations de recherche*

**S1 1112 THURINGIENSIS AND INSECT? AND PY=1998**

24635 THURINGIENSIS

983179 INSECT?

4855054 PY=1998

**S3 / 756 CRY1 ? CRY1? OR CRY2? OR CRY3? OR CRY4? OR CRY5? OR CRY6? OR CRY7? OR CRY8? OR CRY9?**

657 CRY1?

104 CRY2?

63 CRY3?

54 CRY4?



5 CRY5?  
6 CRY6?  
12 CRY7?  
8 CRY8?  
38 CRY9?

**S4 / 5479 CYT OR CYTA OR CYTB OR CYTM**

5035 CYT  
285 CYTA  
187 CYTB  
6 CYTM

**S5 / 107 CYT1? OR CYT2?**

91 CYT1?  
47 CYT2?

**S7 / 312 S1 AND (S2 OR S3 OR S4 OR S5)**

*rd (suppression des doublons)*

**S8 / 159 RD**

*t s8/6/1-159 (format 6 : références bibliographiques sans les résumés)*

Les références obtenues concernaient bien le sujet puisque 92 références se sont avérées pertinentes. Le taux de pertinence sur l'ensemble des bases est de 57.86% ; il n'a pas été calculé séparément pour chaque base du fait de la commande « rd » qui faussait les estimations. En effet, cette commande supprime les doublons : parmi toutes les références retenues, certaines provenaient de plusieurs bases mais n'ont été comptabilisées qu'une fois.

Le format 5 contrairement au format 6, est payant ; l'interrogation a restreint volontairement les réponses aux principales plantes concernées par les toxines Bt. Les informations relatives aux autres aspects du sujet ont été obtenues grâce aux bases de données en ligne sur Internet.

**S9 / 75 S8 AND (CORN OR MAIZE OR COTTON OR TOBACCO OR RICE OR POTATO?)**

*t s9/6/1-75*

*t s9/5/1-75 (format 5 : références bibliographiques complètes)*

47 références ont été retenues, soit un taux de pertinence global de 62.66%

#### **4. Sources complémentaires**

➤ *CD-Rom Doc Thèses* (base multidisciplinaire des thèses soutenues dans les universités françaises)

Sa consultation n'a pas fourni de résultat, aucun travail ne portant sur Bt depuis 1996.

➤ *Usenet*

Différents forums de discussions ont été consultés et interrogés.

Le site de référence sur le Web pour la recherche d'information sur les forums s'appelle DejaNews (<URL : [www.dejanews.com](http://www.dejanews.com)>). Ce moteur de recherche permet la recherche sur les forums eux-mêmes et sur les messages contenus dans ces forums. Un croisement des deux modes de recherche a permis de localiser plusieurs adresses intéressantes :

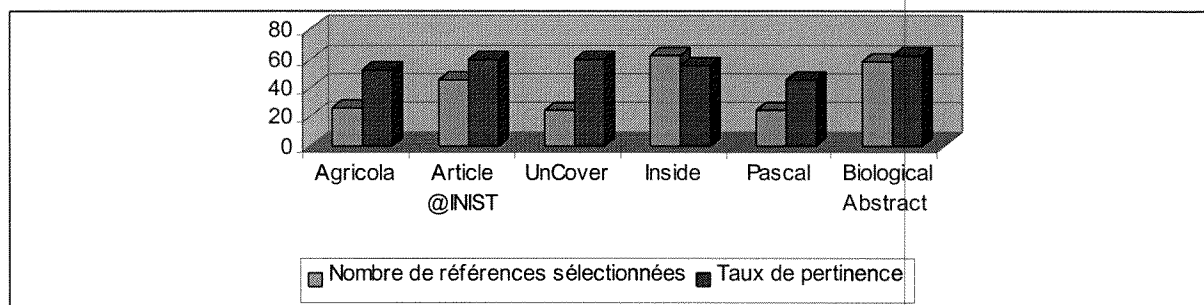
bionet.microbiology  
 misc.activism.progressive  
 sci.agriculture  
 sci.agriculture.beekeeping  
 sci.bio.microbiology

La consultation des messages existants n'a pas apporté de résultat ; cependant, les forums se sont avérés utiles pour éclaircir certaines questions, en particulier lors du démarrage des recherches. Le nombre de références directement obtenues par le biais des forums s'est limité à trois, dont une seule, d'un intérêt moyen, n'avait pas été trouvée par d'autres sources d'information. En revanche, plusieurs questions envoyées aux adresses ci-dessus ont permis de localiser trois bases de données en accès libre sur Internet : *Uncover*, *IBM Patents* et *USPTO Web Patent Databases*.

## 5. Analyse et conclusion de la recherche

### a/ Pertinence de l'interrogation et des résultats obtenus

#### ➤ Bases d'articles sur CD-Rom et sur Internet



Le taux de pertinence obtenu pour la plupart des sources s'est révélé assez élevé. Une explication réside dans la nature du sujet : s'agissant d'une mise à jour, le critère de l'année de publication restreint considérablement le bruit ; en outre, l'étendue du sujet a motivé une sélection relativement large.

Il est aussi possible de remettre en cause la sélectivité de l'équation de recherche, et de se demander si celle-ci n'était pas trop restrictive.

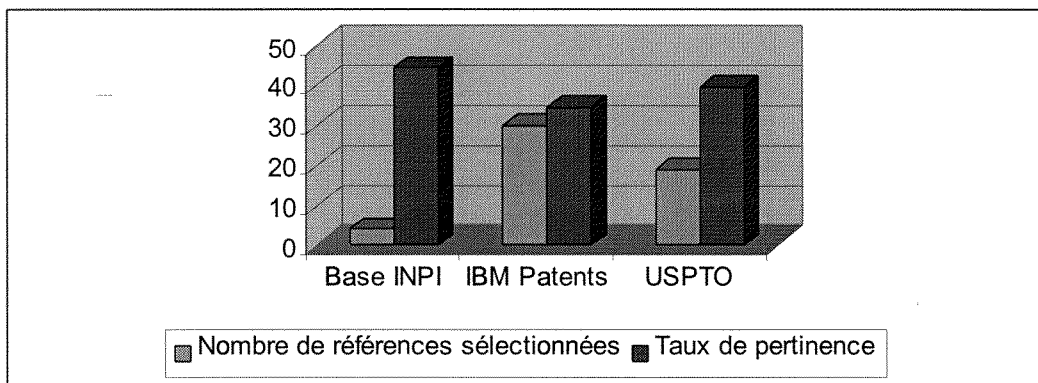
Plusieurs essais ont été réalisés via les bases de données sur CD-Rom. Ainsi, *Biological Abstracts* donne un taux de pertinence de 42.77 % avec 68 références conservées sur 159 sélectionnées par l'équation « **thuringiensis and toxin\* or insect\*) and (PY=1998-1999)** ». En interrogeant la base de façon plus précise par « **thuringiensis and (cry\* or cyt\*) and (PY=1998-1999)** », ce taux passe à 67.04 % (59 publications gardées sur 88). On constate que la réduction très marquée du bruit dans le deuxième cas n'est accompagnée que d'une perte

minime d'information (9 publications ont été « omises »).

De la même façon, des équations très larges ou plus fermées appliquées aux bases *UnCover* ou *Article@Inist* ont fourni un nombre de références pertinentes sensiblement voisin, mais avec un bruit nettement supérieur dans le premier cas. Ces observations; décrites plus haut, sont également confirmées dans le cas de la base *Inside*.

En ce qui concerne les bases de données du serveur *DIALOG*, la commande « rd » permet de gagner du temps, mais rend difficile les calculs de pertinence ; il ne sera mentionné dans ce rapport que le nombre de références sélectionnées pour chaque base suite à l'interrogation (voir le paragraphe des coûts). Cependant, il sera possible de dégager globalement les sources d'informations jugées les plus riches et les plus intéressantes pour la présente recherche.

➤ Bases de brevets sur Internet



Avec la base *IBM PATENTS*, l'équation « **thuringiensis and (1998 or 1999) and (cry1\* or cry2\* or cry3\* or cry4\* or cry5\* or cry6\* or cry7\* or cry8\* or cry9\* or cyta\* or cytb\* or cytm\* or cyt1\* or cyt2\*)** » fournit 19 références dont 12 retenues (soit une pertinence de 63,16%) ; avec l'équation plus généraliste « **thuringiensis and (toxin\* or insect\*) and (1998 or 1999)** » 33 références sont retenues sur 87 (pertinence de 37,93 %). Le bruit résultant de la première interrogation est faible ; cependant, la seconde interrogation montre qu'un nombre important de publications intéressantes sont passées à côté des critères de sélection.

Avec la base *USPTO WEB PATENT DATABASES* interrogée sur les années 1998-1999, l'équation « **thuringiensis and (cry1\$ or cry2\$ or cry3\$ or cry4\$ or cry5\$ or cry6\$ or cry7\$ or cry8\$ or cry9\$ or cyta\$ or cytb\$ or cytm\$ or cyt1\$ or cyt2\$)** » procure 48 références, dont 19 pertinentes. « **thuringiensis and (toxin\$ or insect\$)** » sélectionne 275 références. L'étude des 80 premiers brevets montre une pertinence de l'ordre de celle observée pour la même équation, avec la base *IBM PATENTS*. Là aussi, nombre de références intéressantes sont « oubliées » avec la première équation.

Une démarche se voulant exhaustive en ce qui concerne la recherche de brevets nécessite donc d'employer des critères de sélection relativement larges. En revanche, l'utilisation, lorsque cela est possible, de l'équation complète prenant en compte les différentes toxines de Bt, semble plus appropriée pour la recherche d'articles. En effet, les titres et résumés (sur lesquels ont été effectués la recherche par mots clés) sont en général beaucoup moins explicites et détaillés pour les brevets que pour les articles.

Remarquons que le choix s'avère plus délicat pour la sélection des brevets ; leur profusion sur mon sujet m'a empêché d'en faire une liste complète, aussi un choix, peut-être parfois arbitraire a été fait en ce qui concerne les brevets ayant trait aux nouvelles souches et toxines de Bt. Une deuxième difficulté réside dans les multiples facettes que recèle un brevet. Celui-ci décrit dans la plupart des cas un principe général adaptable à de nombreuses applications ; aussi, déterminer le niveau d'intérêt de ce type de publication ne peut se réduire à l'étude du résumé. Extraire l'information utile à travers plusieurs dizaines (voire centaines !) de pages n'est pas toujours aisé.

*b/ Coûts financiers et horaires*

Internet a occasionné un gain certain en matière de temps et d'argent grâce à la base *USPTO WEB PATENT DATABASES*, qui met en ligne la version intégrale de ses brevets. Ce qui peut éviter de se rendre à l'INPI et payer 30 francs par publication. En ce qui concerne les autres bases de données à accès libre sur Internet, un inconvénient majeur réside dans l'absence presque systématique de résumés, le choix de l'article et sa commande devant alors s'effectuer sur le titre.

Le calcul des coûts d'interrogation prend en compte deux paramètres : le temps de connexion au serveur DIALOG, et le nombre de références demandées suite à l'interrogation (le prix par référence est fonction de son format de sortie et de la base interrogée).

➤ Coûts de l'interrogation de *DIALINDEX*

N° base	Temps de connexion (DialUnit)	Coût par DialUnit (\$)	Coûts Internet (\$)	Coût total (\$)
<b>411</b>	2.815	1.25	0.35	<b>3.87</b>

➤ Coûts de l'interrogation des Bases sélectionnées par *DIALINDEX*

N° base	Nombre de références	Coût par référence (\$)	Coûts de connexion (\$)	Coût total (\$)
<b>654</b>	27	2.50	1.45	68.95
<b>440</b>	20	2.80	1.76	57.76
<b>20</b>	4	1.75	0.07	7.07
<b>16</b>	7	3.15	0.33	22.38
<b>50</b>	4	1.50	9.11	15.11

<b>34</b>	1	3.00	13.40	16.40
<b>636</b>	0	3.15	0.00	0.00
<b>5</b>	7	1.55	1.24	12.09
<b>357</b>	3	2.08	0.61	6.85
<b>348</b>	2	5.00	0.25	10.25
				<b>216.86</b>

Soit un coût global de **220,73 \$ US**.

➤ Temps consacré à la recherche

Estimer avec justesse ce paramètre s'avère difficile. Cerner précisément le sujet a occasionné plusieurs bifurcations, et le démarrage des recherches s'est mêlé avec l'apprentissage des différents outils de recherche documentaire (bases de données, CD-Rom, Internet ...).

Approximativement, les interrogations du serveur DIALOG, mais surtout des différentes bases de données sur Internet, ont nécessité une trentaine d'heures. Quant au temps consacré aux recherches de forums et à leur interrogation, on peut l'estimer à environ 10 heures.

Le dépouillement des articles et le mode de rédaction choisi pour la synthèse (une revue générale sur les différents points du sujet) a occupé un temps important de part le nombre de références à étudier. Une approximation de ce temps pourrait être de 80 à 90 heures, au sein desquelles l'analyse des brevets jugés les plus intéressants a occupé une place non négligeable.

Enfin, se procurer les documents primaires dans les différentes bibliothèques de Lyon, et à l'INPI pour certains brevets a encore nécessité quelques après-midi.

c/ Conclusion

Parmi les 10 premières bases de données sélectionnées à l'aide de DialIndex, *World Reporter*, *IACMS PROMPT®* et *IACSM Newsletter Database* occupaient respectivement les 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> place. Cependant, il s'est avéré que l'information contenue dans ces bases ne correspondaient pas avec mon sujet de recherche. *World Reporter*, par exemple, n'a fournit que des articles relatifs à l'Agence de Protection de l'Environnement américaine (Environmental Protection Agency) et son agrément pour de nouvelles plantes transgéniques (telles que le maïs StarLink d'AgrEvo). On entrevoit ici une limite de l'interrogation par mots clé, et du système de consultation multibases en mode OneSearch. La manière la plus efficace de minimiser le bruit passe donc par la consultation base par base, et en tenant compte de la description de chacune. Ce mode d'interrogation sera bien entendu beaucoup plus exigeant en temps (interrogation, dépouillement, élimination des doublons, ...), aussi une stratégie du juste milieu doit être envisagée.

Sur l'ensemble des sources d'articles consultées (payantes ou non), quatre se détachent par la quantité de références retenues pour le rapport : *Article@INIST*, *Inside*, *Current Contents Search*® et *BIOSIS Previews*®. Une attention particulière sera portée sur *Inside*, qui d'une part a été pour cette recherche la base la plus riche en informations, et d'autre part a constitué une source unique pour certains documents d'un grand intérêt (en particulier sur les mécanismes d'action des toxines et les résistances développées contre elles). L'on peut néanmoins regretter la rareté des résumés, qui oblige souvent de commander l'article sur le titre seul.

De nombreuses références ont été obtenues dans plusieurs bases à la fois : la presque totalité des publications retenues via DIALOG a pu être retrouvée dans d'autres bases de données accessibles gratuitement, en réseau sur CD-Rom ou sur Internet. Cependant une interrogation payante sur DIALOG trouve sa justification dans la présence des résumés, ce qui, dans le cas des services non payants, n'a été observé que pour les CD-Rom.

Enfin, en ce qui concerne les bases de brevets, l'interrogation de la base *U.S. Patents Fulltext* de DIALOG n'était pas nécessaire ; la consultation (gratuite) de la base USPTO Web Patent Databases a fournit à peu de choses près les mêmes références, et en texte intégral. La base IBM Patents s'est aussi révélée être très riche en information, mais ne dispense pas les brevets dans leur intégralité.

D'un point de vue général, il ressort de cette recherche bibliographique que les voies menant à l'information sont souvent multiples et différentes. Certaines erreurs commises lors de ce travail documentaire pourront être évitées à l'avenir, particulièrement en ce qui concerne les stratégies à adopter. Elaborer des équations de recherche qui tendent vers des taux de bruit et de pertinence les plus avantageux possibles n'est pas une fin en soi. Encore faut-il savoir jongler entre les nombreux outils qui s'« offrent » à nous, pour d'une part sélectionner des sources d'informations complémentaires et non redondantes, et d'autre part déterminer le juste compromis entre coûts (en temps, en argent) et efficacité.

## II - Synthèse bibliographique

L'objectif de ce travail de recherche bibliographique était de dresser un inventaire des découvertes récentes concernant la lutte contre les insectes ravageurs de récoltes, grâce aux protéines insecticides de Bt. Considérant le nombre de domaines abordés (microbiologie, physiologie végétale et animale, biologie moléculaire et cellulaire, génétique...) et le caractère relativement vaste du sujet, il a été jugé plus profitable pour le bénéficiaire de cette recherche de traiter la synthèse bibliographique comme un article de type « review ». La démarche adoptée sera donc de développer de façon plus ou moins approfondie chaque point, plutôt que de fournir une information dense mais très ponctuelle sur tel ou tel aspect de la question.

Remarque : Les références aux publications sont constituées soit par un numéro renvoyant à la bibliographie, soit par le nom du premier auteur ; dans ce cas, l'année est mentionnée pour les seules publications datant de 1999 (les autres datant de 1998). Pour les brevets, le nom du premier auteur est suivi du numéro de référence (les brevets sont classés par nom de laboratoire).

### Introduction

Contrôler les insectes qui ravagent les cultures économiquement importantes est un souci considérable dans le domaine de la production alimentaire. Il a été estimé que 28 % de la production mondiale est détruite par les insectes ravageurs, que cela soit dans les champs ou au niveau du stockage. Les stratégies de lutte actuelles reposent beaucoup sur les insecticides chimiques, qui peuvent provoquer de nombreux effets secondaires néfastes comme l'accumulation dans l'écosystème de produits chimiques potentiellement carcinogènes, la contamination des nappes phréatiques, le développement de populations résistantes d'insectes, et la destruction d'insectes bénéfiques. Ces aspects ont motivé la recherche d'une alternative. Les méthodes biologiques de contrôle, connues depuis plusieurs décennies, connaissent un regain d'intérêt depuis la reconnaissance du phénomène de résistance des insectes vis-à-vis des pesticides chimiques (53).

Parmi les différents agents pathogènes des insectes, les bactéries ont été intensivement étudiées. En particulier, Bt présente des avantages variés, en terme de spécificité, d'écologie, de développement de la résistance chez les insectes, ou des coûts de production. Si de nombreux composés extracellulaires contribuent à la virulence vis-à-vis des insectes, tels que des phospholipases, des  $\beta$ -exotoxines, des protéases, des chitinases et des VIPs (Vegetative Insecticidal Proteins), les toxines Cry sont prédominantes (56).

Il est actuellement nécessaire de compléter la compréhension des mécanismes d'action des endotoxines de Bt, afin de permettre la construction d'une seconde génération de toxines plus efficaces, et maîtriser le processus de résistance chez les insectes ravageurs.

## **A. Panorama des nouvelles souches bactériennes, toxines, et constructions de plantes résistantes**

Se reporter à la bibliographie thématique.

## **B. Production des protéines Cry et Cyt de *Bacillus thuringiensis*, outils du génie génétique**

### **1. Transcription et traduction**

Les gènes Cry présentent la caractéristique commune d'être exprimés durant la phase stationnaire, et ont été longtemps considérés comme un exemple typique de gènes spécifiques de la sporulation. Cependant, des études récentes sur l'expression de Cry3Aa ont montré que des exceptions pouvaient exister (56).

Au niveau transcriptionnel, le processus de la sporulation est contrôlé par l'activation successive de facteurs sigma ( $\sigma^A$ ,  $\sigma^H$ ,  $\sigma^F$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^G$  et  $\sigma^K$ ) qui se lie à l'ARN polymérase pour diriger les promoteurs spécifiques de la sporulation. Cry1Aa est un exemple type de gène sporulation-dépendant exprimé seulement dans le compartiment cellulaire mère de Bt (56). La synthèse de la toxine Cry3 dépend en premier lieu d'un promoteur actif dans la phase stationnaire, et d'une séquence STAB-SD qui stabilise le complexe transcript-ribosome. Le rendement en Cry3 peut être accru par l'utilisation complémentaire d'un promoteur cyt1Aa sporulation-dépendant pour mener l'expression de Cry3Aa quand la séquence STAB-SD est incluse dans la construction (50). L'expression de gènes Cry sporulation-indépendant existe également. Le gène Cry3Aa, isolé de Bt ssp. *tenebrionis*, est aussi exprimé durant la croissance végétative, bien qu'en quantité moindre par rapport à la phase stationnaire (56).

Cependant, la majorité des protéines cristal n'est exprimée que pendant la sporulation. L'identification et la caractérisation des gènes impliqués dans le processus de sporulation pourraient conduire à améliorer les systèmes de production des toxines Bt et accroître l'efficacité de ces toxines. Reynoso et al. (55) présentent la première isolation connue chez Bt d'un gène de sporulation de phase V, spoVBt1, et son utilisation comme locus d'intégration chromosomique d'un gène codant pour une toxine Bt. Cette technique permet d'obtenir des souches Bt asporo- ou oligosporogéniques (spores ne synthétisant pas de spores, ou en quantité très limitée); en effet, si les spores peuvent apporter certains avantages (voir paragraphe 5. *Potentialisation de la toxicité*), elles présentent en revanche l'inconvénient d'être susceptibles de survivre dans le sol de façon très durable, même sous des conditions extrêmes.

La stabilité des ARNm contribue largement à l'importante production de toxines chez Bt. Par exemple, le terminateur transcriptionnel de Cry1Aa accroît la stabilité de l'ARNm du gène Cry en protégeant l'extrémité 3' d'une activité exonucléasique (56). Cependant, les gènes Cry de Bt introduits dans les plantes sont peu exprimés, même lorsque la transcription est contrôlée par un promoteur fort. (13). S'il est établi que l'expression des gènes de toxines Bt chez les plantes supérieures est sévèrement limitée par l'étape de transcription ou de traduction des ARNm, les causes en demeurent incertaines. L'expression d'un gène CryIAC de type sauvage et celle d'un gène CryIAC synthétique (moins riche en A-U) ne mettent pas en



évidence de différences quant à l'activité transcriptionnelle. En revanche, les transcrits de type sauvage se révèlent beaucoup moins stables que ceux synthétiques. Les séquences riches en A-U contribuent donc à l'instabilité des ARNm chez les plantes (12). Les cellules du tabac (*N. tabacum*) transformées par le gène CryI<sub>Ac</sub> de Bt, accumulent très peu d'ARNm, courts et polyadénylés. Des sites d'addition poly(A<sup>+</sup>) ont été identifiés dans la région codante de la toxine correspondant aux courts transcrits. Les résultats montrent qu'une polyadénylation prématurée peut limiter l'expression d'un gène étranger chez une plante (13).

En plus des sites de polyadénylation, les sites d'épissage d'introns, de signaux transcriptionnels de terminaison et de signaux de transport peuvent contribuer à la formation de transcrits aberrants. Une technique pour optimiser des séquences d'ADN en vue de leur expression dans un système végétal a été mise au point, afin d'augmenter l'homologie entre le gène introduit et ceux de la plante transfectée (48). L'invention concerne en particulier l'expression du gène CryI<sub>Ab</sub> de Bt ssp. *kurstaki* HD-1 chez le maïs. L'emploi d'un promoteur spécifique d'un tissu limite l'expression du gène d'intérêt à ce tissu. De même, Gleave et al. (20) ont réussi à accroître l'expression du gène Cry9<sub>Aa2</sub> de Bt chez *N. tabacum*, lui conférant ainsi une résistance au papillon du tubercule de pomme de terre. Une technique utilisant les éléments Ocs a également été mise au point pour accroître l'activité transcriptionnelle chez les plantes (1). L'invention évoque entre autre l'emploi de certaines toxines Bt.

## **2. Expression des toxines Bt dans différents systèmes bactériens**

Les gènes des toxines Bt ont été introduits chez *E. coli*, *B. subtilis* ou *Bacillus megaterium* bien avant qu'il n'existe un système de transformation efficace pour Bt (56). Différents systèmes d'expression ont été récemment employés : *P. fluorescens* (80), *Bacillus pumilus* (57), *Pseudomonas putida* (30). Chez *E. coli*, l'expression de toxines activées de Bt conduit à des précipités inactifs. Il est utile d'y remédier, les outils de biologie moléculaire étant limités pour *Bacillus*. Une étude montre que la toxine CryI<sub>Ac</sub> peut être exprimée en l'état actif chez *E. coli*, grâce à une fusion traductionnelle avec une protéine manteau mineure d'un phage filamenteux (26).

## **3. Outils du génie génétique**

De récents travaux décrivent de nouvelles techniques de détection par PCR des gènes Cry de Bt (61,39,23). Dans le même ordre d'idées, un anticorps spécifique des récepteurs aux endotoxines de Bt (et dérivés) a été mis au point (65). Plusieurs applications de cet anticorps sont développées, dont une méthode pour isoler de nouvelles protéines insecticides de Bt.

Une technique est également proposée pour estimer la fréquence des allèles de résistance rares chez les populations d'insectes naturelles, et pour recueillir ces allèles (4,5).

Enfin, parmi les outils de recombinaison génétique, un nouveau transposon, Tn5401, et son emploi pour la construction de souches recombinantes contenant des toxines Bt est décrit (15). Ce transposon n'est que le deuxième à être isolé depuis la découverte de Tn4430. Contrairement à Tn4430, largement distribué parmi les souches Bt, le transposon Tn5401 n'a été détecté que dans un nombre relativement rare d'espèces de Bt.

## C. Mécanismes de formation et d'action des toxines de *Bacillus thuringiensis*

Les protéines Cry forment généralement des inclusions cristallines dans le compartiment mère de la bactérie. Les cristaux sont d'abord solubilisés dans l'intestin de l'insecte suite à leur ingestion. Les protéases intestinales (essentiellement trypsine-like ou chymotrypsine-like pour les lépidoptères) convertissent les futures protéines insecticides (protoxines) en toxines de 60-65 kDa, dérivées de la région N-terminale des protéines. Selon leur composition en protoxine, les cristaux ont une forme bipyramidale (Cry1), cubique ou rectangulaire (Cry2, Cry3A), irrégulière (Cry3B), sphérique (Cry4A, Cry4B) ou rhomboédrique (Cry11A) (35). Les molécules de Cry2A sont stabilisées au sein des inclusions rectangulaires grâce aux protéines codées par les gènes orf2 (opéron Cry2A) et orf3 (opéron Cry11A), qui potentialisent la synthèse de Cry2A en agissant respectivement en tant qu'armatures pour stabiliser les molécules de Cry2A au sein des inclusions rectangulaires, et en tant que molécules chaperonnes (19).

Dans le processus conduisant à la mort de l'insecte, l'étape de la protéolyse est suivie par la liaison des toxines Cry nouvellement formées aux récepteurs de la paroi intestinale, et par leur insertion dans la membrane apicale des cellules. Des canaux ioniques ou des pores y sont ainsi créés (56).

### 1. Formation des toxines

Le type majeur de cristal toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères est une protéine de 130 kDa (protoxine). Les protoxines Cry1A sont digérées en toxines de 65 kDa (53,56). La découverte inattendue d'un fragment d'ADN de 20 kbp (kilo paires de bases) intimement associé aux cristaux de *Bt* ssp. *kurstaki* HD73 a permis de souligner un trait inhabituel : l'activation de la protoxine intervient par une série séquentielle de clivages protéolytiques, commençant de l'extrémité C-terminale vers celle N-terminale jusqu'à ce que la toxine stable soit générée (8). Les auteurs proposent un modèle où les molécules ellipsoïdes de protoxines recouvrent une chaîne d'ADN double brin centrale. Leur région toxique N-terminale interagit avec 3 à 6 paires de bases nucléotidiques, laissant leur région C-terminale s'étendre hors du noyau central. Les molécules forment ainsi une couche de protéines qui recouvre l'ADN, et seule la région C-terminale de la protoxine est accessible par les enzymes protéolytiques. La protoxine protège donc l'ADN des attaques des nucléases, tant que sa région C-terminale n'est pas supprimée. Ce complexe protéine-acide nucléique proposé est un modèle virus-like qui s'appuie entre autre sur l'exemple du virus de la mosaïque du tabac, où une molécule (protéine) interagit avec 3 bases nucléotidiques (8).

Dans l'environnement hautement alcalin de l'intestin de la larve de *C. fumiferana*, le cristal est solubilisé par clivage des ponts disulfures. La trypsine convertit alors rapidement le complexe protoxine-ADN 20 kbp en complexe toxine-ADN 20 kbp, puis en complexe toxine-ADN 100 pb par une nucléase intestinale. Finalement, l'action relativement lente de la DNase intestinale de la larve (association forte de l'ADN avec la protéine) sur le complexe libère la toxine de l'ADN (8). La protéolyse limitée des endotoxines de *Bt* concerne les boucles au sein des 3 domaines (voir paragraphe 2. *Structure des toxines*). Un premier motif a été observé pour CryIA et CryIVD, et résulte de la protéolyse des boucles qui connectent les chaînes bêta du second domaine. Le deuxième motif, détecté pour CryIG et CryIVB, résulte du clivage des

boucles connectant les 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> hélices alpha du premier domaine (voir le paragraphe 3 pour l'activité) (77).

Une toxine active a été obtenue de cultures de Bt kurstaki sporulées sans utiliser les protéases exogènes ou les enzymes intestinales des larves. L'hypothèse était que cette toxine active résultait de l'action de protéases endogènes synthétisées durant la sporulation. Les auteurs montrent qu'une toxine active contre le lépidoptère *S. littoralis* a pu être obtenue par l'action d'une ou plusieurs métallo-protéases endogènes, et soulignent le rôle clé de ces protéases dans l'activation et la spécificité de la toxine vis-à-vis de sa cible (32,33).

## 2. Structure des toxines et spécificité des différents domaines

Jusqu'en septembre 1998 seules 3 protéines cristal ont été analysées structurellement par cristallographie aux rayons-X : Cry1Aa, Cry3A et Cyt2A. Les deux premières possèdent 3 domaines : le domaine I (portion N-terminale de la molécule) est constitué d'un paquet de 7 hélices  $\alpha$  anti-parallèles dans lequel l'hélice 5 est entourée par les autres ; le domaine II est formé de 3 feuillets  $\beta$  anti-parallèles joints en clé grecque ; enfin, le domaine III est formé de 2 feuillets  $\beta$  anti-parallèles torsadés. Cyt2A (et certainement Cyt1A) ne possède en revanche qu'un domaine, formé de deux couches d'hélices  $\alpha$  arrangées autour d'un feuillet  $\beta$  (« sandwich  $\beta$  ») (53,56).

Cinq blocs d'acides aminés sont conservés au sein de la plupart des toxines Cry connues jusqu'à présent. Une analyse phylogénétique de la structure primaire des protéines Cry suggère que les domaines I de ces toxines ont évolué à partir d'une origine commune (63). L'arbre phylogénétique comporte trois branches. La première inclut le domaine I de Cry1 (toxine spécifique des lépidoptères), la seconde inclut ceux de Cry3, Cry7, Cry8 (toxines spécifiques des coléoptères) et de Cry1B, Cry1I (spécifiques des lépidoptères et des coléoptères). Enfin, la troisième branche est constituée du domaine I des toxines spécifiques des diptères, des nématodes et des sarcomastigophores.

Les longues hélices du domaine I, hydrophobes et amphipathiques sont certainement responsables de la formation des pores dans l'épithélium intestinal de l'hôte. On note d'ailleurs un remarquable degré de conservation de la structure des toxines en ce qui concerne ce domaine. Plusieurs modèles ont été proposés pour le mécanisme de formation de ces pores (modèle en « ombrelle » et modèle en « canif », déjà suggérés pour les pores formés par la colicine) (53,56). L'agencement en ombrelle des hélices formant les pores est proposé dans de récents travaux (18). Cet aspect sera développé dans le paragraphe 4. *Mécanismes d'action*.

Le sommet des boucles des 3 feuillets  $\beta$  formant le domaine II doit être impliqué dans la liaison avec le récepteur.

Enfin, la structure en feuillets  $\beta$  du domaine III pourrait maintenir l'intégrité moléculaire de la toxine (56). Cependant, les fonctions de ce domaine demeurent très largement moins comprises que celles des deux premiers. Une caractérisation biochimique du domaine III de CryIA a révélé que les fragments correspondant au domaine III de CryIAb et CryIAc pouvaient adopter différentes configurations spatiales pour chaque toxine (68). De Maagd et al. (1999) ont montré que la présence du domaine III de Cry1Ac était suffisante pour la liaison de la molécule à l'un des deux sites identifiés comme des récepteurs de Cry1Ac, dans un modèle constitué de vésicules membranaires à bordure en brosse et d'un récepteur putatif purifié de l'insecte cible *M. sexta*. Le deuxième site, en revanche, requiert la toxine dans son intégralité pour rendre une liaison possible. En outre, la présence du domaine

III suffit à l'inhibition spécifique par GalNAc (N-acétylgalactosamine) de la liaison de Cry1Ac. Les auteurs suggèrent que le domaine III de la toxine Cry1Ac interagit spécifiquement avec ce sucre (ou des sucres similaires) sur le complexe récepteur, et que cette liaison contribue à la toxicité. Les auteurs évoquent aussi l'existence (récemment démontrée) de deux mécanismes de formation des pores, l'un dépendant de GalNAc et l'autre non, et concluent que le domaine III de Cry1Ac est impliqué au moins dans le premier de ces deux mécanismes.

### 3. Activité des toxines

Des bioessais réalisés avec des fragments de CryIG et CryIVB indiquent que deux hélices alpha (6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup>) du premier domaine, suivies des deux domaines en feuillets bêta, sont suffisants à l'activité insecticide (77).

La substitution de la glutamine 149 par une proline au centre de l'hélice  $\alpha$ 4 de Cry4B aboutit à une perte presque totale de toxicité envers la larve de moustique de *A. aegypti*. Ce qui n'est pas observé dans le cas d'une substitution d'une proline dans le centre de l'hélice  $\alpha$ 3 et à la partie N-terminale de l'hélice  $\alpha$ 4. La toxicité de la protéine de type sauvage a été réduite de façon significative par une pré-incubation avec la protéine mutante non toxique, indiquant que l'étape initiale de la liaison au récepteur n'est pas affectée par la substitution N-terminale de la proline dans l'hélice 4. Les résultats indiquent un rôle crucial de l'hélice  $\alpha$ 4 dans la toxicité de Cry4B, plutôt au niveau de l'insertion membranaire et la formation de pores, que dans la reconnaissance par le récepteur (67).

La portion C-terminale de la toxine, connue en tant que région non toxique, joue aussi un rôle dans la toxicité de Bt contre les insectes, du moins en ce qui concerne la souche AF101 (qui produit la protéine insecticide Cr1Ab) et *B. mori* (28,29).

### 4. Mécanismes d'action

Les toxines activées se lient à des récepteurs spécifiques de la paroi en bordure en brosse des microvillosités intestinales de l'insecte sensible. La liaison s'effectue en deux étapes, incluant une liaison réversible, et une liaison irréversible qui résulterait d'une tight-junction et de l'insertion membranaire du domaine I. En effet, des expériences réalisées avec des molécules Cry1Ab tronquées (contenant les domaines II et III) n'ont donné lieu qu'à des liaisons réversibles (53,56). La jonction tight entre les molécules Cry1Aa et Cry1Ab et l'APN de *M. sexta* ont déjà été observés (56) ; en outre, l'APN a été insérée dans un nouveau modèle membranaire pour étudier les effets de sa liaison avec Cry1Ac (9). Une étude récente décrit chez *B. mori* une APN de 110 kDa, et suggère que cette molécule est une protéine GPI ancrée constituant un récepteur spécifique de la famille d'endotoxines Cry1A (22). Yaoi et al. (1999) ont aussi cloné et exprimé une APN de *B. mori* de 120 kDa se liant à Cry1Aa. La protéine liant la toxine Cry1Aa chez *B. mori* présente des similarités de séquence avec celle liant Cry1Ab chez *M. sexta*, mais pas avec celle liant Cry1Ac chez *M. sexta* et *H. virescens* (24).

Chez *M. sexta*, le récepteur de Cry1Ab est supposé être une protéine membranaire cadherine-like de 210 kDa, et ceux de Cry1Ac et Cry1C, respectivement des APN de 120 et 106 kDa (56). Cependant la caractérisation du récepteur à la famille de toxines Cry1A chez *M. sexta* est très controversée, de part les nombreuses protéines qui lient la toxine Cry1Ac.

Cry1Aa, cry1Ab et cry1Ac présentent une toxicité équivalente envers *M. sexta*, ainsi qu'une grande similitude structurale, laissant penser à un mécanisme commun, tant dans le mode d'action de chaque toxine, que dans le récepteur auquel elle se lie. Des travaux récents montrent que la protéine cadherine-like BT-R1 est un récepteur de haute affinité pour la famille de toxines Cry1A (27). Une glycoprotéine de 175 Kda, BtR175 a été identifiée comme étant chez *B. mori* le récepteur intestinal de la toxine Cry1Aa (46). Son clonage et son expression ont été réalisés (45).

Il est supposé que lorsque la toxine lie son récepteur par un domaine spécifique, il se produit un changement conformationnel d'un autre domaine de la toxine. Ce domaine forme alors un pore en s'insérant dans la membrane de la cellule épithéliale (18). Une analyse structurale de la conformation de la toxine Cry1Ab suite à son insertion dans la membrane a été réalisée (42). Par ailleurs, Gazit et al. montrent que les hélices constituant le pore ( $\alpha 2$  à  $\alpha 7$ ) ont une haute affinité envers la membrane, et proposent un rôle structural de  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  pour la paroi du pore, dans un modèle en « ombrelle ». Leurs résultats indiquent que  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  s'insèrent dans la membrane de façon antiparallèle et en épingle à cheveux hélicoïdale. Après la liaison au récepteur, le réseau de contacts entre  $\alpha 7$  (hélice à l'interface entre le domaine formant les pores et celui se liant au récepteur) et  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ , probablement  $\alpha 4$ , pourrait assister l'insertion de l'épingle à cheveux dans la membrane, en déroulant le paquet hélicoïdal qui existe dans la forme de la toxine non liée à la membrane. Les auteurs remarquent que la stabilisation de la structure en épingle à cheveux par un lien croisé entre les hélices  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  pourrait accroître le potentiel de perméabilisation des membranes par les toxines. Une mutation dans l'hélice  $\alpha 4$ , qui est supposée être responsable du pont salin entre  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$ , permettrait donc d'améliorer l'activité insecticide des endotoxines de Bt.

L'insertion de la toxine dans la membrane apicale des cellules épithéliales la rend insensible aux protéases et aux anticorps monoclonaux, et induit la formation de canaux ioniques ou de pores dans la membrane cible. Ces pores ou canaux sont sujets à controverse, et sont décrit soit comme de grands ports lytiques non spécifiques, soit comme des canaux ioniques spécifiques qui désorganisent le potentiel membranaire sans nécessairement lyser l'épithélium intestinal de l'insecte (58). En ce qui concerne les insectes, les lignées cellulaires sensibles aux toxines Bt et disponibles pour des études physiologiques sont rares (cellules Cfl pour le lépidoptère *C. fumiferana*, Sf9 pour le lépidoptère Noctuidae, UCRE-SE-la pour le lépidoptère *S. exigua* (52). Une récente étude expose les effets de Cry1C sur différentes lignées de cellules d'insectes : Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), SeUCR et SelZD2109 (*Spodoptera exigua*), Mb0503 (*Mamestra brassicae*), Dm1 (*Drosophila melanogaster*) (34).

Des données antérieures suggèrent que les changements de concentration du  $Ca^{2+}$  cellulaire suite à une exposition à une toxine Bt représentent une étape précoce dans l'activité de la toxine, et pourraient être une réponse générale des cellules sensibles suite à sa détection. De plus, elles supportent le concept d'une interaction synergique entre  $Ca^{2+}$  et les toxines Bt, l'augmentation de toxicité pouvant être issue de la dérégulation des processus de transport du  $Ca^{2+}$  cellulaire (52). Potvin et al. montrent que les protéines Bt cytotoxiques (Cry1Ab, Cry1Ac et Cry1C) déclenchent des poussées de  $Ca^{2+}$  dans les cellules Cfl (de façon analogue aux cellules Sf9 et UCRE-SE-la), contrairement aux protéines non cytotoxiques (Cry1Aa et Cry3A). Cry1Ac, la plus toxique pour les cellules Cfl, déclenche la plus large réponse, suggérant que l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  participe au mode d'action de la toxine. Ces afflux sont dus d'une part et principalement à un influx de  $Ca^{2+}$

extracellulaire, sûrement par les pores formés suite à l'insertion des toxines dans la membrane cellulaire (l'étude démontre que les canaux Cry1Ac sont perméables aux  $\text{Ca}^{2+}$ ), mais aussi pour une petite proportion à partir de réserves intracellulaires. Dans les cellules Cfl, on peut spéculer que les toxines de Bt se lient à des récepteurs membranaires spécifiques couplés à l'adénylate cyclase et à la phospholipase C, induisant un signal ( $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire) et la production de protéine kinase C. Celle-ci, à son tour, module les niveaux d'AMPc. Des études ultérieures devront examiner le rôle qu'un tel signal peut jouer dans le mode d'action des protéines insecticides de Bt (52).

L'effet des toxines Bt sur des lignées cellulaires de lépidoptères a été évalué en mesurant le gonflement cellulaire dans une solution isotonique ne contenant qu'un cation (58). Il est proposé que ce gonflement cellulaire est lié à un canal  $\text{K}^+$ -dépendant et résulte d'un influx de  $\text{K}^+$  et de  $\text{H}_2\text{O}$ . Un inhibiteur de ce type de canal tel que la 4-AP (4-aminopyrimidine) stimule le gonflement cellulaire, alors que l'ouabaïne, un inhibiteur de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase produit un effet inverse. Les auteurs suggèrent que la 4-AP bloque l'efflux de  $\text{K}^+$  à travers les canaux  $\text{K}^+$ -dépendants, alors que l'ouabaïne diminue l'activité des pompes ATPasiques et par conséquent l'influx de  $\text{K}^+$ .

Dans les cellules Sf9, les pores formés par la toxine Cry1C (toxique vis-à-vis de cette lignée cellulaire) ont un diamètre estimé entre 1.0 et 1.2 nm. La sélectivité ionique des ports est faible, la taille étant un facteur beaucoup plus décisif que la nature de la charge ionique (71).

Chez *S. littoralis*, Cry1Ca, qui est significativement active, perméabilise les vésicules membranaires à bordure en brosse, contrairement aux toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, nettement moins actives (16). L'emploi des vésicules membranaires à bordure en brosse (isolées des larves de *P. xylostella* et d'autres petits insectes) a été validé pour l'étude des processus de liaisons des toxines Bt (35). Les auteurs proposent en outre une technique de marquage non radioactif des toxines, où  $^{125}\text{I}$  est remplacé par NIP (nitroiodophényle).

## 5. Potentialisation de la toxicité

Lorsque des toxines ou des agents biologiquement actifs sont associés, l'activité biologique du mélange peut être égale, inférieure ou supérieure à la somme de l'activité de chaque toxine. Il y a dans ce dernier cas synergisme entre les molécules. Bradfish et al. décrivent ainsi un synergisme entre deux toxines chimériques CryIF et CryIAC, qui produit une toxicité accrue contre les lépidoptères.

Les spores de Bt ssp. *kurstaki* augmentent la toxicité des cristaux de Bt ssp. *kurstaki* vis-à-vis des larves de papillon *P. xylostella* résistantes ou sensibles. Inhiber la germination des spores réduit la toxicité vis-à-vis des larves résistantes, mais pas vis-à-vis des larves sensibles. Pour ces dernières, un synergisme a été observé entre Cry2A et les spores de Bt subsp. *kurstaki*, et entre Cry1C et les spores de Bt ssp. *aizawai* pour les deux types de larves. Les toxines combinées aux spores peuvent donc être toxiques, même si les toxines ou les spores seules ont peu ou pas d'activité insecticide (37).

Greenplate et al. décrivent un autre synergisme faisant intervenir la 3-Hydroxystéroïde oxydase en combinaison avec les toxines Bt CryIAB ou CryIAC. Cette association produit un accroissement de la toxicité envers des insectes ravageurs du coton et du maïs tels que *H. zea* et plusieurs autres lépidoptères.

Xu et al. décrivent plus de 54 additifs pour accroître la toxicité de deux souches Bt

contre les larves de *S. litura*, dont plusieurs ont fournis des résultats positifs (seul le résumé, en anglais, a pu être exploité).

Des processus qui augmentent l'effet insecticide des toxines Bt mais ne faisant pas intervenir un synergisme entre les espèces en présence, ont également été mis en évidence. Pang et al. montrent qu'*in vitro*, l'emploi d'une forte concentration de sucs intestinaux pour activer les  $\delta$ -endotoxines de Bt produit une quantité de toxines de 60-65 kDa inférieure à celle obtenue avec des sucs dilués. Une perte de l'activité insecticide est également observée. L'ajout de DFP (inhibiteur de protéase sérique) bloque la capacité des sucs intestinaux à digérer la protoxine. Il a été précédemment montré que plusieurs inhibiteurs de protéases sériques augmentaient l'activité insecticide de Bt ssp. *kurstaki*, ssp. *tenebrionis* et ssp. *israelensis* (49). Pang et al. suggèrent que cette potentialisation pourrait résulter en partie de l'inhibition des protéases présentes dans les sucs intestinaux de l'insecte.

Une autre étude s'intéresse à *H. armigera* et *B. mori*, ce dernier étant le plus sensible des deux aux protoxines de Bt ssp. HD-1 (59). Une quantité importante de toxines activées a été détectée dans les sucs intestinaux de *B. mori*, contrairement à *H. armigera* chez lequel une dégradation plus poussée des toxines a été observée par SDS-PAGE. Cette dégradation a pu être freinée par des inhibiteurs de protéases sériques classiques, et tout particulièrement par des inhibiteurs de chymotrypsine, suggérant un rôle central de la chymotrypsine dans le processus. Toutes ces expériences d'inhibition ont conduit à un accroissement de la toxicité des protoxines solubilisées de HD-1 contre *H. armigera*.

Comme il l'a été évoqué dans le paragraphe précédent, l'activité toxique peut aussi être potentialisée par l'introduction de plusieurs ponts salins ou autres liens entre les hélices  $\alpha$  4 et  $\alpha$ 5 du domaine I, ou par la stabilisation de l'épingle à cheveux  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 en créant des ponts entre les boucles  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 et  $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 (18).

Un article, malheureusement en idéogrammes chinois, expose les derniers progrès réalisés en matière de compréhension des mécanismes d'action et d'accroissement de la toxicité des protéines CryI de Bt (79). Les points abordés sont la solubilisation, la dégradation, la liaison avec les récepteurs et la formation des pores ou canaux. La stimulation de l'ingestion des toxines par les insectes, la protection des endotoxines des ultraviolets ou la coopération avec d'autres microbes sont aussi traités.

## **D. Résistance des insectes aux toxines de *Bacillus thuringiensis***

### **1. Développement de la résistance**

Si jusqu'à présent, le seul cas connu de résistance en champs se réduisait à *P. xylostella*, de nombreux exemples de résistance en laboratoire sont disponibles (53) :

- chez les lépidoptères : *H. virescens* (pour Cry1Ac), *Plodia interpunctella* (pour Bt ssp. *kurstaki*), *S. exigua* (pour Cry1C)
- chez les coléoptères : *Leptinotarsa decemlineata* (pour Cry3A)
- chez les diptères : *A. aegypti* (pour Bt ssp. *israelensis*), *C. quinquefasciatus* (pour Bt ssp. *israelensis* et Cry10A)

Des travaux récents suggèrent que des populations de *Helicoverpa armigera* de Yanggu et Xinxiang (Chine) pourraient être résistantes aux biopesticides Bt et au coton transgénique exprimant des toxines Bt (60). Les auteurs discutent d'une stratégie de management de cette résistance.

Pour la plupart des lépidoptères, les protoxines sont solubilisées dans l'intestin de l'insecte, sous des conditions alcalines. Une réduction de la solubilité est supposée être un mécanisme potentiel de la résistance des insectes aux toxines (53,56). Chilcott et al. démontrent que la toxicité de la protéine Cyt1Aa de Bt envers certains insectes dépend de sa solubilisation et de son activité protéolytique. Ahn et al. ont par ailleurs étudié la morphologie et la solubilité des protéines CryI et CytA de Bt selon différents types de cellules hôtes (l'article, en idéogrammes chinois, n'a pu être étudié).

Le phénomène de résistance aux toxines Bt peut aussi découler d'un amoindrissement de la liaison toxine-récepteur. Chez *Wiseana cervinata*, les effets d'extraits de trèfle blanc, contenant différents sucres et lectines, ont été étudiés sur la liaison de Cry1Ba à son récepteur (6). Il a été montré que la lectine DSA augmentait cette liaison d'un facteur 3.2, et que la N-acétylgalactosamine la diminuait de 28 %.

Une fois activée, la toxine doit traverser la membrane péritrophique qui agirait comme un tamis, pour gagner les cellules cibles de l'intestin. L'événement survenant directement après l'ingestion de la toxine pourrait être sa séquestration dans la lumière intestinale de l'insecte (41). Milne et al. ont ainsi identifié dans les sucs intestinaux de *C. fumiferana* une protéine de 75 kDa (TPP-75, Toxin Precipating Protein) qui précipite Cry1Aa de Bt ssp. sotto. TPP-75 exhibe un caractère élastase-like, et, contrairement aux autres protéines connues se liant aux toxines Bt, montre une spécificité pour la région C-terminale de Cry1Aa. En outre, cette protéine est associée à une activité enzymatique qui lui confère des capacités de détoxification des endotoxines, et clive un fragment de 5 kDa à l'extrémité C-terminale de la toxine activée. TPP-75 représente la première preuve que des protéines des sucs intestinaux sont susceptibles d'atténuer sélectivement l'activité des endotoxines de Bt, avant la liaison aux récepteurs putatifs des cellules sensibles. En conséquence, TPP-75 pourrait constituer un mécanisme de résistance possible pour les larves qui n'adoptent pas un système de résistance basé sur les récepteurs cellulaires aux toxines.

## **2. Restauration partielle de la sensibilité aux toxines Bt**

Le nombre très restreint de toxines connues pour lutter contre les Coléoptères rend le management de la résistance difficile en ce qui les concerne. En outre, la résistance croisée au sein des protéines Cry est maintenant un phénomène fréquemment observé. Remplacer Cry3A par Cry1B (toxique vis-à-vis des Coléoptères) dans un programme destiné à surmonter la résistance du Coléoptère *C. scripta* à Cry3A serait inefficace, de part le haut degré de résistance croisée observé par Federici et al. entre les deux toxines. Cependant, l'étude suggère que la Cyt1A pourrait apporter une solution efficace. Elle démontre que la protéine Cyt1Aa est fortement toxique envers *C. scripta* et qu'elle supprime selon un facteur supérieur à 5000, la résistance de *C. scripta* à Cry3Aa. Cette absence de résistance croisée entre les protéines Cry et Cyt démontre l'existence de mécanismes d'action fondamentalement différents, et présente Cyt1A comme une solution potentielle pour retarder le développement de la résistance aux protéines Cry de Bt ssp. *israelensis* (17). Dans une autre étude, des



souches du moustique *C. quinquefasciatus*, sélectionnées pour leur haut degré de résistance aux toxines individuelles ou multiples de *Bt ssp. israelensis* n'exhibent qu'un faible taux de résistance croisée vis-à-vis de *Bt ssp. jegathesan* (73). Le degré de résistance croisée pour Cry11B de *Bt ssp. jegathesan*, cependant, peut être plus ou moins important, mais se trouve nettement réduit chez deux souches, après combinaison de Cry11B avec Cyt1A. L'étude suggère également l'emploi de nouvelles souches bactériennes contenant de multiples protéines Cry et Cyt pour gérer le processus de résistance au sein des populations de moustiques.

Une souche de *Bacillus sphaericus* toxique vis-à-vis d'une population de moustiques (*C. pipiens* ou *A. aegypti*) a été transformée par un gène de *Bt* en vue de produire une quantité importante de protéines CytAb1 de *Bt*. Il n'a pas été observé d'accroissement de l'activité larvicide vis-à-vis des populations sensibles de *C. pipiens* et *A. aegypti*. Cependant, la sensibilité des populations résistantes de *C. pipiens* et *C. quinquefasciatus* a été partiellement restaurée (10 à 20 fois) (66).

### 3. Stratégies de lutte

La pression de sélection peut être atténuée en restreignant, chez les plantes, l'expression des gènes de toxines aux tissus les plus susceptibles de subir les ravages de la part des insectes nuisibles. L'expression de ces gènes pourrait aussi être contrôlée par un promoteur sensible au stress de la plante. Une autre stratégie réside dans la rotation des toxines *Bt* dispensées par les plantes ou les sprays afin d'utiliser des types de toxines se liant à des récepteurs différents. Une voie très attractive consiste à combiner une stratégie haute-dose, où l'expression suffisamment conséquente de toxine pourrait atteindre les homozygotes résistants, avec l'utilisation de refuges (aires agricoles vierges de toxines). La grande majorité des hétérozygotes porteurs d'allèles de résistance étant tués, les probabilités sont grandes pour que les survivants s'accouplent avec les insectes sensibles du refuge voisin, limitant ainsi les risques d'apparition d'insectes homozygotes résistants (53,56). Ramachandran et al. ont démontré que les larves de *P. xylostella* migraient des plants transgéniques aux plants non transgéniques avant d'avoir ingéré une dose létale de toxine. Aussi, une stratégie de refuge, avec un espacement adéquat des rangs transgéniques et des rangs non transgéniques minimiserait le taux de développement de la résistance des larves (54). Des études sur des populations de *P. xylostella* (en champs, dans la province de Guangdong, Chine) ont montré ces insectes très résistants à une formulation *Bt* standard, le Cs3ab-1991 (36). Elevées en laboratoire, sans exposition aux formulations *Bt*, les colonies de *P. xylostella* ont vu leur résistance décroître rapidement, pour redevenir sensibles au Cs3-1991 après 5 générations.

Le refuge peut également se combiner à l'emploi simultané de plusieurs toxines dépendantes de différents mécanismes d'action. L'utilité de ce type de stratégie a par exemple été démontrée dans des travaux récents portant sur *O. nubilalis* chez lequel Cry1Ab et Cry1Ba, toutes deux fortement toxiques, se lient à des récepteurs différents (56). Warren et al. proposent de combiner les endotoxines *Bt* avec les VIPs (Vegetative Insecticidal Proteins), produites durant la phase de croissance végétative de *Bacillus*. Van Mellaert et al. (1999) ont mis au point une méthode d'expression chez les plantes de plusieurs toxines simultanément et liant leur récepteur de façon non compétitive. Dans le même ordre d'idées, Hammock et al. décrivent l'emploi de toxines ne rentrant pas en compétition pour le même récepteur et à

action synergique, exprimées par un baculovirus.

Yu et al. proposent plusieurs stratégies pour combattre les résistances apparaissant chez les insectes ; cependant, l'article, rédigé en idéogrammes chinois, n'a pu être analysé.

Enfin, Liu et al. ont émis l'hypothèse que l'absence de spores au sein des plantes ou des bactéries transgéniques exprimant les toxines Bt accélérerait l'évolution de la résistance des insectes à ces toxines. Leur étude montre en particulier que l'effet synergique (voir paragraphe 5. *Potentialisation de la toxicité*) observé avec les spores de Bt ssp. Kurstaki contre une souche résistante de papillons (diamondback) était égal ou supérieur à celui produit contre une souche sensible.

## **Conclusion**

Les mécanismes de toxicité des protéines Cry et Cyt de Bt, aussi bien que ceux de résistance à ces molécules, ont été et sont toujours intensivement étudiés. Pourtant, les processus mis en jeu, faisant intervenir des interactions complexes entre les toxines, leurs hôtes bactériens, les organismes cibles et l'écosystème, demeurent pour une certaine part non élucidés. Les multiples étapes impliquées dans les mécanismes d'action des protéines insecticides de Bt, et le fait que les différentes souches Bt aient coévolué parmi les insectes sans développement de résistance, laissent envisager par le passé un avenir prometteur pour les biopesticides. Cependant, l'apparition en laboratoire de nombreux cas de résistance, et plus encore en champs avec *P. xylostella*, remet en cause leur efficacité à long terme. Aussi, une coordination des techniques biochimiques, génétiques et biophysiques, mais également une mobilisation et une sensibilisation à l'échelle internationale quant à l'emploi rationnel de ces biopesticides, s'avèrent indispensables.

### III - Bibliographie

La présentation de ces références bibliographiques s'appuie sur la norme Z44 005.

#### Partie 1 : Références utilisées dans la synthèse

---

1. **AGRIGENETICS**, Ocs-element, Ellis JG, Llewellyn DJ, Peacock WJ, US, brevet No.5 710 267, 1998-01-20
2. **AHN, KIM BK**, Effects of Host Cell on the Morphology and Solubility of CryI and CytA Protein of *Bacillus thuringiensis*, *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 1998, Vol.41, No. 1, p.23-30
3. **ALCANTARA E, ALZATE O, LEE M et al.**, Role of alpha helix 7 in activity and structural stability of CryIAb delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis*., *Biophysical Journal*, 1998, Vol.74, No.2 Part 2 (Fév.), p.A173
4. **ANDOW DA, ALSTAD DN**, F2 screen for rare resistance alleles, *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.3 (Juin), p.572-578
5. **ANDOW DA, ALSTAD DN, PANG YH et al.**, Using an F2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae), *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.3 (Juin), p.579-584
6. **CHILCOTT CN, BROADWELL AH, WIGLEY PJ**, Factors affecting the binding of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein, Cry1Ba, to *Wiseana cervinata* brush border membrane vesicles, *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, 1998, Vol.2, No.1, p.1-5
7. **CHILCOTT CN, WIGLEY PJ, BROADWELLAH et al.**, Activities of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins Cyt1Aa and Cyt2Aa against three species of sheep blowfly, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.10, p.4060-4061
8. **CLAIRMONT FR, MILNE RE, PHAM VAN THONG et al.**, Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*., *Journal of Biological Chemistry*, 1998, Vol.273, No.15(Avr.), p.9292-9296
9. **COOPER MA, CARROLL J, TRAVIS ER ET AL**, *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment., *Biochemical Journal*, 1998, Vol.333, No.3 (Août), p.677-683
10. **CRICKMORE N, ZEIGLER DR, FEITELSON J et al.**, Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, Vol. 62, No.3 (Sep.), p.807-&  
<URL : [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/rev.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/rev.html)>

11. **DE MAAGD, BAKKER RA, MASSON PL et al.**, Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N, *Molecular Microbiology*, 1999, Vol.31, No.2, p.463-472
12. **DE ROCHER EJ, VARGO-GOGOLA TC, DIEHN SH et al.**, Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants., *Plant Physiology (Rockville)*, 1998, Vol.117, No.4 (Août), p.1445-1461
13. **DIEHN SH, CHIU WAN-LING, DE ROCHER EJ et al.**, Premature polyadenylation at multiple sites within a *Bacillus thuringiensis* toxin gene-coding region., *Plant Physiology (Rockville)*, 1998, Vol.117, No.4 (Août), p.1433-1443
14. **DOUCHES DS, WESTEDT A L, ZARKA K et al.**, Potato transformation to combine natural and engineered resistance for controlling tuber moth, *Hortscience*, 1998, Vol.33, No.6 (Oct.), p.1053-1056
15. **ECOGEN INC.**, Recombinant bacillus thuringiensis strains, insecticidal compositions and method of use, Baum, James A, US, brevet No.5 776 449, 1998-07-07
16. **ESCRICHE B, DE DECKER N, VAN RIE J et al.**, Changes in permeability of brush border membrane vesicles from *Spodoptera littoralis* midgut induced by insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*., *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.4 (Avr.), p.1563-1565
17. **FEDERICI BA, BAUER LS**, Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.11 (Nov.), p.4368-4371
18. **GAZIT, LA ROCCA E, SANSOM P et al.**, 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, *Proceedings-National Academy of Sciences USA*, 1998, Vol. 95, No.21, p.12289-12294
19. **GE BAOXUE, BIDESHI DENNIS, MOAR WILLIAM J et al.**, Differential effects of helper proteins encoded by the cry2A and cry11A operons on the formation of Cry2A inclusions in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 1998, Vol.165, No.1(Août), p.35-41
20. **GLEAVE AP, MITRA DS, MARKWICK NP et al.**, Enhanced expression of the *Bacillus thuringiensis* cry9Aa2 gene in transgenic plants by nucleotide sequence modification confers resistance to potato tuber moth, *Molecular Breeding*, 1998, Vol.4, No.5, p.459-472
21. **GUIHARD G, VACHON V, YI J et al.**, Cry1c toxin on *Bacillus thuringiensis* : Pore formation and properties in live cells, *Biophysical Journal*, 1998, Vol.74, No.2 Part.2 (Fév.), p.A320
22. **HUA GANG, TSUKAMOTO KIKUO, RASILO MAIJA-LIISA et al.**, Molecular cloning of a GPI-anchored aminopeptidase N from *Bombyx mori* midgut: A putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA toxin., *Gene (Amsterdam)*, 1998, Vol.214, No.1 Part.2 (Juil.), p.177-185
23. **HUPFER C, HOTZEL H, SACHSE K et al.**, Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction., *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 1998, Vol.206, No.3, p.203-207

24. **IHARA HIDESHI, UEMURA TARO, MASUHARA MIHO et al.**, Purification and partial amino acid sequences of the binding protein from *Bombyx mori* for CryIAa delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*, *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 1998, Vol.120, No.1 (Mai), p.197-204
25. **JOHNSON, OPPERT DE, MCGAUGHEY B et al.**, Spore Coat Protein Synergizes *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxicity for the Indianmeal Moth (*Plodia interpunctella*), *Current Microbiology*, 1998, Vol.36, No.5, p.278-282
26. **KASMAN LM, LUKOWIAK AA, GARCZYNSKI SF et al.**, Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.8, p.2995-3003
27. **KEETON TP, FRANCIS BR, MAATY WALID SA et al.**, Effects of midgut-protein-preparative and ligand binding procedures on the toxin binding characteristics of BT-R1, a common high-affinity receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* toxins., *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.6 (Juin), p.2158-2165
28. **KIM YS, KANDA K, KATO F et al.**, Effect of the carboxyl-terminal portion of Cry1Ab in *Bacillus thuringiensis* on toxicity against the silkworm, *Bombyx mori*, *Applied Entomology and Zoology*, 1998, Vol.33, No.3 (Août), p.473-477
29. **KIM YS, KANDA K, YAMAGUCHI K et al.**, Genetic analysis of the cry1Ab gene in *Bacillus thuringiensis* strain AF101, *Applied Entomology and Zoology*, 1998, Vol.33, No.3 (Août), p.441-447
30. **KORETSKAIA NG, LOSEVA OI, GERASIMOV VN et al.**, Features of the production of CryIIIa delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* in a recombinant strain of *Pseudomonas putida* under control of Pm and xylS regulatory elements, *Mikrobiologiia (RUSSIA)*, 1998, Vol.67, No.3 (Mai-Juin), p.349-355
31. **KUMAR S, VENKATESWERLU N**, Analysis of 66 kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* reveals differential amino terminal processing of protoxin by endogenous protease(s), *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, Vol.45, No.4, p.769-774
32. **KUMAR S, VENKATESWERLU N**, Endogenous protease-activated 66k-Da from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* against *Spodoptera littoralis*, *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 159, p113-120
33. **KUMAR S, VENKATESWERLU N, G**, Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and their role in protoxin activation, *FEMS Microbiology Letters*, 1998, Vol.166, No.2, p377-382
34. **KWA MS, DE MAAGD RA, STIEKEMA WJ ET AL**, Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C to cultured insect cells., *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, Vol.71, No.2 (Mars), p.121-127
35. **LI , AKHURST J, YU R et al.**, Binding assay of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal crystal proteins in diamondback moth, *Entomologica Sinica*, 1998, Vol.5, No.4, p.350-354
36. **LI, J. WU, J. YU, Z. ET AL**, Resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis*, *Journal-Huazong agricultural university*, 1998, Vol.17, No. 3, p.214-217
37. **LIU YONG-BIAO, TABASHNIK BE, MOAR WJ et al.**, Synergism between *Bacillus*

thuringiensis spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*), *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.4 (Avr.), p.1385-1389

38. **LIU, TABASHNIK YB, BE**, Elimination of a Recessive Allele Conferring Resistance to *Bacillus thuringiensis* from a Heterogeneous Strain of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae), *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.5, p.1032-1037

39. **MAHADI NM, HASTOWO S, LAY B et al.**, Application of multiplex PCR for rapid determination of cry1 gene profiles of new *Bacillus thuringiensis* isolates, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, Vol.8, No.5 (Oct.), p.517-522

40. **MEENAKSHISUNDARAM, GUJAR KS**, Proteolysis of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* endotoxin with midgut proteases of some important lepidopterous species, *Indian Journal of Experimental Biology*, 1998, Vol.36, No.6, p.593-598

41. **MILNE, WRIGHT R, KAPLAN T et al.**, Spruce budworm elastase precipitates *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, Vol.28 No. 12, p.1013-1024

42. **MIRANDA R, GUERRERO G, BRAVO A**, Structured organization of the different domains from Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* in the membrane-inserted state., *Toxicon*, 1998, Vol.36, No.9 (Sept.), p.1297

43. **MONSANTO COMPANY**, Method of controlling insects, Greenplate, John T, Pershing et al., US, brevet No.5 763 245, 1998-06-09

44. **MYCOGEN CORPORATION**, Pesticidal compositions, Bradfish, Gregory A, Thompson et al., US, brevet No.5 827 514, 1998-10-27

45. **NAGAMATSU YASUNORI, TODA SATOSHI, KOIKE TAKASHI et al.**, Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, Vol.62, No.4 (Avr.), p.727-734

46. **NAGAMATSU YASUNORI, TODA SATOSHI, YAMAGUCHI FUMIHIDE et al.**, Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, Vol.62, No.4 (Avr.), p.718-726

47. **NOVARTIS CORPORATION**, Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins, Warren, Gregory W, Koziel et al., US, brevet No.5 770 696, 1998-06-23

48. **NOVARTIS CORPORATION**, Synthetic DNA sequence having enhanced activity in maize, Koziel, Michael G, Desai et al., US, brevet No.5 859 336, 1998-01-12

49. **PANG, GRINGORTEN AS**, Degradation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin in host insect gut juice, *FEMS Microbiology Letters*, 1998, Vol.167, No.2, p.281-286

50. **PARK HW, GE BX, BAUER LS et al.**, Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.10 (Oct.), p.3932-3938

51. **PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.**, Recombinant plant expressing non-competitively binding insecticidal crystal proteins, Van Mellaert, Herman, Botterman et al., BE, brevet No.5 866 784, 1999-02-02

52. **POTVIN L, LAPRADE R, SCHWARTZ JL**, Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in Cfl cells (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera)., *Journal of Experimental Biology*, 1998, Vol.201, No.12 (Juin), p.1851-1858
53. **RAJAMOHAN F, LEE MK, DEAN DH et al.**, *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: Molecular mode of action., *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1998, Vol.60, p.1-27
54. **RAMACHANDRAN S, BUNTIN GD, ALL JN et al.**, Movement and survival of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae in mixtures of nontransgenic and transgenic Canola containing a cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis*, *Environmental Entomology*, 1998, Vol.27, No.3 (Juin), p.649-656
55. **SANDOZ LTD.**, *Bacillus thuringiensis* sporulation gene, Reynoso, Mitra Shahabi, Kalman et al., US, brevet No.5 827 515, 1998-10-27
56. **SCHNEPF E, CRICKMORE N, VANRIE J et al.**, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, Vol.62, No.3 (Sep.), p.775-&
57. **SELINGER LB, KHACHATOURIANS GG, BYERS JR et al.**, Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene by *Bacillus pumilus*, *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, Vol.44, No.3 (Mars), p.259-269
58. **SEO, RYU YR, LEE JC et al.**, Study on the Cytotoxic Mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin, a Bioinsecticide: Effect on K Channel of Insect Cell Lines, *Korean Journal of Entomology*, 1998, Vol.28, No.2, p.119-126
59. **SHAO, CUI Z, LIU Y et al.**, Processing of  $\delta$ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 in *Heliothis armigera* Midgut Juice and the Effects of Protease Inhibitors, *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, Vol.72, No.1, p.73-81
60. **SHEN, ZHOU J, WU W et al.**, Early resistance of *Helicoverpa armigera* (Huebner) to *Bacillus thuringiensis* and its relation to the effect of transgenic cotton lines expressing Bt toxin on the insect, *Acta Entomologica Sinica*, 1998, Vol.41, No.1, p.8-14
61. **SHEVELEV AB, LEWITIN E, NOVIKOVA SI et al.**, A new PCR-based approach to a fast search of a wide spectrum of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, Vol.45, No.6 (Sep.), p.1265-1271
62. **TAN, LIANG WJ, GUO GM et al.**, Mechanism of Resistance Alleviation in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Pyrethroid Caused by *Bacillus thuringiensis* Pretreatment, *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.6, p.1253-1259
63. **TENOTIO S, SANCHEZ J, BRAVO A**, Differences in mode of action of domain I from Cry4A and Cry11A toxins from *Bacillus thuringiensis* in mosquito midgut membranes., *Toxicon*, 1998, Vol.36, No.9 (Sep.), p.1298
64. **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA**, Insect control with multiple toxins, Hammock BD, Herrmann RK Moskowitz H et al., US, brevet No.5 756 340, 1998-05-26
65. **THERMO TRILOGY CORPORATION**, Antibodies directed to the binding proteins of

Bacillus thuringiensis and their use, Geiser, Martin, Stock et al., US, brevet No.5 804 393, 1998-09-08

66. **THIERY I, HAMON S, DELECLUSE A et al.**, The introduction into Bacillus sphaericus of the Bacillus thuringiensis subsp. medellin cyt1Ab1 gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to B. sphaericus, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.10 (Oct.), p.3910-3916
67. **UAWITHYA P, TUNTITIPPAWAN T, KATZENMEIER G et al.**, Effects of larvicidal activity of single proline substitutions in alpha3 or alpha4 of the Bacillus thuringiensis Cry4B toxin, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, Vol.44 (Avr.), No.4, p.825-832
68. **VAZQUEZ-PADRON R, MARTINEZ-GIL AF, AYRA-PARDO C et al.**, Biochemical characterization of the third domain from Bacillus thuringiensis CRY1A toxins., *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, Vol.45, No.5 (Août), p.1011-1020
69. **VITALITY-BIOTECHNOLOGIES**, New synthetic gene for Bacillus thuringiensis toxic protein optimized for plant expression - transgenic plant and transgenic animal construction, Strizhov N, Koncz C, Schell J et al., IL, brevet No.WO 9 815 630, 1998-04-16
70. **VILAS-BOAS, VILAS-BOAS GF, LERECLUS LA et al.**, Bacillus thuringiensis conjugation under environmental conditions, *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, Vol.25, No.4, p.369-374
71. **VILLALON M, VACHON V, BROUSSEAU R et al.**, Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of Bacillus thuringiensis insecticidal toxins in Sf9 cells., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, Vol.1368, No.1 (Jan.), p.27-34
72. **WANG, YU Q**, Modification of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein cry1E, *Journal-Huazhong Agricultural University*, 1998, Vol.17, No. 5, p.465-468
73. **WIRTH MC, DELECLUSE A, FEDERICI BA et al.**, Variable cross-resistance to Cry11B from Bacillus thuringiensis subsp. jegathesan in Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, V64, N11 (NOV), P4174-4179
74. **XU, YU J, PANG J et al.**, Effects of additives to Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins against Spodoptera litura, *Natural Enemies of Insects*, 1998, Vol.20, No.2, p.49-55
75. **YAOI K, NAKANISHI K, KADOTANI T et al.**, cDNA cloning and expression of Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from Bombyx mori, *Biochim Biophys Acta*, 1999, Vol.18, No.1444 Part.1 (Jan.), p.131-137
76. **YU, YU J, PANG Y ET AL**, Advances in studies on insect resistance to Bacillus thuringiensis(II): the strategy to overcome the resistance, *Natural Enemies of Insects*, 1998, Vol.20, No.1, p.38-41
77. **ZALUNIN IA, REVINA LP, KOSTINA LI et al.**, Limited proteolysis of Bacillus thuringiensis CryIG and CryIVB delta-endotoxins leads to formation of active fragments that do not coincide with the structural domains., *Journal of Protein Chemistry*, 1998, Vol.17, No.5 (Juil.), p.463-471
78. **ZENG, REN L**, The Current Condition and Advance of The Research on Bacillus thuringiensis cry Genes, *Microbiology-Beijing-*, 1998, Vol.25, No.1, p.49-51



79. **ZHANG J, WANG J, QIN C et al.**, Mechanism and potentiation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin insecticidal activity, *Acta Entomologica Sinica*, 1998, Vol.41, No.3, p.323-332
80. **ZIDUOL, JIANGWU, LING Y et al.**, Expression characteristic of *Bacillus thuringiensis* cry1 gene in *Pseudomonas fluorescens* Pfx-18, *Weishengwu Xuebao*, 1998, Vol.38, No.1 (Fév.), p.1-5

## Partie 2 : Références non utilisées dans la synthèse, et classées par thèmes.

### Ingénierie

81. **FARRERA, PEREZ-GUEVARA RR, DE LA TORRE F et al.**, Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73, *Applied Microbiology and Biotechnologie*, 1998, Vol.49, No.6, p.758-765
82. **LIU, TZENG BL**, Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology, *Bioprocess Engineering*, 1998, Vol.18, No.6, p.413-418
83. **MONSANTO COMPANY**, *Bacillus thuringiensis* apr and npr genes, apr and npr B.t. strains, and method of use, Donovan, William P, Tan et al., US, brevet No.5 759 538, 1998-06-02
84. **MONSANTO COMPANY**, Enhanced expression in plants, Brown, Sherri M, Santino et al., US, brevet No.5 859 347, 1998-01-12

### Action des toxines

85. **ADAMCZYK JJ, HOLLOWAY JW, CHURCH GE et al.**, Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) partial derivative-endotoxin, *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.2 (Avr.), p.539-545
86. **ADAMCZYK JJJ, MASCARENHAS VJ, CHURCH GE et al.**, Susceptibility of conventional and transgenic cotton bolls expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) variant delta-endotoxin, to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) injury, *Journal of Agricultural Entomology*, 1998, Vol.15, No.3 (Juil.), p.163-171
87. **BARBOZA-CORONA JE, LOPEZ-MEZA JE, IBARRA JE**, Cloning and expression of the cry1Ea4 gene of *Bacillus thuringiensis* and the comparative toxicity of its gene product., *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998, Vol.14, No.3 (Juil.), p.437-441
88. **BARKER, JOHN F**, Effect of *Bacillus Thuringiensis* Subsp. *Kurstaki* Toxin on the Mortality and Development of the Larval Stages of the Banded Sunflower Moth (Lepidoptera: Cochyliidae), *Journal of economic entomology*, 1998, Vol.91, No.5 (Oct.), p.1084

89. **CHAKRABARTI SK, MANDAOKAR AD, KUMAR PA et al.**, Synergistic effect of Cry1Ac and Cry1Fdelta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*., *Current Science*, 1998, Vol.75, No.7 (Oct.), p.663-664
90. **FILHO OG, DENOLF P, PEFEROEN M et al.**, Susceptibility of the coffee leaf miner (*Perileucoptera* spp.) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: a model for transgenic perennial crops resistant to endocarpic insects - crystal protein production in *Escherichia coli* for coffee transgenic plant, *Current Microbiology*, 1998, Vol.36, No.3, p.175-179
91. **GREENPLATE JT, HEAD GP, PENN SR et al.**, Factors potentially influencing the survival of *Helicoverpa zea* on Bollgard(R), *USA 1998 Proceedings Beltwide Cotton Conferences*, 1998. Vol.2 (Jan.), p.1030-1033
92. **HILBECK A, BAUMGARTNER M, FRIED PADRUOT M et al.**, Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), *Environmental Entomology*, 1998, Vol.27 No.2 (Avr.), p.480-487
93. **HILBECK A, MOAR WJ, PUSZTAI CM et al.**, Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), *Environmental-Entomology*, 1998, Vol.27, No.5 (Oct.), p.1255-1263
94. **KNIGHT AL, LACEY LA, STOCKHOFF BA et al.**, Activity of Cry1 endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for four tree fruit leafroller pest species (Lepidoptera: Tortricidae), *Journal of Agricultural Entomology*, 1998, Vol.15, No.2 (Avr.), p.93-103
95. **RICO E, BALLESTER V, MENSUA JL**, Survival of two strains of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on transgenic potatoes expressing a *Bacillus thuringiensis* crystal protein, *Agronomie (Paris)*, 1998, Vol.18, No.2 (mars), p.151-155
96. **SANDOZ LTD.**, Hybrid toxin, Bosch, Hendrik J, Stiekema et al., US, brevet No.5 736 131, 1998-04-07

### Récentes découvertes de toxines et souches de *Bacillus thuringiensis*

97. **ABBOTT LABORATORIES**, *Bacillus thuringiensis* isolates, Wilcox DR, Smith RA, Benson TA, IL, brevet No.5 801 046, 1998-09-01
98. **ABBOTT LABORATORIES**, *Bacillus thuringiensis* strains active against lepidopteran and coleopteran pests, Liu, Chi-Li, Adams et al., US, brevet No.5 770 431, 1998-06-23
99. **ASANO SHIN ICHIRO, PUJIASTUTI YULIA, SAHARA KEN et al.**, Identification of cry1 genes from *Bacillus thuringiensis* strains which have activity against *Spodoptera litura*, *Journal of Sericultural Science of Japan*, 1998, Vol.67, No.3 (Juin), p.237-242
100. **BRAVO A, SARABIA S, LOPEZ L et al.**, Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection, *Applied Environmental Microbiology*, 1998, Vol.64, No.12

(Déc.), p.4965-4972

101. **CHANG JH, ROH JY, JE YH et al.**, Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding delta-endotoxin Cry1E, *Letters in Applied Microbiology*, 1998, Vol.26, No.5 (Mai), p.387-390

102. **ECOGEN, INC.**, *Bacillus thuringiensis* bacteria, Donovan, William P, Gonzalez et al., US, brevet No.5 854 053, 1998-12-29

103. **ECOGEN, INC.**, *Bacillus thuringiensis* strains showing improved production of certain lepidopteran-toxic crystal proteins, Baum, James, Doylestown, PA, brevet No.5 804 180, 1998-09-08

104. **HANSEN BM, DAMGAARD PER H, EILENBERG J et al.**, Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects, *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, Vol.71, No.2 (Mars), p.106-114

105. **IRIARTE J, BEL Y, FERRANDIS MD et al.**, Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain, *Syst-Appl-Microbiol.*, 1998, Vol.21, No.1 (Mars), p.97-106

106. **JOHNSON C, BISHOP A H, TURNER C L**, Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the housefly (Diptera: Muscidae) and tropical blowflies (Diptera: Calliphoridae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, Vol.71, No.2 (Mars), p.138-144

107. **KIM HO SAN, LEE DAE WON, WOO SOO DONG et al.**, Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea, *Current Microbiology*, 1998, Vol.37, No.3 (Sep), p.195-200

108. **MORRIS ON, CONVERSE V, KANAGARATNAM P**, Isolation, characterization, and culture of *Bacillus thuringiensis* from soil and dust from grain storage bins and their toxicity for *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae), *Canadian Entomologist*, 1998, Vol.130, No.4 (Juil.-Août), p.515-537

109. **MYCOGEN CORPORATION**, *Bacillus thuringiensis* genes encoding lepidopteran-active toxins, Payne, Jewel, Cummings et al., US, brevet No.5 723 758, 1998-03-03

110. **MYCOGEN CORPORATION**, *Bacillus thuringiensis* isolates selectively active against certain coleopteran pests, Payne, Jewel M, Michaels et al., US, brevet No.5 770 695, 1998-06-23

111. **MYCOGEN CORPORATION**, *Bacillus thuringiensis* isolates active against weevils, Bradfisch, Gregory A, Schnepf et al., US, brevet No.5 707 619, 1998-01-13

112. **MYCOGEN CORPORATION**, *Bacillus thuringiensis* toxins active against hymenopteran pests, Payne, Jewel M, Kennedy et al., US, brevet No.5 824 792, 1998-10-20

113. **MYCOGEN CORPORATION**, Nouvelles toxines pesticides et séquences nucléotidiques codant pour celles-ci, Feitelson JS, Schnepf HE, Narva KE et al., FR, brevet No.WO 9 719 804, 1998-05-07

114. **MYCOGEN CORPORATION**, Souches de *Bacillus thuringiensis* pesticides, Bradfisch GA, Stockhoff B, Muller-Cohn J, FR, brevet No.WO 9 805 185, 1998-09-17

115. **MYCOGEN CORPORATION**, Toxines actives contre les parasites, Schnepf HE, Wicker C, Narva KE, FR, brevet No.WO 9 711 658, 1998-01-08

116. **MYCOGEN CORPORATION**, Toxines de *Bacillus thuringiensis*, Schnepf HE, Narva KE, Muller-Cohn J, FR, brevet No.WO 9 805 081, 1998-09-17
117. **NOVARTIS FINANCE CORPORATION**, Pesticidal proteins and strains, Warren, Gregory W, Koziel et al., US, brevet No.5 849 870, 1998-12-15
118. **NOVARTIS FINANCE CORPORATION**, Pesticidal proteins and strains, Warren, Gregory W, Koziel et al., US, brevet No.5 872 212, 1999-02-16
119. **ORDUZ S, REALPE M, ARANGO R et al.**, Sequence of the cry11Bb1(1) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and toxicity analysis of its encoded protein, *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1998, Vol.1388, No.1 (Oct.), p.267-272
120. **PLANT GENETIC SYSTEMS**, *Bacillus thuringiensis* strains and their genes encoding insecticidal toxins, Peferoen, Marnix, Lambert et al., BE, brevet No.5 723 756, 1998-03-03
121. **PLANT GENETIC SYSTEMS**, *Bacillus thuringiensis* strains and their genes encoding insecticidal toxins, Peferoen, Marnix, Lambert et al., BE, brevet No.5 837 237, 1998-11-17
122. **PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.**, *Bacillus thuringiensis* strains and their insecticidal proteins, Lambert, Bart, Jansens et al., BE, brevet No.5 861 543, 1999-01-19
123. **RIZALI A, ASANO S, SAHARA K et al.**, Novel *Bacillus thuringiensis* serovar aizawai strains isolated from mulberry leaves in Indonesia., *Applied Entomology and Zoology*, 1998, Vol.33, No.1 (Fév.), p.111-114
124. **SAITOH H, HIGUCHI K, MIZUKI E et al.**, Characterization of mosquito larvicidal parasporal inclusions of a *Bacillus thuringiensis* serovar higo strain, *Journal of Applied Microbiology*, 1998, Vol.84, No.5 (Mai), p.883-888
125. **SAITOH H, HIGUCHI K, MIZUKI E et al.**, Larvicidal toxicity of Japanese *Bacillus thuringiensis* against the mosquito *Anopheles stephensi*, *Med Vet Entomol*, 1998, Vol.12, No.1 (Jan.), p.98-102
126. **SANDOZ LTD.**, Insecticide protein and gene, Kalman, Sue S, Kiehne et al., US, brevet No.5 731 194, 1998-03-24
127. **SANDOZ LTD.**, Method of controlling insect with novel insecticidal protein, Kalman, Sue S, Kiehne et al., US, brevet No.5 712 248, 1998-01-27
128. **SUNG-HEE H, HIROYUKI S, EIICHI M et al.**, A novel class of mosquitocidal delta-endotoxin, Cry19B, encoded by a *Bacillus thuringiensis* serovar higo gene., *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, Vol.21, No.2 (Juin), p.179-184
129. **THEUNIS W; AGUDA R M; CRUZ W T**, *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: Habitat distribution, delta-endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae), *Bulletin of Entomological Research*, 1998, Vol. 88, No.3 (Juin), p.335-342
130. **YONGCHUL J, SUNGUK K, COTE et al.**, Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* subsp. higo strain isolated from rice bran in Korea, *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, Vol.71, No.1, p.95-96

## Nouvelles plantes résistantes

131. **GATEHOUSE ANGHARAD MR, GATEHOUSE JA**, Identifying proteins with insecticidal activity : use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops, *Pesticide Science*, 1998 Vol.52, p.165-175
132. **BOHOROVA N, ZHANG W, MCLEAN S et al.**, Transgenic tropical maize plants with cryIAb, cryIAc and cryIB genes for insect resistance, *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 1998, Vol. 34, No. 3 part. 2 (Mars), p.55A
133. **DANDEKAR AM, MCGRANAHAN GH, VAIL PV et al.**, High levels of expression of full-length cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos, *Plant Science (Shannon)*, 1998, Vol.131, No.2 (Fév.), p.181-193
134. **DATTA K, VASQUEZ A, TU J et al.**, Constitutive and tissue-specific differential expression of the cryIA(b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest, *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, Vol. 97 No.1 part.2 (Juil.), p.20-30 July, 1998
135. **DOUCHES DS, WESTEDT AL, ZARKA K et al.**, Potato transformation to combine natural and engineered resistance for controlling tuber moth, *Hortscience*, 1998, Vol.33, No.6 (Oct.), p.1053-1056
136. **HUANG QM, MAO LQ, HUANG WH et al.**, Transgenic tobacco plants with a fully synthesized GFM CryIA gene provide effective tobacco bollworm (*Heliothis armigera*) control, *Journal Acta Botanica Sinica*, 1998, Vol.40, No.3, p.228-&
137. **JELENKOVIC G, BILLINGS S, CHEN Q et al.**, Transformation of eggplant with synthetic cryIIIA gene produces a high level of resistance to the Colorado potato beetle., *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1998, Vol. 123, No. 1 (Jan.), p.19-25
138. **KUMAR PA, MANDAOKAR A, SREENIVASU K et al.**, Insect-resistant transgenic brinjal plants, *Molecular Breeding*, 1998, Vol.4, No.1 (Fév.), p.33-37
139. **MOHAMMAD FIROZ A, DATTA K, ABRIGO E et al.**, Production of transgenic deepwater indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIA(b) gene with enhanced resistance to yellow stem borer, *Plant science : (Limerick)*, 1998, Vol.135, No.1, p.25-30
140. **MONSANTO COMPANY**, Insect resistant plants, Fischhoff DA, Fuchs RL, Lavrik PB et al., US, brevet No.5 763 241, 1998-06-09
141. **PLANT GENETIC SYSTEMS, N.V.**, Transformation vectors allowing expression of foreign polypeptide endotoxins from *Bacillus thuringiensis* in plants, De Greve HM, Salgado MB, Van Montagu MC et al., BE, brevet No.5 767 372, 1998-06-16
142. **SACHS ES, BENEDICT JH, STELLY DM et al.**, Expression and segregation of genes encoding CryIA insecticidal proteins in cotton, *Crop Science*, 1998, Vol.38, No.1 (Jan.-Fév.), p.1-11

143. **WANCHAO NI, ZHENLIN ZHANG**, Development of transgenic insect-resistant cotton plants, *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, 1998, Vol.31, No.2, p.8-13

144. **XIONGYING C, RAVINDER S, HARVEY K et al.**, Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, Vol.95, No.6 (Mars), p.2767-2772

### Résistance des insectes vis-à-vis des toxines

145. **ARPAIA S, CHIRIATTI K, GIORIO G**, Predicting the adaptation of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to transgenic eggplants expressing CryIII toxin: The role of gene dominance, migration, and fitness costs, *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.1(Fév.), p.21-29

146. **BAILEY WD, ZHAO G, CARTER LM et al.**, Feeding disruption bioassay for species and *Bacillus thuringiensis* resistance diagnosis for *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in cotton (Lepidoptera: Noctuidae), *Crop Protection*, 1998, Vol.17, No.7 (Sep.), p.591-598

147. **MANDAOKAR A, CHAKRABARTI SK, RAO NGV et al.**, A fusion gene coding for two different delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Plutella xylostella* and useful for resistance management, *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 1998, Vol.14, No.4 (Juil.), p.599-601

148. **MCGAUGHEY WH, GOULD F, GELERNTER W**, Bt resistance management, *Nat-Biotechnol.*, 1998, Vol.16; No.2 (Fév.), p.144-146

149. **ROUSH RT**, Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crop : can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not ?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1998, Vol.353, p.1777-1786

150. **TABASHNIK BE, LIU YB, MALVAR T et al.**, Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse?, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1998, Vol.353, No.1376 (Oct.), p.1751-1756

151. **WESTEDT AL, DOUCHES DS, PETT W et al.**, Evaluation of natural and engineered resistance mechanisms in *Solanum tuberosum* for resistance to *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Journal of Economic Entomology*, 1998, Vol.91, No.2 (Avr.), p. 552-556

### Autres

152. **ABDUL-RAUF M, ELLAR DJ**, Toxicity and receptor binding properties of a bacillus thuringiensis CryIC toxin active against both lepidoptera and diptera, *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, Vol.73, No.1 (Jan), p.52-58
153. **BANERJEE-BHATNAGAR, NIRUPAMA**, Modulation of Cry IV A Toxin Protein Expression by Glucose in Bacillus thuringiensis israelensis, *Biochemical and biophysical research communicati*, 1998, Vol.252, No.2 (Nov.), p402-&
154. **DIAS SC, SAGARDOY MA**, Influence of pH on the toxicity and survival of total cells and spores of Bacillus thuringiensis, *Rev Argent Microbiol*, 1998, Vol.30, No.3 (Juil.Sept.), p.122-129
155. **GUERECAL, BRAVO A**, The oligomeric state of Bacillus thuringiensis Cry toxins in solutions, *Biochimica et biophysica acta. protein structur*, 1999, Vol.1429, No.2 (Jan.), p342-&
156. **LUO K, BANKS D, ADANG MJ**, Toxicity, binding, and permeability analyses of four bacillus thuringiensis cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of spodoptera exigua and spodoptera frugiperda, *Applied Environmental Microbiology*, 1999, Vol.65, No.2 (Fév.), p.457-64



## Annexes

**TABLE 1. Révision de la nomenclature des gènes connus Cry et Cyt de *Bacillus thuringiensis*.**

Nom révisé du gène	Nom original	Accession no.	Région codante	Référence
cry1Aa1	cryIA(a)	M11250	527-4054	92
cry1Aa2	cryIA(a)	M10917	153->2955	98
cry1Aa3	cryIA(a)	D00348	73-3600	99
cry1Aa4	cryIA(a)	X13535	1-3528	62
cry1Aa5	cryIA(a)	D17518	81-3608	113
cry1Aa6	cryIA(a)	U43605	1->1860	63
cry1Ab1	cryIA(b)	M13898	142-3606	119
cry1Ab2	cryIA(b)	M12661	155-3622	111
cry1Ab3	cryIA(b)	M15271	156-3620	31
cry1Ab4	cryIA(b)	D00117	163-3627	50
cry1Ab5	cryIA(b)	X04698	141-3605	40
cry1Ab6	cryIA(b)	M37263	73-3537	37
cry1Ab7	cryIA(b)	X13233	1-3465	36
cry1Ab8	cryIA(b)	M16463	157-3621	69
cry1Ab9	cryIA(b)	X54939	73-3537	13
cry1Ab10	cryIA(b)	A29125	b	28
cry1Ac1	cryIA(c)	M11068	388-3921	3
cry1Ac2	cryIA(c)	M35524	239-3769	117
cry1Ac3	cryIA(c)	X54159	339->2192	18
cry1Ac4	cryIA(c)	M73249	1-3534	84
cry1Ac5	cryIA(c)	M73248	1-3531	83
cry1Ac6	cryIA(c)	U43606	1->1821	63
cry1Ac7	cryIA(c)	U87793	976-4509	38
cry1Ac8	cryIA(c)	U87397	153-3686	71
cry1Ac9	cryIA(c)	U89872	388-3921	33
cry1Ac10		AJ002514	388-3921	107
cry1Ad1	cryIA(c)	M73250	1-3537	79
cry1Ae1	cryIA(e)	M65252	81-3623	60
cry1Af1	icp	U82003	172->2905	49
cry1Ba1	cryIB	X06711	1-3684	10
cry1Ba2		X95704	186-3869	105
cry1Bb1	ET5	L32020	67-3753 25	
cry1Bc1	cryIB(c)	Z46442	141-3839 6	
cry1Bd1	cryE1	U70726		12
cry1Ca1	cryIC	X07518	47-3613	45
cry1Ca2	cryIC	X13620	241->2711	88
cry1Ca3	cryIC	M73251	1-3570	79
cry1Ca4	cryIC	A27642	234-3800	114
cry1Ca5	cryIC	X96682	1->2268	106
cry1Ca6	cryIC	X96683	1->2268	106
cry1Ca7	cryIC	X96684	1->2268	106

cry1Cb1	cryIC(b)	M97880	296-3823	48
cry1Da1	cryID	X54160	264-3758	42
cry1Db1	prtB	Z22511241-3720	56	
cry1Ea1	cryIE	X53985	130-3642	115
cry1Ea2	cryIE	X56144	1-3513	7
cry1Ea3	cryIE	M73252	1-3513	82
cry1Ea4	U94323	388-3900	47	
cry1Eb1	cryIE(b)	M73253	1-3522	81
cry1Fa1	cryIF	M63897	478-3999	14
cry1Fa2	cryIF	M73254	1-3525	80
cry1Fb1	prtD	Z22512483-4004	56	
cry1Ga1	prtA	Z2251067-3564	56	
cry1Ga2	cryIM	Y09326	692-4210	96
cry1Gb1	cryH2	U70725		12
cry1Ha1	prtC	Z22513530-4045	56	
cry1Hb1		U35780	728-4195	53
cry1Ia1	cryV	X62821	355-2511	108
cry1Ia2	cryV	M98544	1-2157	34
cry1Ia3	cryV	L36338279-2435	100	
cry1Ia4	cryV	L4939161-2217	54	
cry1Ia5	cryV159	Y08920	524-2680	94
cry1Ib1	cryV465	U07642	237-2393	100
cry1Ja1	ET4	L3201999-3519	25	
cry1Jb1	ET1	U31527	177-3686	116
cry1Ka1		U28801	451-4098	52
cry2Aa1	cryIIA	M31738	156-2054	20
cry2Aa2	cryIIA	M23723	1840-3738	123
cry2Aa3		D86064	2007-3911	8911
cry2Ab1	cryIIB	M23724	1-1899	123
cry2Ab2	cryIIB	X55416	874-2775	17
cry2Ac1	cryIIC	X57252	2125-3990	124
cry3Aa1	cryIIIA M22472	25-1956	39	
cry3Aa2	cryIIIA J02978	241-2172	93	
cry3Aa3	cryIIIA Y00420	566-2497	41	
cry3Aa4	cryIIIA M30503	201-2132	65	
cry3Aa5	cryIIIA M37207	569-2500	22	
cry3Aa6	cryIIIA U10985	569-2500	1	
cry3Ba1	cryIIIB2	X17123	25->1977	101
cry3Ba2	cryIIIB	A07234	342-2297	85
cry3Bb1	cryIIIBb	M89794	202-2157	24
cry3Bb2	cryIIIC(b)	U31633	144-2099	23
cry3Ca1	cryIIID X59797	232-2178	59	
cry4Aa1	cryIVA Y00423	1-3540	121	
cry4Aa2	cryIVA D00248	393-3935	95	
cry4Ba1	cryIVB X07423	157-3564	16	
cry4Ba2	cryIVB X07082	151-3558	112	
cry4Ba3	cryIVB M20242	526-3930	125	
cry4Ba4	cryIVB D00247	461-3865	95	
cry5Aa1	cryVA(a)	L070251->4155	102	
cry5Ab1	cryVA(b)	L070261->3867	67	
cry5Ac1	I34543		1->3660	76
cry5Ba1	PS86Q3	U19725	1->3735	76
cry6Aa1	cryVIA L070221->1425		68	

cry6Ba1	cryVIB L070241->1185	67	
cry7Aa1	cryIIIC M64478	184-3597	58
cry7Ab1	cryIIIC(b) U04367	1->3414	75
cry7Ab2	cryIIIC(c) U04368	1->3414	75
cry8Aa1	cryIIIE U04364	1->3471	29
cry8Ba1	cryIIIG U04365	1->3507	66
cry8Ca1	cryIIIF U04366	1-3447	70
cry9Aa1	cryIG X58120	5807-9274	104
cry9Aa2	cryIG X58534	385->3837	32
cry9Ba1	cryX X75019	26-3488	97
cry9Ca1	cryIH Z375272096-5569	57	
cry9Da1	N141 D85560	47-3553	4
cry9Da2	AF042733	<1->1937	122
cry10Aa1	cryIVC M12662	941-2965	111
cry11Aa1	cryIVD M31737	41-1969	21
cry11Aa2	cryIVD M22860	<1-235	2
cry11Ba1	Jeg80 X86902	64-2238	19
cry11Bb1	94 kDa AF017416		72
cry12Aa1	cryVB L070271->3771	67	
cry13Aa1	cryVC L070231-2409	90	
cry14Aa1	cryVD U13955	1-3558	77
cry15Aa1	34kDa M76442	1036-2055	11
cry16Aa1	cbm71 X94146	158-1996	5
cry17Aa1	cbm72 X99478	12-1865	5
cry18Aa1	cryBP1 X99049	743-2860	126
cry19Aa1	Jeg65 Y07603	719-2662	86
cry19Ba1	D88381		87
cry20Aa1	86kDa U82518	60-2318	61
cry21Aa1	I32932	1-3501	74
cry22Aa1	I34547	1-2169	76
cyt1Aa1	cytA X03182	140-886	118
cyt1Aa2	cytA X04338	509-1255	120
cyt1Aa3	cytA Y00135	36-782	26
cyt1Aa4	cytA M35968	67-813	30
cyt1Ab1	cytM X98793	28-777	109
cyt1Ba1	U37196	1-795	78
cyt2Aa1	cytB Z14147270-1046	51	
cyt2Ba1	"cytB" U52043	287-655	35
cyt2Bb1	U82519	416-1204	15