

## *Bacillus thuringiensis* : un modèle biotechnologique

par Vincent Sanchis & Didier Lereclus

Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, URA 1300 CNRS, 75724 Paris Cedex 15, France  
et Station de Recherches de Lutte Biologique, INRA, La Minière, 78285 Guyancourt Cedex, France.

Reçu le 10 janvier 2000

### RÉSUMÉ

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est une bactérie du sol, sporulante, Gram positif et aérobie facultative. Elle est connue depuis le début du siècle pour son activité insecticide contre les larves de certains Lépidoptères (ravageurs des cultures ou défoliateurs des forêts). Aujourd'hui, *Bt* est surtout connu pour être le microorganisme le plus largement utilisé comme biopesticide dans la protection des végétaux. La principale caractéristique de *Bt* est de synthétiser pendant la phase stationnaire, une inclusion cristalline, souvent appelée cristal, composée de protéines, appelées  $\delta$ -endotoxines ou protéines Cry dont la plupart possèdent une activité larvicide et un spectre d'action bien délimité. Les formulations commerciales de *Bt* sont constituées de préparations de spores-cristaux obtenues à partir de cultures réalisées en fermenteurs, qui sont ensuite utilisées sous forme de granulés ou de poudres mouillables utilisables en pulvérisations. De plus, compte tenu de l'efficacité et de la spécificité de ces toxines, ainsi que de leur très grande innocuité vis-à-vis des végétaux, des animaux et d'insectes utiles comme les abeilles, les gènes cry de *Bt* ont été utilisés dans la construction de plantes transgéniques afin de leur conférer une résistance aux insectes. Depuis 15 ans environ, les propriétés insecticides de *Bt* ont motivé de nombreuses études qui ont principalement conduit au clonage de divers gènes cry, à la caractérisation du spectre d'activité de leur produit et à une meilleure compréhension de

leur expression génétique. L'extension de l'utilisation des biopesticides et de plantes transgéniques rendue résistantes aux insectes (et donc leur succès) dépendra toutefois, en grande partie, de notre capacité à améliorer leurs performances (niveau d'activité, spectre d'action, persistance, stabilité des formulations), tout en répondant aux inquiétudes concernant les risques éventuels liés à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés et à la dissémination et/ou transfert de matériel génétique dans l'environnement. Dans ce contexte, nous avons construit des souches recombinantes de *Bt* asporogènes et possédant un spectre d'activité élargi et une meilleure toxicité, contre plusieurs ravageurs importants des cultures, que les souches naturelles dont elles dérivent. L'élimination des séquences d'ADN indésirables présentes sur les vecteurs ayant servi à construire ces souches recombinantes (origines de répllication fonctionnelles chez les bactéries à Gram négatif et gènes marqueurs de résistance aux antibiotiques) a été réalisée à l'aide d'une technique basée sur la recombinaison site-spécifique assurée par le transposon Tn4430, naturellement présent chez la plupart des souches de *Bt*. Les souches ainsi construites ne peuvent survivre dans la nature et ne contiennent pas d'ADN étranger à *Bt*; elles présentent donc une meilleure sécurité pour l'environnement que les souches naturelles de *Bt* dont elles sont issues.

### SUMMARY *Bacillus thuringiensis*: a biotechnological model

This paper is on the different biotechnological approaches that have been used to improve *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) for the control of agricultural insect pests and have contributed to the successful use of this biological control agent; it describes how a better knowledge of the high diversity of *Bt* strains and toxins genes together with the development of efficient host-vector systems has made it possible to overcome a number of the problems associated with *Bt* based insect control measures. First we present an

overview of the biology of *Bt* and of the mode of action of its insecticidal toxins. We then describe some of the progress that has been made in furthering our knowledge of the genetics of *Bt* and of its insecticidal toxin genes and in the understanding of their regulation. The paper then deals with the use of recombinant DNA technology to develop new *Bt* strains for more effective pest control or to introduce the genes encoding  $\delta$ -endotoxins directly into plants to produce insect-resistant transgenic plants. Several

exemples describing how biotechnology has been used to increase the production of insecticidal proteins in *Bt* or their persistence in the field by protecting them against UV degradation are presented and discussed. Finally, based on our knowledge of the mechanism of transposition of the *Bt* transposon Tn4430, we describe the construction of a new generation of recombinant strains of *Bt*, from which antibiotic resistance genes and other non-*Bt* DNA sequences were selectively eliminated, using a new generation of

site-specific recombination vectors. In the future, continuing improvement of first generation products and research into new sources of resistance is essential to ensure the long-term control of insect pests. Chimeric toxins could also be produced so as to increase toxin activity or direct resistance towards a particular type of insect. The search for new insecticidal toxins, in *Bt* or other microorganisms, may also provide new weapons for the fight against insect damage

## INTRODUCTION

L'espèce *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) regroupe de nombreuses bactéries apparentées à *Bacillus cereus*, et dont la caractéristique commune est de synthétiser, pendant la phase stationnaire, une inclusion cristalline composée de protéines insecticides, appelées  $\delta$ -endotoxines (ou protéines Cry). L'efficacité et la grande spécificité des  $\delta$ -endotoxines, leur innocuité vis-à-vis des végétaux, des animaux et d'insectes utiles comme les abeilles, ainsi que des coûts de production compétitifs, font de *Bt* le microorganisme le plus largement utilisé comme biopesticide pour lutter contre les insectes nuisibles, tant en agriculture qu'en santé humaine. Les formulations commerciales de *Bt* sont constituées de préparations de spores-cristaux obtenues à partir de cultures réalisées en fermenteurs, qui sont ensuite utilisées sous forme de granulés ou de poudres mouillables utilisables en pulvérisations. De plus, de nombreux gènes *cry* de *Bt* entrent dans la construction de plantes transgéniques afin de leur conférer une résistance aux insectes. Depuis 15 ans environ, les propriétés insecticides de *Bt* ont motivé de nombreuses études qui ont principalement conduit au clonage de divers gènes *cry*, à la caractérisation du spectre d'activité de leur produit, à la compréhension de leur expression génétique et enfin à la construction de souches génétiquement modifiées plus efficaces. Après une présentation de la bactérie, du mode d'action des  $\delta$ -endotoxines et de la régulation de l'expression des gènes *cry* nous montrerons comment les biotechnologies ont contribué à l'amélioration des produits à base de *Bt* afin d'en faire des outils performants au service de l'agriculture.

## LA BACTÉRIE

*Bt* est une bactérie du sol, sporulante, Gram positif et aérobie facultative. Elle est connue depuis le début du siècle pour son activité insecticide contre les larves de certains Lépidoptères (ravageurs des cultures ou défoliants des forêts). La principale caractéristique de *Bt* est de synthétiser pendant la phase stationnaire une inclusion cristalline possédant une activité larvicide. Dès 1911, le biologiste allemand Berliner décrivait cette inclusion chez un *Bacillus* qu'il avait isolé à partir de chrysalides

infectées d'*Ephestia kuehniella* (la teigne de la farine) provenant d'un moulin situé dans la province de Thuringe. Il appela cette bactérie *Bacillus thuringiensis*. Le rôle de l'inclusion cristalline dans l'activité entomopathogène de *Bt* ne fut cependant établi qu'en 1954 par Angus (Angus, 1954) qui montra que l'inclusion purifiée était toxique pour des larves de Lépidoptères sensibles. *Bt* se multiplie de façon végétative jusqu'à ce que le milieu devienne carencé pour l'un des nutriments essentiels. La bactérie entre alors en phase stationnaire et s'engage dans un processus qui aboutit à la formation de spores. Les  $\delta$ -endotoxines, qui composent l'inclusion cristalline, sont produites pendant la phase stationnaire. Elles s'accumulent dans la cellule mère pour former un cristal qui, en fin de sporulation, peut représenter environ 25 % du poids sec de la bactérie.

## LES $\delta$ -ENDOTOXINES DE *Bt* ET LEUR MODE D'ACTION

Les  $\delta$ -endotoxines, contenues dans le cristal, sont en fait des protoxines d'une taille d'environ 135 000 Daltons, transformées *in vivo* par les protéases digestives de l'hôte en toxines actives d'une taille d'environ 65 000 Daltons correspondant à la moitié amino-terminale de la molécule de protoxine. Elles agissent au niveau des cellules de l'épithélium intestinal des insectes sensibles. Une fois activées, les delta-endotoxines se fixent sur des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules épithéliales. La présence de récepteurs spécifiquement reconnus par les  $\delta$ -endotoxines constitue l'étape essentielle du mécanisme d'action et de spécificité de ces toxines (Van Rie *et al.*, 1989). Les récepteurs spécifiques d'un certain nombre de protéines appartenant à la famille des delta-endotoxines ont récemment été identifiés : il s'agit presque toujours d'aminopeptidases membranaires (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994); dans un cas, il s'agit d'une molécule présentant des similitudes avec des protéines appartenant à la famille des cadhérines (Vadlamudi *et al.*, 1995). La phase qui suit la liaison de la toxine à son récepteur et l'éventuelle contribution du récepteur à la toxicité n'ont pas été élucidées. Il est toutefois généralement admis que la toxine agit par cytolysse osmo-colloïdale consécutive à la formation de pores dans les cellules intestinales (Knowles & Dow,

1993); en d'autres termes, la formation de pores provoquerait une perturbation des échanges ioniques qui aboutirait à la lyse cellulaire.

## LA DIVERSITÉ DES $\delta$ -ENDOTOXINES DE *Bt*

Le premier gène codant pour une  $\delta$ -endotoxine fut entièrement séquencé en 1985 (Schnepf *et al.*, 1985). Aujourd'hui, plus de cent gènes *cry* différents codant pour des delta-endotoxines ont été séquencés dans le monde. La comparaison des séquences en acides aminés de ces différentes  $\delta$ -endotoxines a permis de classer ces protéines (en fonction de leur degré d'identité) en familles appelées Cry (Cry1, 2, 3, 4, etc.), elles-mêmes composées de sous-familles (Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc.), elles-mêmes subdivisées en sous-classes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac etc.). A l'heure actuelle, la nomenclature des  $\delta$ -endotoxines comprend 30 classes ou familles; chaque classe regroupe des protéines possédant plus de 45 % d'acides aminés identiques (Crickmore *et al.*, 1998). Le produit de chacun de ces gènes *cry* a généralement un spectre d'activité restreint et limité aux stades larvaires d'un petit nombre d'espèces, appartenant généralement à un même ordre, voire à une même famille ou genre. Il est cependant intéressant de noter qu'il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre le degré d'identité des protéines Cry et leur spectre d'activité.

Ainsi, les protéines Cry1Aa et Cry1Ac présentent 84 % d'identité entre elles mais seule la protéine Cry1Aa est toxique contre *Bombyx mori* (le ver à soie). En revanche, les protéines Cry3A et Cry7Aa, avec seulement 33 % d'acides aminés identiques, sont toutes deux actives contre *Leptinotarsa decemlineata* (le doryphore de la pomme de terre). De même, les protéines Cry1C et Cry9C, qui ne présentent que 33 % d'identité entre elles, sont les deux seules protéines Cry qui possèdent une bonne activité contre certains Lépidoptères appartenant à la famille des Noctuidae comme *Spodoptera littoralis* (la noctuelle du cotonnier) ou *Spodoptera exigua* (la noctuelle de la betterave) dont l'incidence agronomique pose d'importants problèmes.

## LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES *cry* CHEZ *Bt*

Les gènes codant pour les delta-endotoxines sont exprimés spécifiquement pendant la phase stationnaire. Le gène *cry1Aa* fut le premier dont la régulation a été étudiée. L'analyse transcriptionnelle de ce gène révéla qu'il existait deux sites de démarrage qui furent appelés BtI et BtII (Wong *et al.*, 1983). Deux facteurs  $\sigma$  de sporulation,  $\sigma$  35 et  $\sigma$  28, capables de transcrire *in vitro* le gène *cry1Aa*, à partir des promoteurs BtI et BtII, ont été purifiés (Brown & Whiteley, 1988, 1990). Les gènes

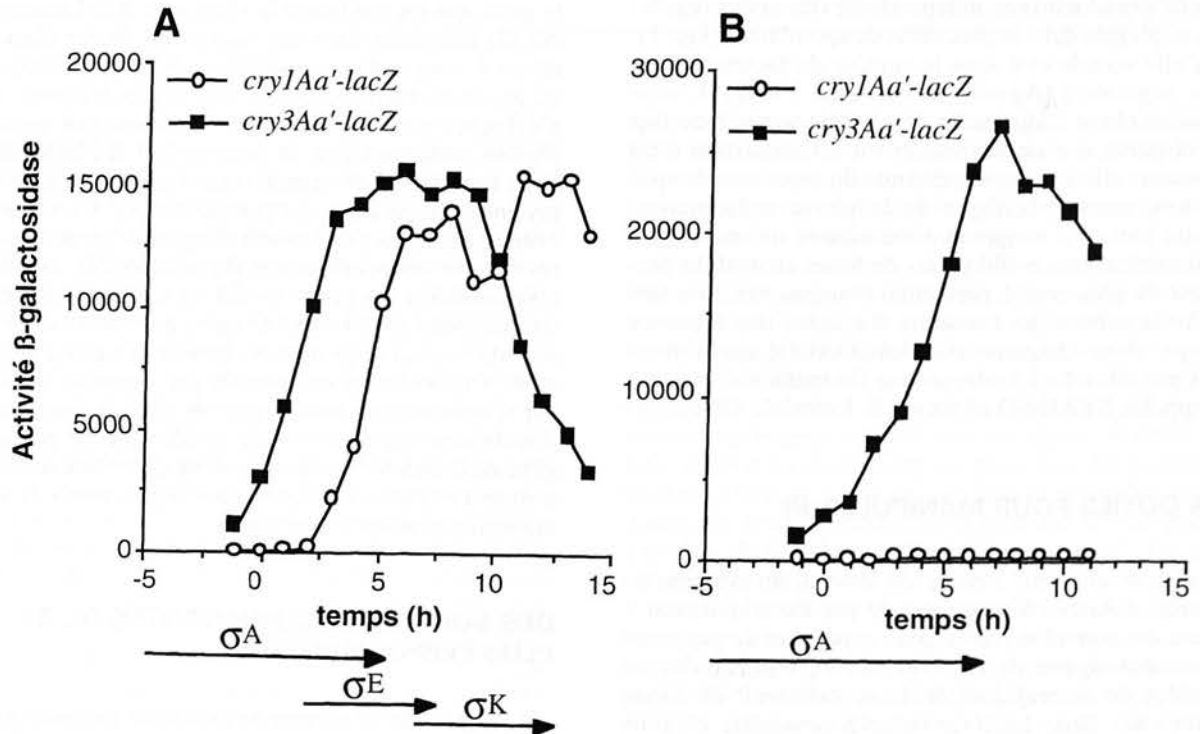


FIG. 1. – Cinétique d'expression de fusions transcriptionnelles *cry1Aa'*-*lacZ* et *cry3Aa'*-*lacZ* chez *B. thuringiensis* dans deux contextes génétiques différents (sauvage (A) et mutant  $\Delta$ SigE (B)). Les activités  $\beta$ -galactosidase ont été dosées pendant la phase végétative et pendant la phase de sporulation; le temps 0 ( $t_0$ ) indique l'entrée en phase de sporulation. Sont également représentés les facteurs  $\sigma$  présents pendant la phase végétative et le début de phase stationnaire ( $\sigma_A$ ) et ceux présents pendant la phase de sporulation ( $\sigma_E$  et  $\sigma_K$ ).

codant pour ces facteurs  $\sigma$  ont été clonés et séquencés ; ils codent respectivement pour des facteurs  $\sigma$  équivalents aux facteurs  $\sigma E$  et  $\sigma K$  de *Bacillus subtilis*. D'autres travaux ont permis de montrer que les ARNm transcrits à partir des gènes de type *cry1* ont une demi-vie (10 min) supérieure à la demi-vie moyenne des ARNm durant la sporulation (2-3 min). La relative stabilité de ces ARNm permet, en partie, d'expliquer le haut niveau de synthèse des protéines Cry. Il a été démontré que l'un des déterminants responsables de cette stabilité est une structure en tige et boucle localisée dans la région 3' non codante des transcrits (Wong & Chang, 1986). Jusqu'en 1994, tous les gènes *cry* étudiés se révélaient être sous le contrôle des facteurs  $\sigma$  spécifiques de la sporulation :  $\sigma E$  et  $\sigma K$ . En 1994, l'étude de la régulation du gène *cry3A* et notamment l'identification des régions de type -35 et -10 situées en amont du site de démarrage de la transcription révéla que la séquence nucléotidique de ces régions ne correspondait pas au consensus établi pour les promoteurs de type  $\sigma E$  et  $\sigma K$  et ressemblait, en fait, à celle des promoteurs reconnus par le facteur  $\sigma$  de phase végétative  $\sigma A$  (Agaisse & Lereclus, 1994a). Par la suite des mutants de sporulation ont été construits chez *Bt* : les gènes codant pour les facteurs  $\sigma E$ ,  $\sigma K$  ou pour la protéine Spo0A (facteur clé intervenant dans le déclenchement de la sporulation) ont été interrompus. L'étude de l'expression du gène *cry3A* réalisée à l'aide de fusions transcriptionnelles *cry3A' lacZ* chez les mutants  $\Delta sigE$ ,  $\Delta sigK$  et  $\Delta spoA$  a permis de montrer que la transcription du gène *cry3A* est bien indépendante des gènes régulateurs impliqués dans le processus de sporulation (Fig. 1), et qu'elle semble être sous le contrôle du facteur  $\sigma A$  de phase végétative (Agaisse & Lereclus, 1994b). L'activation en phase stationnaire de ce gène serait donc liée à la disparition d'un répresseur ou à l'apparition d'un activateur ; elle serait indépendante du processus de sporulation, mais spécifique de la phase stationnaire. D'autre part, il a récemment été montré qu'une région stabilisatrice, située 400 paires de bases en aval du promoteur du gène *cry3A*, permettait d'augmenter d'un facteur 10 la stabilité des transcrits. Il s'agit d'une séquence de type Shine-Dalgarno (GAAAGGAGG) qui n'intervient pas dans le démarrage de traduction et qui a été appelée STAB-SD (Agaisse & Lereclus, 1996).

## DES OUTILS POUR MANIPULER *Bt*

La mise au point, à partir de 1989, d'un système de transfert d'ADN efficace chez *Bt* par électroporation a ouvert de nouvelles voies pour améliorer le potentiel entomopathogène de *Bt*. Des vecteurs plasmidiques capables de se répliquer et de se maintenir de façon stable chez cette bactérie ont été construits et, plus récemment, des vecteurs à « recombinaison site-spécifique », faisant appel aux propriétés d'intégration et de recombinaison site-spécifique du transposon Tn4430 ont été mis au point (Baum *et al.*, 1996 ; Sanchis *et al.*,

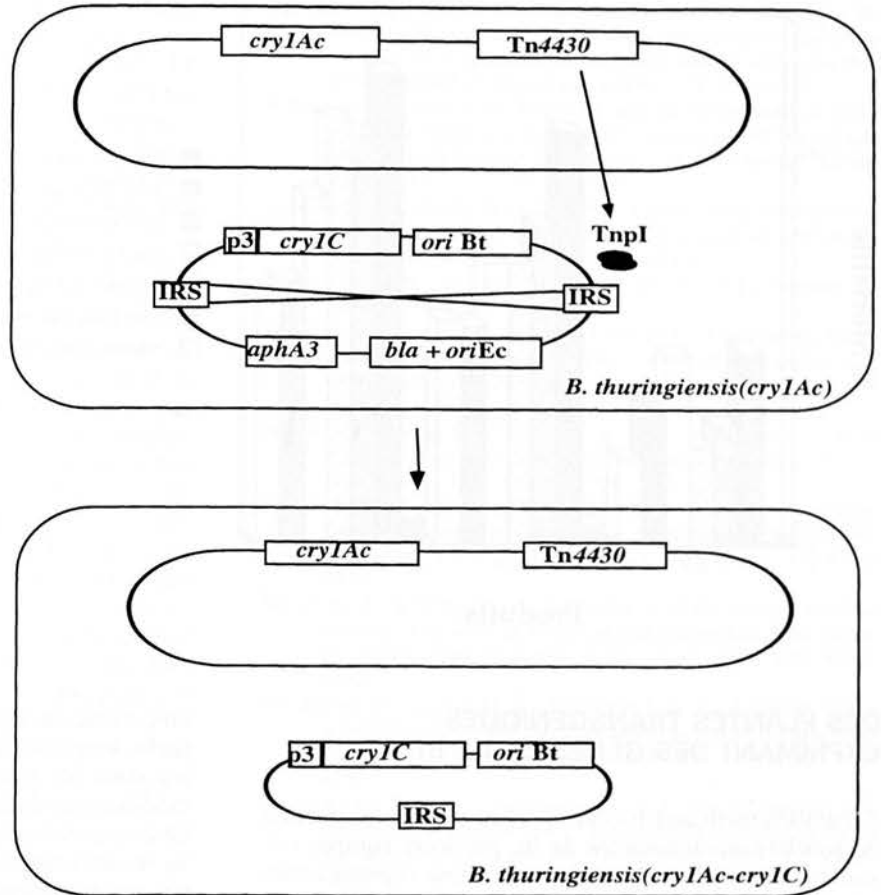
1997). Tn4430 est un transposon de *Bt* appartenant à la famille des transposons de classe II. La transposition des éléments de la classe II se déroule de la façon suivante : le produit primaire de transposition est un co-intégré dans lequel l'élément transposable est dupliqué en orientation directe de part et d'autre de la molécule donneuse. Cette réaction est catalysée par le produit du gène *tnpA*, la transposase. Le produit de co-intégration est ensuite résolu par recombinaison site-spécifique catalysée par une résolvase ou, dans le cas de Tn4430, par une intégrase (TnpI).

Le site de fixation reconnu par TnpI est une séquence située en amont du gène codant pour TnpI et appelée site IRS (Internal Resolution Sequence). Des vecteurs portant deux régions de 250 pb, contenant le site IRS fixant TnpI, placées en orientation directe de part et d'autre d'une séquence d'ADN que l'on désire éliminer, ont été construits (Fig. 2). L'introduction d'une telle construction dans une souche de *Bt* contenant le Tn4430 (et donc produisant TnpI) résulte en une excision de la séquence d'ADN située entre les sites IRS. Des deux molécules circulaires résultant de la recombinaison site-spécifique, seule celle qui porte l'origine de répllication provenant de *Bt* est capable de se répliquer et se maintient dans la souche. Afin d'éliminer des gènes désavantageux ou d'introduire de nouveaux gènes dans le chromosome bactérien ou sur des plasmides naturels de *Bt*, des vecteurs intégratifs thermosensibles ont également été construits (Bravo *et al.*, 1996). De tels plasmides, contenant une copie du gène *spo0A* ou *sigK* interrompue par le gène *aphA3*, conférant la résistance à la kanamycine, ont été introduits dans une souche de *Bt* par électroporation à température permissive (30° C). L'intégration du plasmide thermosensible dans le chromosome de *Bt* s'effectue par recombinaison homologue entre les régions situées en aval du gène *aphA3*, à l'issue de cultures successives des transformants en présence de kanamycine à température non permissive (37° C). Un second événement de recombinaison réciproque, cette fois entre les régions situées en amont du gène *aphA3*, conduit au remplacement des gènes *spo0A* ou *sigK* par leurs copies interrompues *spo0A' :aphA3* ou *sigK' :aphA3* et à l'excision du vecteur et de la copie intacte des gènes *spo0A* et *sigK*. Ces vecteurs ont permis par exemple d'intégrer par recombinaison homologue un gène de  $\delta$ -endotoxine directement sur un plasmide résident de *Bt* portant un gène de  $\delta$ -endotoxine de spécificité différente ou d'interrompre des gènes impliqués dans le processus de sporulation (comme *spo0A* ou *sigK*).

## DES SOUCHES RECOMBINANTES DE *Bt* PLUS PERFORMANTES

L'emploi de *Bt* comme biopesticide implique l'épandage d'importantes quantités de bactéries (recombinantes ou non) sous la forme d'un mélange de spores et de cristaux. Afin de répondre aux inquiétudes exprimées concernant les « risques » éventuels liés au transfert hori-

FIG. 2. — Construction *in vivo* d'une souche génétiquement modifiée de *Bt* à l'aide d'un vecteur à recombinaison site-spécifique. Un plasmide portant deux séquences IRS est introduit par transformation dans une souche de *Bt* dont un plasmide résident porte un gène *cryIAc* et le transposon Tn4430. La protéine TnpI, produit du gène *tnpI* porté par Tn4430, reconnaît spécifiquement les séquences IRS et catalyse un événement de recombinaison site-spécifique conduisant à la formation de deux molécules d'ADN circulaire. Celle qui contient l'origine de réplication fonctionnelle chez *Bt* et le gène *cryIc* nouvellement introduit sous le contrôle du promoteur du gène *cry3Aa* peut se répliquer et se maintient dans la cellule; l'autre molécule, contenant le réplicon d'*E. coli* et les marqueurs de résistance, est éliminée.



zontal de matériel génétique, nous avons construit des souches recombinantes de *Bt* ne contenant pas d'ADN étranger. Pour cela, les vecteurs à «recombinaison site-spécifique», précédemment décrits, ont été utilisés. Les séquences d'ADN que l'on désire éliminer, après transformation (comme par exemple une origine de réplication fonctionnelle chez les bactéries Gram négatif ou des gènes de résistance aux antibiotiques qui sont nécessaires aux étapes de clonage et de sélection chez *E. coli*), sont placées entre deux sites IRS et spécifiquement excisées *in vivo*. Des souches asporogènes (et par conséquent non viables) qui répondent quant à elles aux inquiétudes concernant la dissémination d'organismes recombinants dans l'environnement ont également été construites. De telles souches doivent être capables de produire d'importantes quantités de  $\delta$ -endotoxines; l'expression de la plupart des gènes *cry* étant contrôlée par des facteurs  $\sigma$  spécifiques de la sporulation, nous avons par conséquent utilisé le gène *cry3A* qui n'est pas un gène de sporulation. Il a donc été possible de surproduire la toxine Cry3A dans un mutant *spo0A* de *Bt*. Dans un tel mutant, la protéine s'accumule pour former un cristal qui, au lieu d'être libéré, reste dans la bactérie qui ne se lyse pas. L'utilisation du promoteur du gène *cry3A* nous a également permis d'augmenter la production de  $\delta$ -endotoxines chez *Bt* et de construire une souche de *Bt* présentant un

spectre d'activité élargi. En effet, le gène *cryIC* qui code pour une delta-endotoxine spécifiquement active contre *S. littoralis*, a été mis sous le contrôle du promoteur du gène *cry3A* et introduit dans une souche sauvage de *Bt* qui synthétise une  $\delta$ -endotoxine de type CryIAc très active contre *Ostrinia nubilalis*, la pyrale du maïs. La souche recombinante ainsi obtenue (Fig. 2) produit à la fois les toxines CryIC et CryIAc mais la quantité totale de  $\delta$ -endotoxines produites par la souche recombinante est augmentée d'un facteur 2 par rapport à la souche parentale (Sanchis *et al.*, 1996). Nous avons également construit un mutant asporogène de cette souche, appelé AGRO1, qui est bloqué à un stade tardif du processus de sporulation (mutant  $\Delta SigK$ ). Ce mutant est toujours incapable de produire des spores viables mais exprime d'importantes quantités de  $\delta$ -endotoxines CryIAc et CryIC. De plus, comme dans le cas de la souche  $\Delta spo0A$ , les  $\delta$ -endotoxines sont produites sous la forme d'inclusions qui restent encapsulées dans la bactérie qui ne se lyse pas, ce qui leur confère une protection accrue contre la dégradation par les UV (Sanchis *et al.*, 1999). L'activité de la souche AGRO1 utilisée à 20 g d'ingrédient actif par hectare (ai/ha) est comparable ou supérieure à celles des produits de synthèse, Agrimek, Decis ou Hostation, ou ceux à base de *Bt* (Delfin utilisé à 250 g ai/ha et Thuricide utilisé à 625 g ai/ha) auxquels elle a été comparée (Fig. 3).

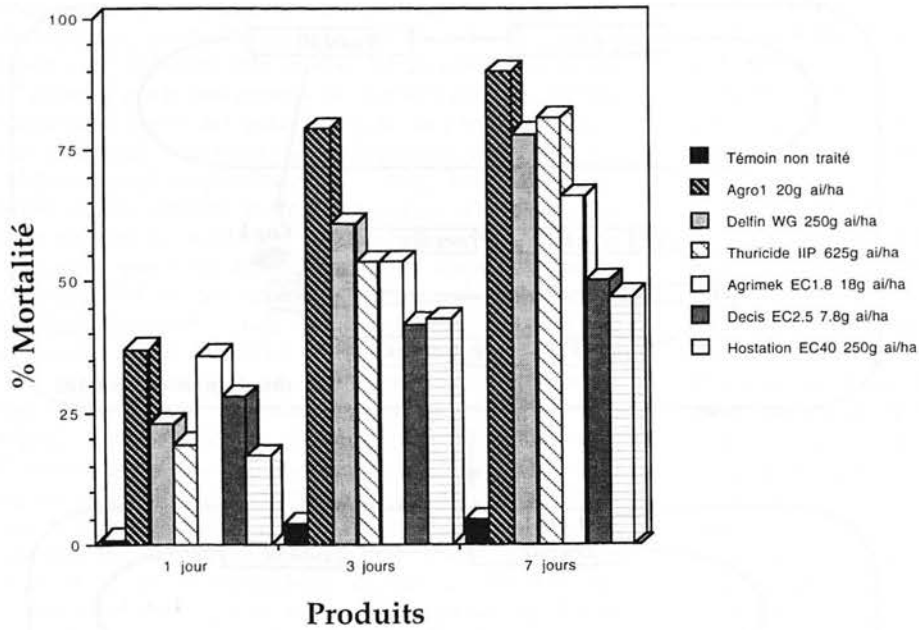


FIG. 3. — Activité de la souche AGRO1 sur *Plutella xylostella* (la teigne des crucifères) et comparaison avec d'autres insecticides.

## DES PLANTES TRANSGÉNIQUES EXPRIMANT DES GÈNES *cry* DE *Bt*

Parallèlement aux travaux portant sur la construction de souches recombinantes de *Bt*, plusieurs équipes travaillant dans le domaine de la transgénèse végétale entreprennent d'exploiter le potentiel insecticide de *Bt* en construisant des plantes génétiquement transformées exprimant des gènes *cry*. Un premier pas décisif fut accompli en 1987 par la société de biotechnologie Plant Genetic Systems qui réussit, pour la première fois, à transformer et faire exprimer chez le tabac le gène *cry1Ab* de *Bt* (Vaecck *et al.*, 1987). Les plants de tabac transformés avec la région codant pour la fraction toxique de la molécule étaient significativement protégés contre l'attaque des insectes. La technique de transformation utilisée était fondée sur le transfert du plasmide Ti d'*Agrobacterium*. Par la suite, cette méthode a permis d'introduire de l'ADN étranger dans de nombreuses autres plantes que le tabac ; toutefois, son application était restreinte à un nombre limité d'espèces, le plus souvent appartenant aux Dicotylédones. Le développement de nouvelles méthodes de transformation, telles que l'électroporation ou le bombardement de particules, a ensuite permis de transférer de l'ADN dans la plupart des plantes, y compris des Monocotylédones comme le maïs. Cependant, malgré l'utilisation de promoteurs forts, la production de toxines par les plantes était encore insuffisante pour envisager une utilisation agronomique efficace. Contrairement aux gènes de plantes, les gènes de *Bt* sont riches en bases A et T (66 %), ce qui ne correspond pas à un usage optimal des codons chez les plantes, et peut induire une instabilité des transcrits. Les régions riches en A + T peuvent être responsables d'épissages erronés ou à l'origine d'arrêts prématurés de la transcrip-

tion. Cette caractéristique s'est révélée être, en grande partie, responsable des problèmes d'expression des gènes *cry* dans les plantes (Perlak *et al.*, 1991). Ainsi, une modification de la séquence codante (sans modification de la séquence peptidique) des gènes *cry*, abaissant à 51 % le contenu en bases A et T, et l'élimination de séquences pouvant constituer des signaux potentiels de polyadénylation et des séquences ATTTA dans les régions riches en A + T, conduisirent à augmenter la production d'un facteur 100 ; plus de 100 ng de toxines étaient alors produites par mg de protéines totales. Cette stratégie a été menée avec succès dans de nombreux cas : le cotonnier (Perlak *et al.*, 1990), le riz (Fujimoto *et al.*, 1993) et le maïs (Kozziel *et al.*, 1993) ont ainsi été transformés avec des gènes *cry1*, et la pomme de terre avec un gène *cry3* (Adang *et al.*, 1993). Les plantes ainsi transformées produisent des quantités de toxines qui leur confèrent une excellente protection contre les insectes et une première génération de plantes (cotonnier, maïs et pomme de terre) exprimant les toxines insecticides de *Bt* a été commercialisée aux USA en 1996. Des plantes transgéniques de seconde génération sont maintenant en cours de développement. En particulier, il est envisagé de construire des plantes exprimant au moins deux gènes *cry* codant pour des toxines reconnaissant des récepteurs différents.

## CONCLUSION

L'un des principaux défis auxquels la recherche agronomique devra répondre au cours des prochaines années sera celui de permettre une amélioration de la qualité de la production agricole tout en préservant mieux l'environnement. La lutte contre les ravageurs des cultures res-

tera un élément essentiel de la productivité agricole mais il conviendra d'apporter des solutions moins polluantes aux problèmes posés par les insectes phytophages. Le succès et l'extension de l'utilisation de biopesticides plus respectueux de l'environnement et des plantes transgéniques rendues résistantes aux insectes phytophages dépendront de notre capacité à fournir des produits performants; ces produits devront, en outre, répondre aux inquiétudes exprimées concernant les risques éventuels liés à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés. Bien que *Bt* ait depuis longtemps montré son efficacité dans la lutte biologique contre les insectes, les recherches menées au cours de ces dernières années sur l'étude de la régulation de l'expression génétique chez *Bt* et la construction de nouveaux outils permettant de manipuler cette bactérie, ont permis la construction de souches recombinantes plus efficaces. Des souches de *Bt* asporogènes, possédant un spectre d'activité élargi et une plus forte toxicité, ont ainsi été construites. Ces souches produisent des cristaux insecticides qui restent encapsulés dans le compartiment de la cellule mère. L'avantage de telles souches est double : d'une part, éviter la dissémination de spores viables dans l'environnement, d'autre part, protéger les cristaux d'une dégradation trop rapide. Ce dernier point permet de répondre à la principale faiblesse des biopesticides à base de *Bt*, à savoir leur faible persistance dans l'environnement. Par ailleurs, les séquences d'ADN indésirables présentes sur les vecteurs ayant servi à construire ces souches recombinantes ont été éliminées à l'aide de nouveaux vecteurs à recombinaison site-spécifique. Des améliorations peuvent néanmoins encore être apportées. Il s'agit de construire des toxines chimères afin d'accroître leur activité ou par exemple de contourner la résistance d'une lignée d'insectes. A plus long terme, les travaux concernant *Bt* devraient s'orienter sur une étude du pouvoir pathogène de cette bactérie au sens large et notamment sur l'exploration des autres facteurs de virulence qu'elle produit et la recherche de nouvelles molécules insecticides. Cette stratégie devrait nous permettre de diversifier les outils de lutte biologique (souches bactériennes ou toxines) et de renforcer ou de compléter la gamme de produits insecticides respectueux de l'environnement à notre disposition. Enfin, l'utilisation à grande échelle de plantes transgéniques exprimant des gènes de toxines de *Bt* soulève de nouveaux problèmes d'ordre écologique; il conviendra donc de concevoir les méthodologies permettant de détecter l'apparition de populations d'insectes devenues résistantes aux toxines insecticides synthétisées par les plantes transgéniques, puis d'établir et d'évaluer sur le terrain des stratégies susceptibles de retarder l'apparition de la résistance et/ou de la contrôler.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adang M. J., Brody M. S., Cardineau G. *et al.*, The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.*, 1993, 21, 1131-1145.
- Agaisse H. & Lereclus D., Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIa* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *J. Bacteriol.*, 1994a, 176, 4734-4741.
- Agaisse H. & Lereclus D., Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.*, 1994b, 13, 97-107.
- Agaisse H. & Lereclus D., STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol. Microbiol.*, 1996, 20, 633-643.
- Angus T. A. A., Bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature*, 1954, 173, 54-56.
- Baum J. A., Kakefuda M. & Gawron-Burke C., Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 4367-4373.
- Bravo A., Agaisse H., Salamitou S. *et al.*, Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Gen. Genet.*, 1996, 250, 734-741.
- Brown K. L. & Whiteley H. R., Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 4166-4170.
- Brown K. L. & Whiteley H. R., Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.*, 1990, 172, 6682-6688.
- Crickmore N., Zeigler D. R., Feitelson J. *et al.*, Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62, 807-813.
- Fujimoto H., Itoh K., Yamamoto M. *et al.*, Insect resistant rice generated by introduction of a modified  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11, 1151-1155.
- Knight P. J. K., Crickmore N. & Ellar D. J., The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, 1994, 11, 429-436.
- Knowles B. H. & Dow J. A. T., The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action in the insect gut. *BioEssays*, 1993, 15, 469-476.
- Koziel M. G., Beland G. L., Bowman C. *et al.*, Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11, 194-200.
- Perlak F. J., Deaton R. W., Armstrong T. A. *et al.*, Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*, 1990, 8, 939-943.
- Perlak F. J., Fuchs R. L., Dean D. A. *et al.*, Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 88, 3324-3328.
- Sangadala S., Walters F. S., English L. H. *et al.*, A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin binding and Rb<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> efflux *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 10088-10092.
- Sanchis V., Agaisse H., Chaufaux J. *et al.*, Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of *cryIIIa* and a site specific recombination vector. *J. Biotechnol.*, 1996, 48, 81-96.
- Sanchis V., Agaisse H., Chaufaux J. *et al.*, A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 779-784.
- Sanchis V., Gohar M., Chaufaux J. *et al.*, Development and field performance of a broad spectrum non-viable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater

- potency and UV resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 4032-4039.
- Schnepf H. E., Wong H. C. & Whiteley H. R., The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis*: deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 6264-6272.
- Vadlamudi R. K., Weber E., Ji I. *et al.*, Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 5490-5494.
- Vaeck M., Reynaerts, A., Höfte H. *et al.*, Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 1987, 327, 33-37.
- Van Rie J., Jansens S., Hofte H. *et al.*, Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of insects. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 186, 239-247.
- Wong H. C., Schnepf H. E. & Whiteley H. R., Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 1960-1967.
- Wong H. C. & Chang S., Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, 83, 3233-3237.
-