L'Identification des Toxines de Bacillus Thuringiensis Actives Contre *Perileucoptera coffeella*

O. GUERREIRO FILHO[1], P. DENOLF[2], R. FRUTOS[3], M. PEFEROEN[2], A. B. ESKES[4]

[1]Seção de Genética, Instituto Agronômico de Gampinas (Brésil), boursier de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Adresse actuelle: CIRAD-CP, BP 5035, 34032, Montpellier Cedex 01, France
[2]Plant Genetic Systems, J. Plateaustraat, 22, B-9000, Gand, Belgique
[3]CIRAD-BIOTROP/IGEPAM
[4]CIRAD-CP

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a soil bacterium characterized by the production of a parasporal inclusion body, the crystal, during sporulation. Inclusion bodies are made of specific insecticidal proteins. Protoxins are released from solubilized crystals and must be activated by midgut proteases to be toxic. The activated toxin binds to a specific receptor located at the surface of the membrane of gut epithelial cells and after integration into the cell membrane leads to the formation of a pore. Receptors at the external side of the gut epithelial cells membrane are essential factors for determining the specificity of **Bt** endotoxins to Lepidoptera. The *in vivo* toxicity of crystal proteins is determined by the recognition of the receptors on microvilli of the gut tissue. This affinity can be evaluated through an immunocytochemical approach. This technique was used to determine the presence of specific binding between CryI type toxins and gut tissue of the coffee leaf miner, *Perileucoptera coffeella*. CryIA(a), CryIA(b) and CryID did not bind to midgut microvilli of *P. coffeella*. However, affinity was observed with CryIA(c), CryIB and Cry IE all over the gut. CryIA(c), CryIB and CryIE might be considered as potentially active and the corresponding genes could be used for genetic transformation of coffee. These results are currently been verified by bioassays.

RÉSUMÉ

Bacillus thuringiensis est une bactérie du sol caractérisée par la production d'un corps d'inclusion parasporal, le cristal, durant la sporulation. Ces corps d'inclusions sont constitués de protéines présentant une activité insecticide spécifique. Les cristaux libèrent après dissolution des protoxines qui requièrent une activation par des protéases du tube digestif de l'insecte. La toxine activée se lie à un récepteur spécifique présent à la surface membranaire des cellules de l'épithélium intestinal et après internalisation dans la membrane génère la formation d'un pore. Les récepteurs présents à la surface externe de la membrane des cellules épithéliales de l'intestin sont des éléments clés pour la détermination de la spécificité des endotoxines de Bt pour les Lépidoptères. La toxicité d'une protéine du cristal est étroitement liée à la reconnaissance préalable d'un récepteur au niveau de microvillosités apicales du tissus intestinal. Cette affinité peut être mise en évidence par une analyse immunocytochimique. Cette technique a été employée pour déterminer la présence de liaisons spécifiques entre différentes toxines de type CryI et le tissus intestinal de la mineuse des feuilles du caféier, *Perileucoptera coffeella*. Les toxines CryIA(a), CryIA(b) et CryID, ne se sont pas liées aux microvillosités apicales. Des réponses positives ont été observées avec les toxines CryIA(c), CryIB et CryIE sur la totalité de la longueur du tube digestif. Les toxines

CryIA(c), CryIB e CryIE, peuvent être considérées comme potentiellement actives et les gènes correspondant pourraient être utilisés dans un programme de transformation génétique du caféier. Cependant, ces résultats doivent être confirmés et affinés. L'activité toxique de ces protéines est actuellement vérifiée et quantifiée par des tests de toxicité sur insecte.