

Comparaison de l'expression homologue du gène *vip3Aa16* chez *Bacillus thuringiensis* sous le contrôle de différents promoteurs

S. Sellami*, M. Cherif, L. Abdelkefi-Mesrati, S. Tounsi, K. Jamoussi

Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes, Equipe des Biopesticides, Centre de Biotechnologie de Sfax, B.P. "1177" 3018. Sfax, Tunisie.

*Corresponding author: sellamisameh@gmail.com ; Tel.: +216 74 440453; Fax: +216 74 440453

ARTICLE INFO

Article History:

Received : 09/03/2016
Accepted : 30/07/2016

Key Words:

Vip3;
Vegetative promotor;
B. thuringiensis;
E. kuehniella.

Mots clés:

Vip3;
promoteur végétatif;
B. thuringiensis;
E. kuehniella.

ABSTRACT/RESUME

Abstract: *Bacillus thuringiensis* produces the *vip3* genes during the vegetative growth phase which are active against lepidopteran larvae. During this study, the *vip3Aa16* was cloned under the control of different promoters in order to compare its expression and try to improve it. In fact, *vip3Aa16* was cloned under the control of 3 promoters in the same time (the *spo* promoters and the vegetative promotor *Prv*) (*pHT-spo-Prv-vip3Aa16*). The *vip3Aa16* was also cloned under the control of only the vegetative promotor *Prv* (*pHT-Prv-vip3Aa16*). Western blot analyses showed that *Vip3Aa16* protein was detected during the vegetative phase but not during the sporulation phase, proving the expression of *vip3Aa16* from the *Prv* and not from the *spo* promoters. Bioassays against *Ephestia kuehniella* revealed that the supernatant of BUPM106 (*pHT-Prv-vip3Aa16*) and BUPM106 (*pHT-spo-Prv-vip3Aa16*) strains were toxic and caused 30 % of mortality after 5 days.

Résumé: *Bacillus thuringiensis* synthétise au cours de la phase végétative, les protéines de types *Vip3* actifs sur les lépidoptères. Au cours de ce travail, nous avons cloné le gène *vip3Aa16* sous le contrôle de différents promoteurs au vue de comparer l'expression et de chercher à l'améliorer. En effet, *vip3Aa16* a été cloné sous le contrôle de trois promoteurs à la fois (les deux promoteurs sporulation-dépendants *spo* et le promoteur végétatif *Prv*) (*pHT-spo-Prv-vip3Aa16*). Nous avons également cloné *vip3Aa16* uniquement sous le contrôle de son promoteur végétatif *Prv* (*pHT-Prv-vip3Aa16*). L'analyse par Western blot a montré la détection de *Vip3Aa16* pendant la phase végétative mais non pas durant la phase de sporulation, témoignant l'expression de *vip3Aa16* à partir de *Prv* et la faible ou l'absence d'expression à partir des promoteurs *spo*. Les tests de toxicité contre les larves d'*Ephestia kuehniella* a révélé que le surnageant des cultures des souches BUPM106 (*pHT-Prv-vip3Aa16*) et BUPM106 (*pHT-spo-Prv-vip3Aa16*) étaient toxiques et ont causé une mortalité de l'ordre de 30 % au bout de 5 jours.

I. Introduction

Les pesticides chimiques ont été amplement utilisés pour lutter contre les insectes ravageurs [1].

Cependant, ces derniers présentent plusieurs inconvénients tels que : la non spécificité, l'apparition d'insectes mutants résistants aux pesticides chimiques et la pollution de

l'environnement [2]. C'est pour toutes ces raisons qu'une alternative des pesticides chimiques a été utilisée qui réside dans l'utilisation des Biopesticides. La bactérie *B. thuringiensis* et les produits qui en dérivent sont les plus utilisés comme bioinsecticides à cause de leurs actions spécifiques et leurs innocuités pour l'Homme et les animaux. *B. thuringiensis* est un bacille Gram positif, aérobic et sporulé. Il est caractérisé par la production des cristaux (δ -endotoxines) fortement pathogènes pour certains insectes. Ces cristaux sont formés par l'association de plusieurs protéines qui ont une propriété insecticide sur les lépidoptères et les coléoptères [3]. De même, certaines souches de *B. thuringiensis* ont la capacité de produire d'autres protéines nommées "Vip" (Vegetative Insecticidal Proteins), synthétisées et secrétées dans le milieu de culture lors de la phase de croissance végétative de la bactérie [4]. Ces protéines sont classées en 3 groupes : Vip1, Vip2 et Vip3 et elles sont considérées comme une nouvelle classe de protéines à activités insecticides [5]. Les protéines Vip1 et Vip2 sont des protéines binaires qui ont une activité toxique pour les coléoptères. En effet, les protéines Vip1 se fixent sur la membrane de l'intestin moyen de l'insecte pour permettre l'entrée des protéines Vip2 qui vont former plusieurs pores lytiques, d'où la mort de l'insecte. Alors que les protéines Vip3, elles codent pour une seule protéine (80-90 kDa) toxiques pour les lépidoptères [6, 7]. Ces protéines agissent en détruisant les cellules de l'intestin moyen de la larve d'insecte atteinte par ces toxines, ce qui aboutit à sa mort [8].

Afin d'améliorer l'activité insecticide et d'élargir le spectre d'action des différentes protéines insecticides de *B. thuringiensis*, les chercheurs se sont orientés vers la mutagenèse classique réalisée sur la bactérie entière [9], ou bien vers la construction de gènes hybrides composés d'éléments régulateurs de l'expression et de la traduction et de séquences codantes provenant de plusieurs gènes, ainsi que la conception de protéines chimériques suite à la fusion de différentes séquences codantes provenant de différents gènes afin d'obtenir de nouvelles propriétés. A titre d'exemple, un échange du domaine II de Cry1Ba avec celui de Cry1Ia a donné naissance à une nouvelle protéine Cry1Ba/1Ia/1Ba avec un large spectre d'action sur *Leptinotarsa decemlineata* (Coléoptère). La substitution du promoteur végétatif du gène *vip3Aa7* par le promoteur sporulation indépendant *pro3A* du gène *cry3A* [10, 11] a amélioré la production de la nouvelle protéine Vip3Aa7 d'environ 3,2 fois plus que celle native chez une souche de *B. thuringiensis* acristallifère et a conféré par la suite un taux de toxicité plus élevé d'environ 10 fois vis-à-vis de *Spodoptera exigua* [12].

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposés de comparer l'expression et essayer de l'améliorer

via le clonage du gène *vip3Aa16* sous le contrôle des trois promoteurs (les promoteurs *spo* et le promoteur végétatif *Prv*) chez *B. thuringiensis* et de tester les protéines Vip3Aa16 ainsi produites sur *E. kuehniella*.

II. Materials and methods

II.1. Souches Bactériennes et Conditions de Culture

Les bactéries *B. thuringiensis* BUPM95 (*vip3Aa16* (+)) et BUPM106 (*vip3Aa16* (-)) ont été isolées à partir du sol au Laboratoire des Biopesticides du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) [13, 4]. La souche Top10 d'*Escherichia coli* (Invitrogen, USA) a été utilisée comme cellule hôte.

Le milieu LB a été utilisé pour la croissance de *B. thuringiensis* à 30 °C et *E. coli* à 37 °C [14]. La concentration de l'ampicilline utilisée pour la croissance des souches recombinantes d'*E. coli* est de 60 µg/ml, alors que la concentration de l'érythromycine utilisée pour la croissance des souches recombinantes de *B. thuringiensis* est de 50 µg/ml [6].

II.2. Construction des plasmides recombinants

II.2.1. Construction du plasmide pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*

Nous disposons au laboratoire d'un plasmide appelé pHT-*spo-cry1Ia* où le gène *cry1Ia* est sous le contrôle des promoteurs *spo*, responsable de l'expression des taux élevés de protéines Cry [15]. Nous avons digéré le plasmide pHT-*spo-cry1Ia* par *ClaI* et *EcoRI* afin de substituer le gène *cry1Ia* par le gène *vip3Aa16* avec son promoteur végétatif. En effet, nous avons amplifié le gène *vip3Aa16* (*Prv* + ORF = 2,55 kb) par PCR à partir de la souche BUPM 95 en se servant des amorces PS33 et PS14 (Fig. 1). Nous avons conçu nos amorces de sorte qu'elles nous apportent les sites de restriction *ClaI* à l'extrémité 5' et les sites *BglII*, *XmaI* et *EcoRI* ainsi qu'un codon STOP à l'extrémité 3' (Tableau 1). Les produits de la ligation ont été transférés aux bactéries compétentes d'*E. coli* souche Top10.

II.2.2. Construction du plasmide pHT-*Prv-vip3Aa16*

Le plasmide pHT-*spo-Prv-vip3Aa16* (Fig. 1) a été digéré au niveau des sites (*ClaI* et *XhoI*) provenant du vecteur ce qui a donné 2 fragments d'ADN de 1 kb (séquence des promoteurs *spo*) et 9,6 kb (vecteur pHT contenant le gène *vip3Aa16* avec son promoteur végétatif). Les fragments de 9,6 kb purifiés du gel d'agarose ont été traités par la Taq DNA Polymerase pour rendre les extrémités de

l'ADN franchises au lieu de 5' sortantes. Les produits de la ligation ont été transférés aux bactéries compétentes d'*E. coli* souche Top10.

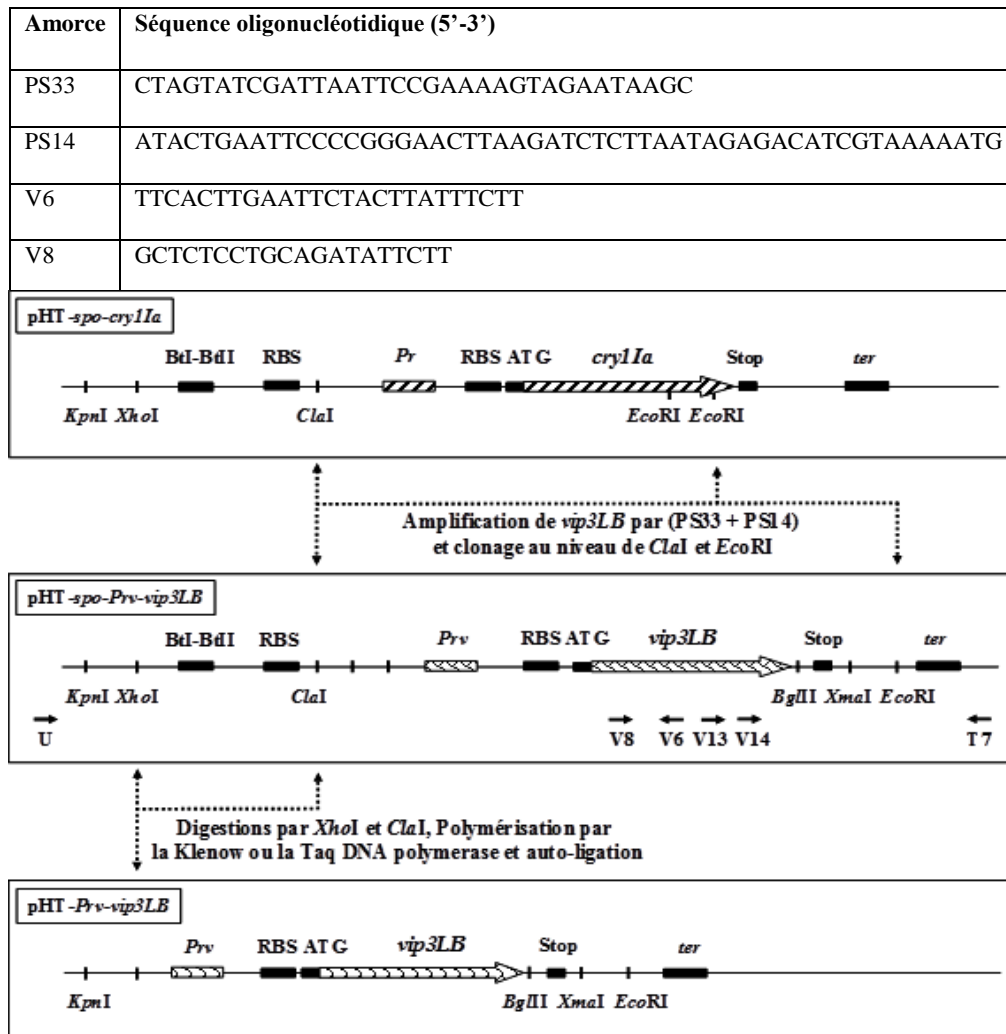


Figure 1. Stratégie du clonage dans pHT de vip3Aa16 en aval des 3 promoteurs: les deux promoteurs (spo) et de son promoteur végétatif (Prv), puis en aval de (Prv) uniquement. Le gène vip3Aa16 a été cloné sous le contrôle des promoteurs (spo)-(Prv) (plasmide pHT-spo-Prv-vip3Aa16) et (Prv) (plasmide pHT-Prv-vip3Aa16) à partir de pHT-spo-cryIIa. La transcription de vip3Aa16 serait assurée pendant la phase exponentielle (promoteur Prv) et la phase de sporulation (promoteurs spo).

II.3. Electroporation des souches de *B. thuringiensis*

Les bactéries compétentes de *B. thuringiensis* ont été préparées selon [6]. Brièvement, une culture de 50 ml de LB liquide est inoculée par une préculture de la souche BUPM106, puis incubée à 30°C et sous une agitation de 200 rpm jusqu'à atteindre une valeur de DO (600 nm) comprise entre 0,4 et 0,6. Après une incubation de 10 min dans la glace, cette

Prv-vip3Aa16 et pHT-Prv-vip3Aa16 dans une cuve d'électroporation (BIORAD) pré-refroidie, puis soumise au choc électrique en utilisant « Gene Pulser » de BIORAD. Ensuite, la suspension est diluée dans 1,2 ml de LB et incubée pendant 1 h à 30°C sous une agitation de 200 rpm, puis étalée sur un milieu sélectif LB-Em et incubés pendant une nuit à 30°C.

II.4. Concentration des protéines par précipitation au TCA

Des échantillons de 10 ml des cultures totales des souches recombinantes de *B. thuringiensis* ont été prélevés puis centrifugés 10 min à 5000 rpm et à 4°C dans des tubes Falcon. Ensuite, les surnageants ont été récupérés dans 1 ml de TCA 100% et incubés 30 min dans la glace dans le but de précipiter les protéines. Par la suite, les surnageants ont été centrifugés 20 min à 7000 rpm et à 4°C. Sur les culots récupérés, on ajoute 200 µl du tampon de dépôt des protéines (1X), puis on ajoute quelques microlitres de NaOH (5N) pour la neutralisation. Les échantillons de protéines précipitées ont été solubilisés puis chauffés 5 min à 100°C pour compléter la dénaturation des protéines.

II. 5. Analyse des échantillons par Western blot

Les échantillons de protéines précipitées ont été migrés au niveau d'un gel SDS-PAGE dont le pourcentage est de 9% [16]. Après l'électrophorèse, le gel a été transféré sur une membrane "Hybond C+" comprise entre 2 papiers Wathman imbibés avec le tampon de transfert pendant 1 h et sous un champ électrique de 15 V. Après le transfert, la membrane a été lavée au PBS 1×, saturée avec la solution de saturation (PBS 1×, 4 % lait écrémé) pendant 30 min à température ambiante et sous agitation, puis incubée avec l'anticorps anti-Vip3Aa16 pendant 2 h sous agitation et à température ambiante. Ensuite, la membrane a été lavée 3 fois pendant 15 min dans le tampon (PBS 1×, lait écrémé 4 %) et hybridée avec l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Biorad) pendant 1 h. La révélation se fait avec le kit ECL+ selon les instructions du fournisseur (Amersham). Un film Kodak Biomax est exposé puis développé à l'obscurité [6].

II. 6. Test de toxicité de *B. thuringiensis* exprimant Vip3Aa16 sur les larves de la pyrale de farine *E. kuehniella*

Le test de toxicité est réalisé sur des larves d'insectes d'*E. kuehniella* (teigne de la farine) appartenant à l'ordre des Lépidoptères [6]. Un volume de 700 µl des surnageants de cultures des souches BUPM106 (pHT-*Blue*), BUPM106 (pHT-Prv-*vip3Aa16*) et BUPM106 (pHT-spo-Prv-*vip3Aa16*) ont été ajoutés à 1 g de semoule dans une boîte de pétri. Nous avons utilisé la souche BUPM95 de *B. thuringiensis* comme témoin positif. Après séchage de la semoule pendant quelques heures, nous avons procédé à son broyage

au mortier puis à sa désintégration. Par la suite, dix larves au même stade de développement ont été ajoutées dans chaque boîte. La mortalité de chaque lot de 10 larves a été suivie pendant 5 jours. Pour des nécessités d'analyse statistique, le test de chaque échantillon est réalisé en présence de 10 larves par boîte de pétri et répété 3 fois.

III. Results and discussion

III. 1. Vérification des constructions pHT-spo-Prv-*vip3Aa16* et pHT-Prv-*vip3Aa16*

L'analyse du plasmide pHT-spo-Prv-*vip3Aa16* a été vérifiée par les digestions enzymatiques via (*KpnI* + *EcoRI*) qui génère des fragments d'ADN de 3,5 kb (spo + Prv + *vip3Aa16*) et 7,1 kb (vecteur), mais également par des amplifications PCR en utilisant les amorces (V8 + V6) pour amplifier une région interne de 0,8 kb dans *vip3Aa16* (Tableau 1). Fig. 2 a confirmé l'exactitude du plasmide recombinant pHT-spo-Prv-*vip3Aa16* de taille 10,6 kb. D'autre part, l'analyse du plasmide pHT-Prv-*vip3Aa16* a été réalisée par des digestions par (*KpnI* + *EcoRI*). Cette digestion génère des fragments d'ADN de taille 2,5 kb (Prv + *vip3Aa16*) et 7,1 kb (vecteur).

III. 2. Expression Homologue de *vip3Aa16* chez *B. thuringiensis* et toxicité via à vis le lépidoptère *E. kuehniella*

Notre objectif est l'évaluation de l'expression de *vip3Aa16* à partir des plasmides pHT-spo-Prv-*vip3Aa16* et pHT-Prv-*vip3Aa16* chez la souche BUPM 106 (*vip3-*) à travers l'accumulation de la protéine Vip3Aa16 chez cette souche recombinante. Pour ce faire, les plasmides pHT-spo-Prv-*vip3Aa16*, pHT-Prv-*vip3Aa16* et pHT-*Blue* ont été transférés à la souche sauvage BUPM 106 de *B. thuringiensis* par électroporation. La présence des plasmides pHT-spo-Prv-*vip3Aa16* et pHT-Prv-*vip3Aa16* chez les clones recombinants a été vérifiée suite à l'extraction de leurs ADN plasmidiques et l'amplification par PCR de fragments d'ADN de *vip3Aa16* via les amorces V6+V8(fig.3).

Des aliquotes récupérées au cours du temps (5h, 8h, 12h, 24h, 33h, 48h et 72h) à partir des cultures BUPM 106 (pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*), BUPM 106

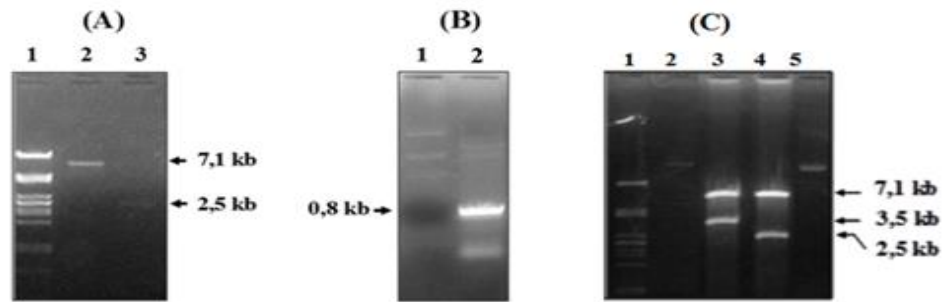


Figure 2. Construction et vérification des plasmides pHT-spo-Prv-vip3Aa16 et pHT-Prv-vip3Aa16

A) Clonage de (*Prv* + *vip3Aa16*) dans pHT-*spo-cry5*. λ /PstI (11,5 ; 5,07 ; 4,5 ; 2,83 ; 2,55 ; 2,45 ; 2,14 ; 1,98 ; 1,7 ; 1,15 ; 1,09 ; 0,80 ; 0,51 ; 0,46 ; 0,44 ; 0,33 ; 0,24 kb) (1) pHT-*spo-cry11a* digéré par *Cla*I et *Eco*RI et dépourvu de *cry11a* (2) Fragments d'ADN amplifiés par PCR en utilisant (PS33+PS14) et correspondant à (*Prv* + *vip3Aa16*) (3). **B)** Amplification par PCR via les amorces (V8 + V6) en utilisant l'ADN de pHT-*spo-Prv-vip3Aa16* (2). **C)** pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*: natif (2), digéré par (*Kpn*I + *Eco*RI) (3). pHT-*Prv-vip3Aa16*

(pHT-*Prv-vip3Aa16*) nous ont servi pour précipiter (35x) les protéines des surnageants de culture au TCA. L'analyse par Western blot (anticorps anti-Vip3Aa16) (fig. 4) a montré que la protéine Vip3Aa16 est présente chez les souches BUPM106 (pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*) et BUPM106 (pHT-*Prv-vip3Aa16*) au cours de la phase exponentielle à 8 et 12 h par comparaison avec le témoin négatif BUPM106 (pHT-*Blue*).

Vip3Aa16 n'est pas détectée dans les surnageants de culture des 3 souches recombinantes au cours de la phase stationnaire. En particulier, le plasmide pHT-*spo-Prv-vip3Aa16* qui porte les promoteurs sporulation dépendants (*spo*) en amont de (*Prv* + *vip3Aa16*) ne semble pas jouer un rôle significatif dans l'expression de *vip3Aa16* au cours de la phase stationnaire. Malgré que les deux promoteurs *spo* utilisés sont responsables de la synthèse de taux élevés de la protéine sauvage Cry1A [17, 18]. Ceci est probablement dû au fait que l'expression à partir de (*spo*) n'est pas efficace à cause de la présence de (*Prv*) localisé en aval ou bien au fait que l'ARNm produit par (*spo*) n'est pas stable.

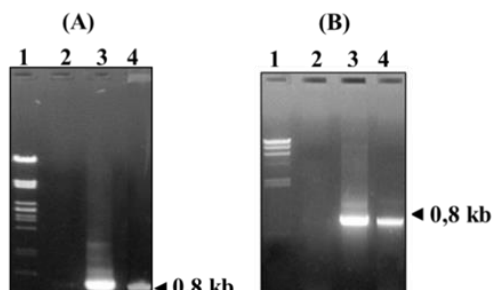


Figure 3. Amplification des plasmides pHT-*spo-Prv-vip3Aa16* et pHT-*Prv-vip3Aa16* chez *B. thuringiensis* par PCR via les amorces (V8 + V6). 2: Témoin négatif (sans ADN) 3: Témoin positif (souche sauvage *vip3*(+)). (A) 1 : λ /PstI. 4 : de pHT-*spo-Prv-vip3Aa16* ; (B) 1 : λ /HindIII. 4 : pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*

Nous constatons donc le rôle du promoteur (*Prv*) dans l'expression homologue de *vip3Aa16* pendant la phase végétative et la production de Vip3Aa16. Ainsi, dans des études ultérieures, une électroporation de ces deux plasmides dans une souche de *B. thuringiensis* (*vip3*(+)) peut produire des quantités très importantes de cette toxine et peut

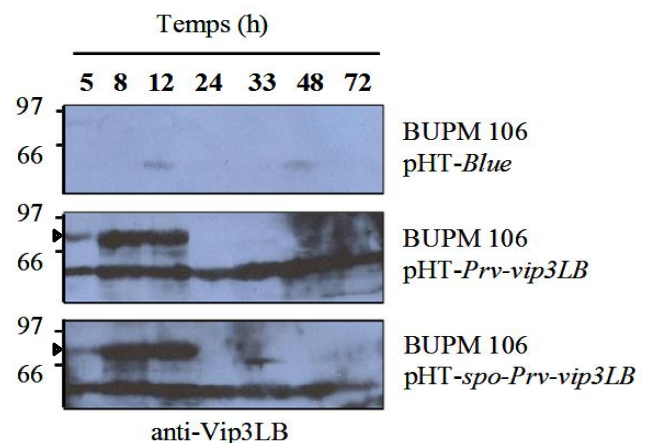


Figure 4. Western-blot des extraits protéiques concentrés des surnageants de culture de BUPM106 (pHT-*Blue*), BUPM106 (pHT-*Prv-vip3Aa16*) et BUPM106 (pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*). 5, 8, 12, 24, 33, 48 et 72 : âges des cultures en heures. Les flèches montrent la présence de la protéine Vip3Aa16.

Dans le cadre de l'investigation des protéines Vip3, un groupe de chercheurs a montré que la protéine Vip3Aa7 peut être relocalisée dans la cellule mère de *B. thuringiensis* tout en utilisant les promoteurs spo du gène cry1Ac [17]. Un autre type de substitution a été également réalisé en fusionnant les promoteurs sporulation dépendants spo du gène cry1Aa avec le gène *vip3Aa9* afin de sur produire la protéine correspondante dans *B. thuringiensis* et en vue de l'obtenir sous forme d'inclusions [19].

Les tests de toxicité contre les larves d'*E. kuehniella* a révélé que le surnageant des cultures des souches BUPM106 (pHT-Prv-*vip3Aa16*) et BUPM106 (pHT-spo-Prv-*vip3Aa16*) étaient toxiques et ont causé un pourcentage de mortalité de l'ordre de 30 % au bout de 5 jours. Cette toxicité était comparable à celle du témoin positif utilisé.

IV. Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons réussi à cloner le gène *vip3Aa16* sous le contrôle des trois promoteurs : son promoteur végétatif (*Pvr*) et les deux promoteurs sporulation dépendants *spo*, et également sous le contrôle de (*Pvr*) uniquement. Les deux plasmides recombinants pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*, pHT-*Prv-vip3Aa16* ainsi que pHT-*Blue* ont été transférés à la souche BUPM 106 (*vip3⁻*) de *B. thuringiensis*. La protéine Vip3Aa16 entière a été détectée parmi les protéines concentrées des surnageants de culture de BUPM 106 recombinante au cours de la phase exponentielle, indiquant l'expression à partir du promoteur végétatif (*Pvr*). En revanche, Vip3Aa16 n'a pas été détectée au cours de la phase stationnaire, ce qui signifierait la faible ou l'absence d'expression à partir des promoteurs *spo*. Ceci nécessiterait, en perspectives, la comparaison des quantités d'ARNm correspondant à *vip3Aa16* et produits par BUPM106 (pHT-*spo-Prv-vip3Aa16*), BUPM106 (pHT-*Prv-vip3Aa16*), et une souche de *B. thuringiensis* sauvage (*vip3⁺*). Les tests de toxicité ont montré que Vip3Aa16 synthétisée à partir des plasmides recombinants était toxique vis-à-vis de la pyrale de la farine *E. kuehniella*.

V. References

1. Popp, J., Petö, K., Nagy, J. 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustainable Dev.* 33: 243-255.
2. Rice, P.J., Arthur, E.L., Barefoot, A.C. 2007. Advances in Pesticide Environmental Fate and Exposure Assessments. *J. Agr. Food Chem.* 55: 5367-5376.
3. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dan, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
4. Sellami, S., Zghal, T., Cherif, M., Zalila-Kolsi, I., Jaoua, S., Jamoussi, K. 2013. Screening and identification of a *Bacillus thuringiensis* strain S1/4 with large and efficient insecticidal activities. *J. Basic Microbiol.* 52: 1-10.
5. Estruch, J.J., Yu, C.G., Warren, G.W., Desai, N.M., Koziel, M.G., Nye, G.J. 1999. Class of proteins for the control of plant pests. Patent US-5877012.
6. Sellami, S., Jamoussi, K., Dabbeche, E., Jaoua, S. 2011. Increase of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxicity against lepidopteron larvae by homologous expression of the *vip3LB* gene during sporulation stage. *Curr. Microbiol.* 63 : 289-294.
7. Sellami, S., Cherif, M., Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S., Jamoussi, K. 2015. Toxicity, activation process, and histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 on *Tuta absoluta*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175: 1992-1999.
8. Abdelkefi-Mesrati, L., Boukedi, H., Dammak-Karray, M., Sellami-Boudawara, T., Jaoua, S., Tounsi, S. 2011. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 250-254.
9. [9] Ghribi, D., Zouari, N., Jaoua, S. 2004. Improvement of bioinsecticides production through mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* by UV and nitrous acid affecting metabolic pathway and/or delta-endotoxin synthesis.
10. Agaisse, H., Lereclus, D. 1994 a. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIA toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13: 97-107.
11. Agaisse, H., Lereclus, D. 1994 b. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIIA toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. *J. Bacteriol.* 176: 4734-4741.
12. Zhu, C., Ruan, L., Peng, D., Yu, Z. and Sun, M. 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subs *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 109-114.
13. Mesrati, A.L., Tounsi, S., Jaoua, S. 2005. Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 353-358.
14. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning. In A laboratory manual, 2nd edn; ColdSpring: Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
15. Tounsi, S., Zouari, N., Jaoua, S. 2003. Cloning and study of the expression of a novel cryIIa-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 23-28.
16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
17. Arora, N., Selvapandiyar, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R.K. 2003. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 158-162.
18. Song, R., Peng, D., Yu, Z., Sun, M. 2008. Carboxy-terminal half of Cry1C can help vegetative insecticidal protein to form inclusion bodies in the mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 647-654.
19. Wong, H.C., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R. 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 258: 1960-1967.

Please cite this Article as:

Sellami S., Cherif M., Abdelkefi-Mesrati L., Tounsi S., Jamoussi K., *Comparaison de l'expression homologue du gène vip3Aa16 chez Bacillus thuringiensis sous le contrôle de différents promoteurs*, *Algerian J. Env. Sc. Technology*, 2:2 (2016) 195-201