

**DÉPISTAGE DE L'ORIGINE DE LA TOXINE CRY1AB
DE *BACILLUS THURINGIENSIS*
TROUVÉE DANS L'ENVIRONNEMENT**

Rapport ST-226

Dépistage de l'origine de la toxine Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* trouvée dans l'environnement

Mélanie Douville et François Gagné
Recherche sur les écosystèmes aquatiques

COMMENTAIRES DES LECTEURS

Veillez adresser vos commentaires sur le contenu du présent rapport au Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Environnement Canada – Région du Québec, 105, rue McGill, 7^e étage, Montréal (Québec), H2Y 2E7.

On devra citer la publication comme suit :

Douville, M. et F. Gagné (2005). *Dépistage de l'origine de la toxine Cry1Ab de Bacillus thuringiensis trouvée dans l'environnement*. Environnement Canada – Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-226, 62 pages.

Publié avec l'autorisation du ministre de l'Environnement

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada 2005

N^o de catalogue En 152-1/226-2003F

ISBN 0-662-71058-4

Perspective de gestion

Ce rapport porte sur le développement méthodologique nécessaire pour suivre la contamination environnementale des produits de biotechnologie, notamment les protéines et les gènes. Une attention particulière a été apportée au suivi de la contamination de l'environnement aquatique par la protéine Cry1Ab à proximité de champs où l'on cultive du maïs génétiquement modifié pour exprimer Cry1Ab. Une approche est aussi proposée pour identifier la source de contamination (bactéries ou maïs génétiquement modifié) de cette protéine dans l'environnement. Ce projet a été subventionné par le groupe de Gestion environnementale de la biotechnologie pour la réglementation et la recherche (GEBRR, Environnement Canada).

Management Perspective

This report presents the methodological development and initial results of a study on the release of biotechnology products (proteins and genes) in the environment. Emphasis was placed on the contamination of the aquatic environment near genetically-modified corn expressing Cry1Ab. An approach is also proposed to track the source (bacterial or from genetically-modified corn) of Cry1Ab in the environment. This project was funded by the Environmental Management of Biotechnology for Regulation and Research (EMBRR, Environment Canada).

Remerciements

Nous désirons remercier MM. Yves Castonguay, Jean-Charles Côté et Serge Laberge d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Sainte-Foy et à Saint-Jean-sur-Richelieu (Québec) pour leurs conseils scientifiques et techniques au sujet du projet, MM. Luke Masson et Alberto Mazza de l'Institut de recherche en biotechnologie pour leurs conseils utiles sur les cultures et les méthodes de purification de la toxine de *Bacillus thuringiensis*. Cette étude a été subventionnée par le groupe de Gestion environnementale de la biotechnologie pour la réglementation et la recherche (GEBRR, Environnement Canada).

Résumé

La pulvérisation de *Bacillus thuringiensis* (Bt) et les cultures d'organismes génétiquement modifiés sont actuellement utilisées en agriculture pour contrôler les infestations d'insectes ravageurs. L'utilisation de Bt et de maïs transgénique peut potentiellement mener à un enrichissement de la toxine Cry1Ab dans l'environnement, tant aquatique que terrestre. Le but de cette étude consiste à quantifier la toxine Cry1Ab et à identifier sa source dans l'environnement. Pour ce faire, des sols agricoles et des eaux de surface ont été enrichis soit en cristaux (biopesticide-Dipel®) ou en toxine pure de maïs Bt. La teneur en Cry1Ab a été déterminée par un immunoessai commercial. De plus, des échantillons d'eau, de sols et de sédiments ont été prélevés dans une région d'épandage de biopesticides et de culture de maïs Bt. Des mesures isotopiques ont été réalisées sur les deux types de toxines afin de relever des différences dans la proportion des isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Les résultats ont montré que la toxine du maïs se dégrade plus rapidement dans les eaux que dans les sols ($t_{1/2}$: quatre et neuf jours respectivement), alors que les cristaux de Bt semblent plutôt stables. Le patron isotopique en ^{13}C et ^{15}N de la toxine de maïs est très différent de celui du Bt et permet donc d'identifier l'origine de la toxine Cry1Ab dans l'environnement. Les relevés dans les différents sites tendent à montrer que la toxine Cry1Ab se trouve en très faibles concentrations dans l'environnement aquatique.

Abstract

The application of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the practice of growing genetically-modified crops are two of the methods currently being used to control infestations of crop-eating insects. The increasing use of these biopesticides may lead to an increase in Cry1Ab toxin in both terrestrial and aquatic environments. The aim of this study was to quantify the levels of Cry1Ab toxin in the environment and, if possible, to locate their sources. Agricultural land and surface waters were spiked with crystals of Dipel® biopesticide or with pure Bt corn toxin. Cry1Ab concentrations were determined by immunoassay. Surface water, soils and sediments were sampled in two areas, one sprayed with Bt var. *kurstaki* and one where genetically-modified corn expressing Cry1Ab was being grown. An isotopic analysis was performed on both these toxins to characterize the proportions of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. The results show that Bt corn toxin is more rapidly degraded in water than in soils ($t_{1/2}$: 4 and 9 days, respectively), while crystals appear more resilient, as expected. The isotopic patterns of ^{13}C and ^{15}N in Bt corn toxin differed markedly from Bt, making it possible to track the source of Cry1Ab in the environment. Preliminary field surveys indicate that Cry1Ab is fairly uncommon in aquatic environments and found only at trace concentrations when it is detected.

Table des matières

RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE D'ABRÉVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION	1
2 APERÇU DU BT ET DU MAÏS BT	3
2.1 Qu'est-ce que le Bt?	3
2.2 Le Bt comme biopesticide	3
2.2.1 En agriculture	3
2.2.2 En sylviculture	4
2.3 Toxicité de la toxine du Bt et du maïs Bt pour les espèces non visées	5
2.4 Le cycle de vie de la δ -endotoxine du Bt et de la toxine du maïs Bt	6
3 DÉVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE	8
3.1 Identification des aires d'étude	8
3.2 Toxines du Bt et du maïs Bt	8
3.2.1 Extraction des toxines à partir d'échantillons environnementaux	8
3.2.1.1 Échantillonnage	8
3.2.1.2 Sols et sédiments	8
3.2.1.3 Eaux de surface	9
3.2.2 Mesure de la toxine Cry1Ab	9
3.2.3 Comptage du Bt	9
3.2.4 Évaluation de la persistance et du devenir de Cry1Ab dans des échantillons environnementaux	10
3.2.4.1 Persistance et devenir des cristaux	10
3.2.4.2 Persistance de la toxine Cry1Ab	10
3.2.4.3 Électrophorèse	11
3.2.5 Analyse isotopique de ^{13}C et de ^{15}N	11
3.3 Détection du gène	11
3.3.1 Extraction de l'ADN	11
3.3.1.1 Sols et sédiments	11
3.3.1.2 Eaux de surface	12
3.3.1.3 Grains de maïs	13
3.3.1.4 Dipel®	13
3.3.2 Détermination de la pureté de l'ADN	14
3.3.3 Mesure de l'ADN	15
3.3.3.1 Réaction en chaîne de la polymérase	15

3.3.3.2	Électrophorèse	17
3.3.3.3	Séquence de l'amplicon du Bt	17
3.4	Toxicité pour les organismes aquatiques	17
3.4.1	La culture du Bt et la purification des cristaux et de la toxine	18
3.4.1.1	Culture du Bt	18
3.4.1.2	Purification des cristaux et de la toxine	19
3.4.1.3	Activité de la protoxine et de la toxine Cry1Ab	21
3.4.2	Essais de toxicité	21
3.4.2.1	Le Daphtokit F TM magna	21
3.4.2.2	Le Thamnotokit F TM	22
3.4.2.3	L'Ostracodtookit F TM	23
3.4.2.4	Détermination des concentrations d'essai	23
4	RÉSULTATS	24
4.1	Identification des aires d'étude	24
4.1.1	Épandage de Bt	24
4.1.2	Maïs Bt	25
4.2	Toxines du Bt et du maïs Bt	26
4.2.1	Caractérisation de Cry1Ab à partir de cultures de Bt	26
4.2.2	Persistance des cristaux de Bt dans les sols	27
4.2.3	Persistance et demi-vie	30
4.2.3.1	Sols	30
4.2.3.2	Eaux de surface	30
4.2.4	Analyse isotopique	30
4.2.5	Échantillons environnementaux	32
4.3	Gènes	34
4.4	Toxicité pour les organismes aquatiques	35
5	DISCUSSION	37
	RÉFÉRENCES	41
	ANNEXES	45
	1 Composition des solutions	46
	2 Méthode de dénombrement	47
	3 Cultures de Bt	48
	4 Extraction de l'ADN des sols	50

Liste des figures

1	Cycle biologique de la δ -endotoxine du Bt et de la toxine du maïs Bt	6
2	Aire d'étude	25
3	Formes moléculaires de Cry1Ab (A) et stabilité (B) dans des échantillons de sol	27
4	Persistance des cristaux de Cry1Ab dans des sols riches en silice	28
5	Influence du pH dans l'extraction de la toxine Cry1Ab de sols riches en silice	29
6	Stabilité de Cry1Ab dans les sols riches en silice (A) et dans les eaux de surface (B)	31
7	Analyse d'isotopes stables de carbone et d'azote dans des Cry1Ab d'origines bactériennes et végétales	32
8	Électrophorèse des extraits de maïs Dipel® et Bt après la PCR	35

Liste des tableaux

- 1 Concentrations de Cry1Ab dans une zone arrosée au Bt et au voisinage d'un champ de maïs Bt

Liste d'abréviations

BSA*	Albumine sérique de bovin
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-k	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>
Bt-i	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
CL ₅₀	Concentration létale pour 50 % des organismes
Da	Dalton
DEAE	Diéthylaminoéthyl
EDTA	Acide éthylène diaminotétraacétique
g	Force centrifuge
kDa	KiloDalton
L	Litre
M	Molaire
μL	Microlitre
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
ng	Nanogramme
OGM	Organisme génétiquement modifié
PBS*	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR*	Réaction en chaîne de la polymérase
®	Déposé
SDS*	Dodécyl sulfate de sodium
TE	Tris-EDTA
™	Marque
tr/min	Tours par minute

* Les abréviations anglaises ont été conservées ici parce qu'elles sont plus connues et utilisées que leur équivalent français.

1 Introduction

La culture du maïs a pris beaucoup d'importance au Québec durant les vingt dernières années. Avec plus de 380 000 hectares de terres consacrées au maïs en 1999, cette culture occupe la plus grande superficie de terres agricoles dans la province après la pâture et la culture du foin (environ 17 %). À souligner, toutefois, que la moitié des pesticides employés en agriculture au Québec sont épandus sur le maïs (Giroux *et al.*, 1997).

Ces dernières années, la prise de conscience de problèmes de plus en plus complexes en agriculture – comme l'utilisation abusive de pesticides ou la transformation majeure d'écosystèmes – a conduit au développement de nouvelles méthodes sans danger pour l'environnement afin de lutter contre les insectes qui ravagent les cultures, comme la Pyralle du maïs. Une des méthodes les plus recommandées est le recours aux biopesticides comme le *Bacillus thuringiensis* (Bt). Ce pesticide biologique a connu d'énormes progrès au cours des quatre dernières décennies. Aujourd'hui, une vaste gamme de produits à base de Bt sont employés dans divers secteurs, incluant l'agriculture et la foresterie, ainsi qu'en milieu urbain. Au début des années 1990, le marché des biopesticides à base de Bt valait plus que les 57,2 millions de dollars estimés en Amérique du Nord (Rigby, 1991).

À l'origine, *Bacillus thuringiensis* était simplement épandu sur les cultures ou les arbres, mais depuis dix ans, des plantes génétiquement modifiées avec des gènes de Bt qui codent pour des toxines ont été employées pour limiter les infestations par les insectes ravageurs.

Ces deux pratiques (épandage de Bt et la culture de plantes contenant des gènes de Bt) pourraient possiblement mener à une contamination de l'environnement. Les toxines produites par la bactérie ainsi que par le gène introduit dans la plante pourraient être disséminées dans le sol et apparaître éventuellement dans les sédiments et les eaux de surface, avec des effets nuisibles sur des organismes aquatiques non ciblés.

Le Centre Saint-Laurent d'Environnement Canada, sous la direction de M. François Gagné, D.Sc., a entrepris un projet pour identifier la contamination et les effets sur l'environnement des produits de la biotechnologie, en particulier les organismes génétiquement modifiés (OGM). Comme il est impossible d'évaluer tous les produits existants, *Bacillus thuringiensis* a été choisi comme modèle pour une étude plus approfondie.

Les principaux objectifs de cette étude consistaient à :

- identifier les zones du fleuve Saint-Laurent plus susceptibles d'être contaminées par l'épandage de pesticides à base de Bt et par les cultures de maïs Bt;
- évaluer les concentrations de la toxine et du gène du maïs Bt dans les sédiments, le sol et les eaux de surface dans les zones voisines d'un point de rejet dans le fleuve Saint-Laurent, soupçonné d'être contaminé par des produits Bt;
- évaluer les propriétés toxiques des protéines Bt (protoxine et toxine) pour les organismes aquatiques;
- et déterminer le cycle de vie (devenir, persistance, etc.) de la δ -endotoxine Cry1Ab dans l'environnement.

2 Aperçu du Bt et du maïs Bt

2.1 QU'EST-CE QUE LE BT?

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie aérobie *gram*-positive répandue partout dans le monde. Elle est présente dans le sol, l'eau et l'air et à la surface des feuilles (Joung et Côté, 2000).

Cette bactérie peut produire un cristal protéique ou une inclusion parasporale, appelés δ -endotoxines. Ces cristaux contiennent des séquences de protéines toxiques pour diverses espèces d'insectes. Il existe quatre principales classes de δ -endotoxines : CryI spécifique aux Lépidoptères, CryII spécifique aux Lépidoptères et aux Diptères, CryIII spécifique aux Coléoptères et CryIV spécifique aux Diptères. Toutefois, une nouvelle nomenclature fondée uniquement sur la séquence des acides aminés a été proposée par Crickmore *et al.* (1998). Cette classification permet de classer ensemble les toxines étroitement reliées et évite aux chercheurs de procéder à des bioessais pour chaque nouvelle toxine avec de plus en plus d'organismes.

Après ingestion des cristaux par les insectes, la δ -endotoxine libère, par hydrolyse alcaline et protéique, des séquences de protéines (par exemple les toxines) qui se lient à des récepteurs spécifiques sur les membranes de l'épithélium de l'intestin, ce qui entraîne la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales. Ce processus déclenche une dégénération rapide et la mort éventuelle de l'insecte par septicémie. Le Bt et son endotoxine visent spécifiquement des insectes des ordres mentionnés ci-haut et ne sont pas supposés être toxiques pour les vertébrés et les mammifères, parce qu'il leur manque des récepteurs précis pour les diverses endotoxines. Cependant, on a découvert que le Bt avait des effets toxiques sur certaines espèces non visées comme le Monarque et la larve de *Chironomus riparius* (Losey *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 1995).

2.2 LE BT COMME BIOPESTICIDE

2.2.1 En agriculture

Les ravageurs agricoles qui peuvent être contrôlés par le Bt sont la Pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), le Doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*), la Fausse-

teigne des crucifères (*Plutella xylostella*), la Fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*) et la Chenille du chou (*Pieris brassicae*) (Environnement Canada, 2002; Doucet, 1994).

Au Québec, les formulations de Bt ont été employées sur une variété de cultures, incluant celles de pommes de terre, de choux, de brocolis, de tomates et de maïs (Environnement Canada, 2002). À la différence des insecticides chimiques, ce biopesticide a l'avantage de n'être toxique que pour certains ordres d'insectes (voir la section précédente). Cependant, le Bt a des désavantages : la faible persistance des spores et des cristaux à la lumière ultraviolette, son enlèvement par les eaux de ruissellement, le manque d'uniformité de son application et son inefficacité contre les insectes ravageurs déjà présents dans les tissus des plantes (Nester *et al.*, 2002).

Depuis le milieu des années 1990, des cultures génétiquement modifiées qui produisent des toxines Bt Cry ont été mises sur le marché pour que les fermiers aient un meilleur contrôle des infestations de ravageurs. Dans le cas du maïs Bt, le gène qui code pour la toxine Cry1Ab a été introduit dans le génome du maïs dans le but de limiter encore plus les infestations par les insectes. Ce nouveau type de maïs a l'avantage de produire une toxine à travers ses tissus qui vise les ravageurs envahissant les tissus des plantes, comme la Pyrale du maïs. Cependant, nous ne connaissons pas encore quel impact cette nouvelle espèce pourrait avoir sur l'environnement.

On estime qu'environ 12 millions d'hectares de cultures Bt transgéniques protégées contre les insectes sont maintenant plantées annuellement à l'échelle planétaire (Nester *et al.*, 2002). En 2000, presque 40 % de tout les maïs-grains cultivés au Québec étaient du maïs Bt.

2.2.2 En sylviculture

Les insectes, en particulier la Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*), sont considérés comme les ravageurs les plus importants pour l'industrie forestière canadienne. L'Arpenteuse de la pruche (*Lambdina fiscellaria fiscellaria*), la Tordeuse du Pin gris (*Choristoneura pinus pinus*), le Diprion de Swaine (*Neodiprion swaini*) et la Spongieuse (*Lymantria dispar*) sont relativement moins préoccupants. Ces insectes sont facilement contrôlés par l'épandage de Bt (SOPFIM, 1992; Martineau, 1985).

Antérieurement, le Fénitrothion, un insecticide chimique, servait en général à contrôler ces parasites. Il a été remplacé graduellement par des applications aériennes de Bt. Les premiers

produits commerciaux ont été mis en marché en France en 1938 (Nester *et al.*, 2002). Le Bt a été introduit en sylviculture en Amérique du Nord dans les années 1960. Au Québec, le Bt a été utilisé conjointement avec le Fénitrothion en 1985 et 1986, puis seul pour contrôler les ravageurs dans les forêts québécoises. Ce biopesticide est la méthode de contrôle des parasites la plus utilisée dans les forêts de l'est du Canada, à l'exception du Nouveau-Brunswick (SOPFIM, 1992).

2.3 TOXICITÉ DE LA TOXINE DU BT ET DU MAÏS BT POUR LES ESPÈCES NON VISÉES

Comme on l'a mentionné dans la section 2.1, la toxine Cry1Ab n'est pas supposée être toxique pour les vertébrés et les mammifères aquatiques. Il a été observé que la libération de toxines par l'exsudat des racines du maïs Bt n'était pas toxique pour les vers de terre, les nématodes, les champignons, les protozoaires et les bactéries dans les sols (Saxena et Stotzky, 2001).

Cependant, il a été démontré que le Bt *kurstaki* (Bt-k) et le Bt *israelensis* (Bt-i) réduisaient la croissance des populations libres de nématodes *Turbatrix aceti* et ont été suggérés pour le contrôle des nématodes (Meadows *et al.*, 1990). Dans une autre étude, l'application répétée de Bt-i dans des étangs a favorisé l'apparition d'espèces résistantes de moucheron *Chironomus* et le déclin d'autres espèces plus sensibles (Dickman, 2000). Il existe des preuves à l'effet que des préparations de Bt peuvent être mutagènes pour des espèces non visées comme les sauterelles (Ren *et al.*, 2002). En fait, ces auteurs ont montré que des anomalies chromosomiques des cellules testiculaires apparaissaient chez des insectes après qu'ils aient été injectés avec une préparation de Bt. Toutefois, le rôle exact des δ -endotoxines Cry1Ab dans la génotoxicité demeure imprécis.

De nombreuses études ont été effectuées sur la toxicité du Bt pour les organismes terrestres et aquatiques non visés. Autant que nous le sachions, aucune n'a examiné la toxicité de la toxine du maïs Bt pour les organismes aquatiques. Comme la toxine est libérée par l'exsudat des racines du maïs, elle peut atteindre possiblement les eaux de surface et mener à l'exposition d'organismes aquatiques non visés. Une recherche est nécessaire dans ce domaine pour déterminer le potentiel toxique de la toxine du maïs Bt.

2.4 LE CYCLE DE VIE DE LA δ -ENDOTOXINE DU BT ET DE LA TOXINE DU MAÏS BT

La figure 1 illustre le cycle de vie de la δ -endotoxine du Bt et de la toxine du maïs Bt dans l'environnement, comme nous le comprenons actuellement.

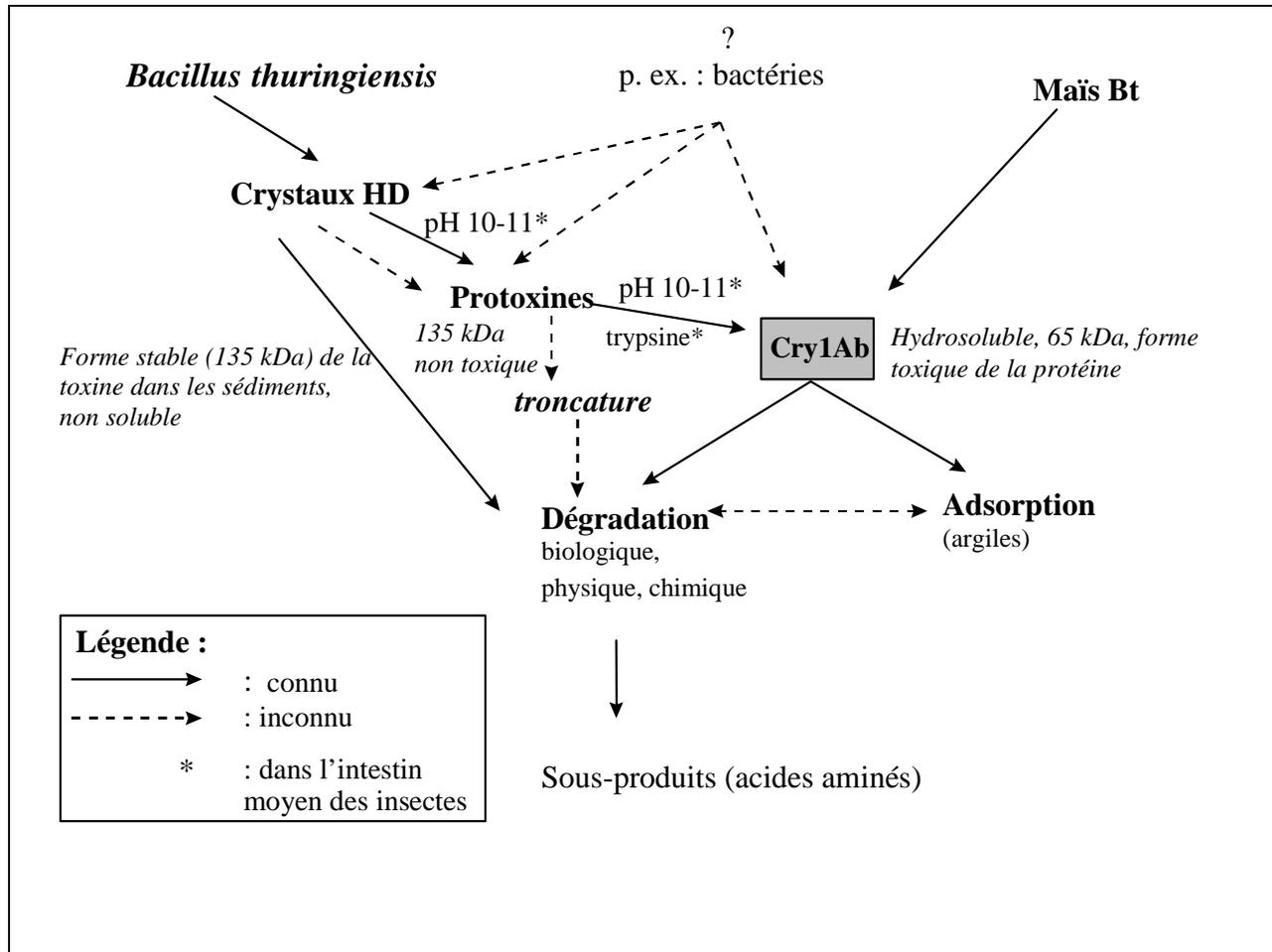


Figure 1 Cycle biologique de la δ -endotoxine du Bt et de la toxine du maïs Bt

Comme on l'a décrit auparavant, après solubilisation et coupure enzymatique, le Bt forme durant la sporulation des inclusions parasporales de protéines cristallines toxiques pour les insectes. Ce processus conduit à la formation de la toxine activée. Le maïs Bt produit cette toxine soluble dans l'eau.

Dans le milieu naturel, les cristaux de Bt se dégradent rapidement et sont inactivés par les rayons UV. Nous ne savons pas, cependant, si la dégradation des cristaux entraîne la formation de protoxines, de toxines ou d'une autre protéine tronquée et si elle enrichit de cette façon l'environnement avec ces toxines.

Il a été démontré que le maïs Bt libère la toxine Cry1Ab par le système racinaire (Saxena *et al.*, 1999) et par la dégradation des tissus dans le sol (Stotzky, 2000). Tapp *et al.* (1994) ont également montré que la toxine s'adsorbe et se lie aux particules d'argile dans le sol et, bien qu'elle soit moins disponible pour la dégradation microbienne, elle demeure toxique pour les insectes.

L'utilisation accrue de ce type de biopesticide et l'accroissement des cultures de maïs transgénique vont probablement causer une augmentation du Bt et de ses δ -endotoxines dans les milieux terrestres et aquatiques. Ainsi, dans l'environnement, la toxine Cry1Ab provient des sources suivantes : a) la toxine Cry1Ab libérée par les exsudats des racines du maïs Bt comme le maïs MON810 (Saxena *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 1999); b) l'épandage de Bt *kurstaki* pour contrôler la prolifération d'insectes lépidoptères comme la Pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) et le Ver de l'épi du maïs (*Heliothis zea*; Hudon *et al.*, 1985); c) et les toxines du Bt naturel dans le sol, dont les concentrations peuvent être modifiées par l'épandage de fertilisants organiques sur les terres agricoles. D'un côté, la forme cristalline de Cry1Ab, que l'on croyait stable dans les sols, peut être dégradée sur place, ce qui peut contribuer à augmenter les niveaux de la toxine soluble dans l'eau provenant du Bt. De l'autre côté, la toxine Cry1Ab soluble dans l'eau pourrait, à son tour, se dégrader dans les sols, les sédiments et les eaux de surface. Il est raisonnable de soupçonner que la toxine Cry1Ab trouvée dans l'environnement, qui est libérée de ces sources combinées, pourrait atteindre des niveaux toxiques pour des insectes lépidoptères non visés et pour d'autres espèces insoupçonnées.

Dans la perspective de la protection de l'environnement, la localisation et l'identification des sources potentielles de cette toxine sont essentielles pour la gestion de l'épandage de biopesticides et l'utilisation de cultures génétiquement modifiées produisant la toxine Cry1Ab.

Pour les besoins du présent ouvrage, la δ -endotoxine représente la forme cristalline, la protoxine, la forme non activée de la toxine à 135 kDa, et la toxine, la toxine soluble et activée à 65 kDa.

3 Développement technologique

3.1 IDENTIFICATION DES AIRES D'ÉTUDE

Deux types d'aires d'étude ont été identifiés en effectuant des recherches dans les bibliothèques gouvernementales et en consultant des personnes-ressources. Puis, nous avons inspecté les lieux où du Bt a été épandu, surtout les secteurs forestiers et agricoles et les milieux urbains et, ensuite, des zones où le maïs Bt était cultivé.

3.2 TOXINES DU BT ET DU MAÏS BT

3.2.1 Extraction des toxines à partir d'échantillons environnementaux

Des méthodes ont été conçues pour extraire les toxines du sol, des sédiments et des eaux de surface.

3.2.1.1 Échantillonnage

Les premiers 20 cm de sol ou de sédiments ont été prélevés à l'aide d'une pelle ou d'une benne. Des échantillons ont été placés dans des sacs de polyéthylène, puis l'air en surplus a été évacué des sacs avant de les attacher. Les sacs ont ensuite été placés sur de la glace dans une glacière et entreposés dans un réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur analyse.

Les échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide d'une bouteille propre en polyéthylène de 4 L, qui a ensuite été placée sur de la glace dans une glacière et entreposée dans un réfrigérateur à 4 °C jusqu'à l'analyse.

3.2.1.2 Sols et sédiments

La méthode d'extraction est similaire pour les échantillons de sol et de sédiments.

Méthode

- Mélanger 5 g de sol ou de sédiments avec 5 mL d'un tampon d'extraction neutre (PBS, Tween-20 0,2 %, BSA 1 %; voir l'annexe 1) dans un tube de 50 mL;
- mélanger les échantillons à l'aide d'un agitateur rotateur, réglé à 1 rotation à la seconde, pendant 1 heure, à 4 °C dans l'obscurité;
- centrifuger les tubes à 600 g pendant 10 minutes à 4 °C;
- placer 1,5 mL de surnageant dans un tube de microcentrifugation;

- centrifuger le tube à 12 000 g pendant 7 minutes à 4 °C;
- placer 400 µL de surnageant sur un ultrafiltre (100 kDa) et centrifuger à 12 000 g pendant 30 minutes à 4 °C;
- conserver tous les échantillons (avant et après l'ultrafiltration) à 4 °C jusqu'à l'analyse (le même jour).

3.2.1.3 Eaux de surface

L'extraction est effectuée à partir d'eau filtrée (0,22 µM) et non filtrée. La filtration élimine la fraction particulaire ou bactérienne de l'échantillon, dont les cristaux Cry1Ab.

Méthode

- Mélanger 1 mL d'échantillon avec 1 mL de tampon d'extraction neutre (PBS, Tween-20 0,2 %, BSA 1 %; voir l'annexe 1);
- mélanger les échantillons avec un agitateur Vortex pendant 30 secondes;
- placer 400 µL d'échantillon filtré sur un ultrafiltre (100 kDa) et centrifuger à 12 000 g pendant 30 minutes à 4 °C;
- conserver tous les échantillons (avant et après l'ultrafiltration) à 4 °C jusqu'à l'analyse (le même jour).

3.2.2 Mesure de la toxine Cry1Ab

Pour déterminer la concentration de la toxine dans un échantillon environnemental, des tests ELISA (dosage immunoenzymatique) en « sandwich » ont été faits sur le surnageant et l'ultrafiltrat. La technique ELISA est réalisée à l'aide des trousse commerciales d'Envirolab (Portland, Maine, États-Unis). Cette trousse contient un anticorps polyclonal qui détecte la Cry1Ab et la Cry1Ac provenant du maïs Bt et de *Bacillus thuringiensis*. En d'autres mots, l'anticorps n'est pas spécifique à la toxine Cry1Ab du maïs Bt. C'est pour cette raison qu'une autre méthode est nécessaire pour distinguer précisément les deux sources de Cry1Ab (voir la section 3.2.4).

3.2.3 Comptage du Bt

Le dénombrement de *Bacillus thuringiensis* dans les échantillons de sol, de sédiments et d'eaux de surface a été effectué par un laboratoire privé (Bodycote-Envirolab, Sainte-Foy, Québec, Canada). La méthode utilisée est expliquée à l'annexe 2. Cette technique a été choisie pour déterminer s'il existait une relation entre la concentration de la toxine dans les échantillons et la présence du Bt.

3.2.4 Évaluation de la persistance et du devenir de Cry1Ab dans des échantillons environnementaux

Des essais en laboratoire ont été effectués pour évaluer la persistance (demi-vie) des cristaux et la stabilité de la toxine dans les sols et sédiments et dans les eaux de surface.

3.2.4.1 Persistance et devenir des cristaux

La persistance et le devenir des cristaux et de la toxine du Bt ont été évalués en dopant des sols riches en silice et en argiles stériles et non stériles ainsi que des eaux de surface avec une solution de Dipel® à différentes concentrations. Les concentrations dans les sols étaient de 1, 2, 4, 8 et 16 ppm et dans les eaux de surface, de 2,4 µg/mL. Des témoins négatifs ont été dopés avec de l'eau distillée.

Après addition de la solution, les tubes ont été agités jusqu'à homogénéité avec un agitateur Vortex. Les échantillons de sol ont été incubés pendant 1 heure à 15 °C dans l'obscurité pour permettre l'adsorption de la solution sur les particules de sol. Certains tubes ont été incubés pendant 4 et 7 jours (15 °C, cycle de 16 h à la lumière et de 8 h à la noirceur) jusqu'à l'extraction.

Les techniques d'extraction et d'évaluation de la toxine sont similaires à celles décrites dans les sections 3.2.1.2, 3.2.1.3 et 3.2.2.

Le dénombrement de *Bacillus thuringiensis* a également été fait avec des témoins négatifs et des échantillons de sols dopés avec la plus forte concentration de Dipel®.

3.2.4.2 Persistance de la toxine Cry1Ab

Pour évaluer la demi-vie de la toxine dans des échantillons environnementaux, des sols riches en silice et en argile stériles et non stériles ainsi que des eaux de surface stériles et non stériles ont été dopés avec la toxine Cry1Ab pure de maïs Bt (Agdia, Elkhart, Indiana, États-Unis) à une seule concentration (10 ng/g pour les sols et 10 ng/L pour les eaux). Des témoins négatifs ont été dopés avec de l'eau distillée.

Les étapes suivantes sont similaires à celles décrites dans les sections 3.2.4.1, sauf qu'il n'y a pas eu de dénombrement de Bt.

3.2.4.3 Électrophorèse

Le poids moléculaire des toxines extraites du sol et des sédiments et des eaux de surface dopés au Dipel® ou avec une toxine pure de maïs a été déterminé par électrophorèse sur gel SDS-Page (NuPAGE® Gel, Invitrogen, Carlsbad, Californie, É.-U.).

3.2.5 Analyse isotopique de ¹³C et de ¹⁵N

Les analyses isotopiques ont été réalisées afin de trouver une méthode qui permet de différencier les deux formes de toxines (bactérienne ou issue du maïs Bt) pour tenter de localiser leurs sources dans la nature. Jennifer McKay du GÉOTOP-UQAM (Montréal, Québec, Canada) a réalisé les analyses isotopiques de la protoxine et de la toxine du Bt ainsi que de la toxine du maïs Bt.

3.3 DÉTECTION DU GÈNE

La présence du gène *cryIAb* du maïs Bt a été évaluée dans des échantillons de sol, de sédiments et d'eaux de surface prélevés à proximité de champs de maïs Bt et dans des zones d'épandage de Bt. De l'ADN a également été extrait de maïs naturel, de maïs Bt et du Dipel® pour produire des témoins positifs et négatifs.

3.3.1 Extraction de l'ADN

3.3.1.1 Sols et sédiments

La méthode a été adaptée de Sambrook *et al.* (1989).

Méthode

- Peser 1 g de sol ou de sédiments, ajouter 1 mL de lysozyme de 100 µg/mL et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à 37 °C dans un bain d'eau pendant 1 heure;
- ajouter 200 µL de SDS (dodécyl sulfate de sodium) 10 % (final 2 %) et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à 70 °C dans un bain d'eau pendant 30 minutes;
- ajouter 1 volume de phénol-chloroforme-alcool isopentylique et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à 37 °C dans un bain d'eau pendant 15 minutes;
- centrifuger à 600 g pendant 5 minutes;

- retirer 1 mL de surnageant, ajouter 0,1 volume (100 µL) d'acétate de sodium 2 M et mélanger à l'agitateur Vortex;
- transférer 0,5 mL de la solution de surnageant et d'acétate de sodium dans un autre tube de microcentrifugation;
- ajouter 1 mL d'isopropanol à chaque tube et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes;
- centrifuger à 12 000 g pendant 5 minutes;
- jeter le surnageant et ajouter 100 µL de tampon TE (Tris-EDTA) (voir l'annexe 1);
- effectuer une autre précipitation à l'isopropanol pour purifier les extraits;
 - ajouter 10 µL d'acétate de sodium 2 M et mélanger à l'agitateur Vortex;
 - ajouter 200 µL d'isopropanol et mélanger à l'agitateur Vortex;
 - incuber à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes;
 - jeter le surnageant et ajouter 100 µL de tampon TE.

Évaluer la pureté des acides nucléiques en mesurant l'absorbance à 260 nm et à 280 nm (matériau protéique). Un échantillon dont le rapport A_{260}/A_{280} est > 2 est considéré comme suffisamment pur.

3.3.1.2 Eaux de surface

La méthode suivante a été conçue pour l'extraction de l'ADN des eaux de surface.

Méthode

- Filtrer 500 mL à 1 L d'eau (0,22 ou 0,45 µM);
- ajuster le pH à 8,0 avec du tris-acétate 200 mM à pH 8,0;
- ajouter 1 g de cellulose de DEAE à 10 mL de NaCl 0,02 M et de tris-acétate 0,5 mM à pH 8,0, et centrifuger à 3000 tr/min pendant une minute pour éliminer le tampon;
- ajouter la cellulose de DEAE préactivée à l'échantillon (1g par 500 mL d'échantillon);
- mélanger pendant 30 minutes;
- filtrer (0,45 µM) pour éliminer l'échantillon;
- laver la cellulose de DEAE avec 1 mL de NaCl 0,1 M et de tris-acétate 2,5 mM à pH 8,0 sur le filtre;
- enlever la cellulose de DEAE et la placer dans un petit bécher;
- pour récupérer l'ADN, ajouter 4 mL de NaCl 2 M et de tris-HCl à pH 8,0 et mélanger;

- verser le tampon dans des tubes de microcentrifugation et centrifuger à 12 000 g à température ambiante pendant quelques secondes;
- prélever le surnageant pour l'analyse de l'ADN.

3.3.1.3 Grains de maïs

La méthode a été adaptée de celle d'Aljanabi et Martinez (1997).

Méthode

- Homogénéiser 2 g de grains de maïs dans 12 mL de tampon d'homogénéisation (voir l'annexe 1) avec un homogénéisateur Polytron;
- ajouter 2,4 mL de SDS 10 % (final 2 %);
- ajouter 3,6 mL de lysozyme 2 mg/mL (final 400 µg/mL);
- incuber pendant 2 heures à 60 °C;
- ajouter 9 mL de NaCl 6 M (eau saturée de NaCl), et mélanger pendant 30 secondes à l'agitateur Vortex;
- centrifuger à 600 g pendant 30 minutes;
- placer le surnageant dans un tube en plastique de 15 mL;
- ajouter 1 volume d'isopropanol froid et mélanger pendant 30 secondes à l'agitateur Vortex;
- placer à -80 °C pendant 20 minutes;
- centrifuger à 4000 g à 4 °C pendant 20 minutes;
- jeter le surnageant;
- ajouter 1 mL d'éthanol 70 % et mélanger pendant 30 secondes à l'agitateur Vortex;
- transférer dans des tubes de microcentrifugation et inverser les tubes pour mélanger;
- centrifuger à 12 000 g à 4 °C pendant 5 minutes;
- jeter le surnageant;
- sécher le culot pendant 30 minutes sous une hotte;
- ajouter 1,5 mL de tampon TE et mélanger à l'agitateur Vortex;
- déterminer la pureté de l'ADN (A260/A280) et entreposer à -20 °C.

3.3.1.4 Dipel®

La méthode employée ici a été adaptée de Sambrook *et al.* (1989).

Méthode

- Préparer une solution-mère de Dipel® de 12 g/200 mL dans de l'eau distillée;
- prélever 1 mL de la solution-mère, ajouter 1 mL de lysozyme 100 µg/mL et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à 37 °C dans un bain d'eau pendant 1 heure;
- ajouter 200 µL de SDS 10 % (final 2 %) et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à 70 °C dans un bain d'eau pendant 30 minutes;
- ajouter 1 volume de phénol-chloroforme alcool isopentylique et mélanger à l'agitateur Vortex;
- centrifuger à 600 g pendant 5 minutes;
- prélever 1 mL de surnageant, ajouter 0,1 volume (100 µL) d'acétate de sodium 2 M et mélanger à l'agitateur Vortex;
- transférer 0,5 mL de la solution de surnageant et d'acétate de sodium dans un autre tube de microcentrifugation;
- ajouter 1 mL d'isopropanol à chaque tube et mélanger à l'agitateur Vortex;
- incuber à -80 °C pendant 10 minutes;
- centrifuger à 12 000 g pendant 5 minutes;
- jeter le surnageant et ajouter 100 µL de tampon TE;
- effectuer une autre précipitation à l'isopropanol pour purifier l'extrait :
 - ajouter 10 µL d'acétate de sodium 2 M et mélanger à l'agitateur Vortex;
 - ajouter 200 µL d'isopropanol et mélanger à l'agitateur Vortex;
 - incuber à -80 °C pendant 10 minutes;
 - centrifuger à 12 000 g pendant 5 minutes;
 - jeter le surnageant et ajouter 100 µL de tampon TE.

3.3.2 Détermination de la pureté de l'ADN

La pureté de l'ADN est évaluée par spectrophotométrie à l'aide des rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{270} . Ces rapports servent à déterminer si les échantillons sont contaminés par les protéines ou le phénol. Un rapport de < 2 indique une contamination.

Méthode

- Étalonner le spectrophotomètre en introduisant 100 µL de tampon TE dans la cellule de lecture;
- lire l'absorbance avec la lumière ultraviolette;

- laver la cellule avec le tampon TE;
- insérer 100 µL d'extrait d'ADN dans la cellule et mesurer l'absorbance (260, 270 et 280 nm);
- diluer l'échantillon si nécessaire;
- évaluer les rapports ADN/protéine et ADN/phénol. Si ces rapports sont < 2, purifier l'extrait avec de l'acétate de sodium et de l'isopropanol (voir la section 3.3.1.4).

3.3.3 Mesure de l'ADN

La teneur d'un extrait en ADN est évaluée par la méthode de Hoechst (Bester *et al.*, 1994).

Méthode

- Préparer la solution de Hoechst : 1 mg de bisbenzimidazole par millilitre de méthanol et diluer 1 : 1000 (100 µL/100 mL) dans un tampon TE;
- préparer une courbe d'étalonnage avec l'ADN de sperme de saumon (100 µg/mL) sur une microplaque noire : 0 (blanc), 1,14, 2,27, 4,55 et 9,09 µg/mL (ADN + 100 µL Hoechst);
- ajouter 10 µL de l'échantillon d'ADN à 100 µL Hoechst;
- mélanger brièvement;
- mesurer la fluorescence (excitation à 365 nm et émission à 450 nm).

3.3.3.1 Réaction en chaîne de la polymérase

Une réaction en chaîne de la polymérase (PCR) conventionnelle a été effectuée sur des extraits d'ADN avec des amorces universelles *cryI* du Bt et des amorces de maïs Bt MON810. Ces amorces ont été produites par Hukabel (Montréal, Québec).

La séquence des amorces universelles était la suivante (Ben-Dov *et al.*, 1997) :

- Matrice : 5'-A-T-G-A-T-T-C-A-T-G-C-G-G-C-A-G-A-T-A-A-A-C-3'
- Complément : 5'-T-T-G-T-G-A-C-A-C-T-T-C-T-G-C-T-T-C-C-C-A-T-T-3'

Pour les amorces de maïs Bt MON810, la séquence était la suivante (Chiueh *et al.*, 2001) :

- HSP70/Sens : 5'-A-G-T-T-T-C-C-T-T-T-T-G-T-T-G-C-T-C-T-C-C-T-3'
- Cry1Ab/Anti-sens : 5'-G-A-T-G-T-T-T-G-G-G-T-T-G-T-T-G-T-C-C-A-T-3'

Méthode

Dans 400 μL ,

- eau distillée : volume variable;
- tampon de PCR 10X : 40 μL ;
- 2-désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) : 200 μM chaque (8 μL);
- amorce de matrice : 0,5 μM (5 μL);
- amorce complémentaire : 0,5 μM (5 μL);
- Taq polymérase : 0,05 unités/ μL (4 μL);
- échantillon d'ADN : 0,01 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Des échantillons ont été répartis dans deux tubes de 250 μL pour PCR et placés dans un thermocycleur (Techne de Techgène). Le cycle de température était le suivant :

- dénaturation initiale : 2 minutes à 94 °C;
- 35 cycles :
 - dénaturation : 30 secondes à 94 °C
 - hybridation : 1 minute à 57 °C;
 - extension : 1,5 minute à 72 °C;
 - extension finale : 10 minutes à 72 °C.

Le contenu a été mesuré par la méthode Hoescht. Si la concentration d'ADN avait augmenté fortement après la réaction en chaîne de la polymérase, alors l'ADN avait été récupéré par la précipitation d'isopropanol de la façon suivante :

Méthode

- Ajouter 0,1 volume d'acétate de sodium 2 M et mélanger à l'agitateur Vortex;
- ajouter 1 volume de phénol-chloroforme-alcool isopentylique et mélanger à l'agitateur Vortex;
- centrifuger à 15 000 tr/min à température ambiante pendant 2 à 5 minutes;
- transférer le surnageant dans un autre tube;
- ajouter 1 volume d'isopropanol et mélanger à l'agitateur Vortex;
- placer à -80 °C pendant 10 minutes ou à -20 °C pendant 1 heure ou toute la nuit;
- centrifuger à 15 000 tr/min à température ambiante pendant 5 minutes;
- enlever le surnageant;
- ajouter 100 μL de TE au culot et mélanger à l'agitateur Vortex pour le dissoudre;

- incuber à 70 °C pendant 10 à 30 minutes si le culot n'est pas dissous.

Les témoins positifs (ADN du biopesticide Dipel® et du maïs Bt) et négatifs (ADN du saumon et du maïs naturel) et le blanc (eau seulement) ont été testés en même temps.

3.3.3.2 Électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose a été employée pour déterminer si les gènes du Bt ou du maïs Bt étaient présents dans les échantillons environnementaux prélevés au voisinage d'un champ de maïs Bt.

Méthode

- Diluer à 1 : 6 le colorant de charge avec de l'eau distillée;
- placer le gel d'agarose à 2 ou à 4 % dans l'appareil d'électrophorèse;
- diluer les échantillons et les témoins à 1 : 2 avec le colorant de charge;
- verser 10 µL du marqueur de taille dans le premier puit;
- verser 12 µL de tampon TE et 10 µL d'échantillons et de témoins dilués dans les puits;
- procéder à l'électrophorèse pendant 30 minutes;
- analyser le gel avec un analyseur d'images à la lumière ultraviolette.

3.3.3.3 Séquence de l'amplicon du Bt

L'amplicon produit avec les amorces de maïs Bt MON810 a été envoyé à Agriculture et Agroalimentaire Canada (Sainte-Foy) pour y être séquencé.

Le vecteur PCRII (Invitrogen) a été employé pour cloner l'amplicon, et il a été séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique Cor 4200L.

3.4 TOXICITÉ POUR LES ORGANISMES AQUATIQUES

Un des objectifs du projet consistait à étudier la toxicité de la toxine Cry1Ab du maïs Bt pour divers organismes aquatiques couramment employés dans les bioessais des études de réglementation en application de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*. La toxine pure était vendue par la compagnie Agdia, à Elkhart (Indiana, É.-U.), mais son prix était trop élevé pour la quantité nécessaire aux essais d'exposition. Nous avons donc décidé de produire directement la toxine à partir de la bactérie du Bt et de procéder à des essais de

dépistage de la toxicité sur quatre organismes aquatiques. Les espèces sensibles à la toxine du Bt seraient ensuite exposées à la toxine pure du maïs.

3.4.1 La culture du Bt et la purification des cristaux et de la toxine

Luc Masson de l'Institut de recherche en biotechnologie nous a fourni du Bt qui produit uniquement la toxine Cry1Ab (souche Pab4). Son assistant, Alberto Mazza, nous a donné une séance de formation sur les cultures de Bt et les techniques pour isoler et purifier les cristaux et les toxines.

3.4.1.1 Culture du Bt

Méthode

- Faire fondre l'aliquote de Bt précédemment placée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (voir l'annexe 3);
- inoculer une gélose nutritive spécifique au Bt (voir l'annexe 3) à partir de l'aliquote de Bt à l'aide d'une boucle d'inoculation;
- incuber à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures;
- préparer le milieu de culture du Bt (2 L) :
 - bactopeptone (acides casamino) : 7,50 g/L,
 - glucose : 7,5 g/L,
 - phosphate de potassium monobasique KH_2PO_4 : 3,40 g/L,
 - phosphate de potassium dibasique K_2HPO_4 : 4,35 g/L,
 - ajuster le pH à 7,2 avec des pastilles de NaOH;
- verser environ 333 mL dans 6 erlenmeyers Fernbach de 3 L;
- placer des bouchons en coton recouverts de papier aluminium sur les flacons;
- stériliser les flacons et leur contenu (15 minutes à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 5 minutes de séchage);
- placer les flacons stérilisés à la lumière ultraviolette dans une hotte à flux laminaire jusqu'à ce que les flacons soient tièdes;
- ajouter 1,65 mL de solution stérile de sels PGSM (voir l'annexe 3) dans chaque flacon juste avant l'inoculation;
- ajouter 1,65 mL de solution stérile de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (voir l'annexe 3) dans chaque flacon juste avant l'inoculation;
- ajuster le pH avant l'inoculation en ajoutant dans chaque flacon environ 30 gouttes de NaOH 1 M;
- ajouter une seule colonie de Bt à un flacon (communément appelée pré-culture);

- incuber le flacon inoculé à 28 °C dans l'obscurité pendant 1 jour;
- inoculer ensuite les cinq autres flacons (dans lesquels des bouillons stériles de sels PGSM et de CaCl₂ ont été ajoutés et le pH ajusté avec 30 gouttes de NaOH) avec 1 mL de pré-culture en conditions stériles;
- incuber les flacons inoculés à 28 °C dans l'obscurité pendant 3 à 4 jours jusqu'à ce qu'il y ait sporulation (développement d'écume à la surface du milieu de culture).

3.4.1.2 Purification des cristaux et de la toxine

Les cristaux ont été isolés et purifiés selon la méthode de Luo *et al.* (1999) à laquelle on a apporté quelques modifications.

Méthode

- Transférer les cultures sporulées dans deux bouteilles Nalgene de 1 L pour centrifugation;
 - centrifuger à 4000 g à température ambiante pendant 13 minutes;
 - transférer le surnageant dans deux autres bouteilles Nalgene de 1 L pour centrifugation à l'aide d'une pipette de 25 mL;
 - centrifuger à 4000 g à température ambiante pendant 13 minutes;
 - retirer le surnageant à l'aide d'une pipette de 25 mL;
 - combiner les 4 culots dans une bouteille Nalgene de 1 L pour centrifugation;
 - ajuster à 1 L avec de l'eau distillée;
 - centrifuger à 4000 g à température ambiante pendant 13 minutes;
 - retirer le surnageant avec une pipette de 25 mL et ajouter 60 mL d'eau distillée au culot; transférer le tout dans deux tubes de 50 mL;
 - ajouter de la lysozyme (0,5 g/1,5 L de culture, ici 0,13 g/tube);
 - ajouter de la ribonucléase A (RNAse) (solution de 40 UN/mg : 100 UN/1,5 L de culture, ici 3,3 mg/tube);
 - mélanger à l'agitateur Vortex et placer sur de la glace pour arrêter la réaction;
- ➔ **Toutes les étapes suivantes devront être réalisées sur de la glace ou à 4 °C.**
- Passer aux ultrasons sur de la glace jusqu'à la lyse de toutes les bactéries (environ 1 heure);
 - transférer la suspension traitée aux ultrasons dans une bouteille Nalgene pour centrifugation;
 - ajouter 400 mL d'eau distillée et mélanger à l'agitateur Vortex;
 - centrifuger à 4000 g à 4 °C pendant 60 minutes;

- retirer le surnageant avec une pipette de 25 mL;
- ajouter 50 mL de NaCl 0,25 M et de Triton 100X 0,1 % (v/v) et mélanger à l'agitateur Vortex;
- centrifuger à 4000 g à 4 °C pendant 60 minutes;
- retirer le surnageant, ajouter 50 mL d'eau distillée et utiliser un Polytron pour fractionner le culot;
- transférer dans deux tubes de 50 mL;
- centrifuger à 4000 g à 4 °C pendant 13 minutes;
- remettre les culots en suspension dans 25 mL d'eau distillée par tube;
- fractionner les culots avec un Polytron;
- centrifuger à 4000 tr/min à 4 °C pendant 15 minutes;
- répéter deux fois ces trois dernières étapes;
- placer les tubes au réfrigérateur jusqu'à la purification des toxines.

Méthode de purification des toxines (adaptée de Masson *et al.*, 1995)

- Ajouter 25 mL de tampon de solubilisation (NaHCO₃ 100 mM et EDTA 10 mM à pH 10,0) dans chaque tube;
- incuber dans un bain d'eau à 37 °C pendant une heure; inverser chaque 10 minutes;
- ultracentrifuger à 200 000 g à 4 °C pendant 1 heure;
- conserver 50 mL de surnageant qui contient la protoxine dissoute (poids moléculaire de 133 kDa) et le mettre au réfrigérateur;
- ajouter de la trypsine (2 mg/mL final) au surnageant restant et incuber pendant 3 heures à température ambiante pour produire l'endotoxine (poids moléculaire de 65 kDa);
- purifier la toxine sur une colonne d'échange d'anions (Sep-Pak Classic Accell plus QMA, Waters Canada) :
 - laver la colonne avec 5 mL de NaCl 50 mM et de NaHCO₃ 0,5 mM à pH 10,0;
 - mettre 7 mL de surnageant (protoxine) par colonne;
 - laver la colonne avec 5 mL de NaCl 250 mM et de NaHCO₃ 2,5 mM à pH 10,0;
 - éluer avec 2 mL de NaCl 600 mM et de NaHCO₃ 2,5 mM à pH 10,0;
- dialyse de la toxine purifiée :
 - hydrater les membranes de la dialyse (fermée d'un côté) dans du NaHCO₃ 0,1 mM et de l'EDTA 0,1 mM à pH 10,0 durant la nuit à 4 °C;
 - laver les membranes avec de l'eau distillée juste avant l'introduction de la solution de toxine;

- introduire la toxine purifiée dans la membrane hydratée de dialyse et fermer, en vérifiant qu’aucune bulle d’air n’est emprisonnée;
 - placer les membranes dans 4 L de NaHCO₃ 0,1 mM, d’EDTA 0,1 mM et de NaCl 0,5 mM à pH 10,0;
 - conserver à 4 °C pendant 12 à 24 heures;
 - prélever la toxine dialysée des membranes et la conserver à 4 °C jusqu’à analyse ultérieure;
- effectuer une électrophorèse sur gel SDS-Page pour vérifier la pureté.

3.4.1.3 Activité de la protoxine et de la toxine Cry1Ab

Nous avons fait parvenir des échantillons de la toxine active que nous avons produite à Kees van Frankenhuyzen, du Service canadien des forêts, au Centre de foresterie des Grands Lacs (Sault Ste. Marie, Ontario, Canada) afin qu’il vérifie l’efficacité de notre méthode par des essais sur la Tordeuse des bourgeons de l’épinette (*Choristoneura fumiferana*).

3.4.2 Essais de toxicité

Pour faciliter les essais de toxicité, nous avons décidé d’employer des trousse commerciales produites par Microbiotests (Deinze, Belgique). Ces trousse contiennent des organismes d’essai sous forme enkystée dans des oeufs qui peuvent éclore juste avant le début des tests. Cela élimine le besoin de cultures continues et les coûts qui leur sont associés.

Cinq trousse ont été choisies au départ (Protoxkit FTM, Rotoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Daphtoxkit FTM magna et Ostracodtoxkit FTM), mais seulement trois ont été retenues pour l’analyse (Thamnotoxkit FTM, Daphtoxkit FTM magna et Ostracodtoxkit FTM). Le choix final était fondé sur la facilité d’emploi et la reproductibilité des résultats.

Le mode d’emploi de chaque trousse ne sera pas décrit en détail ici. Le lecteur est invité à consulter la page Web du fournisseur : <http://www.microbiotests.be/general.htm>. Nous expliquerons toutefois le principe de chaque trousse et mentionnerons les différentes concentrations des solutions testées.

3.4.2.1 Le Daphtoxkit FTM magna

Cette trousse utilise le crustacé *Daphnia magna* à l’état d’éphippies (oeufs dormants). Cet organisme est très utilisé pour déterminer la toxicité de différentes substances, effluents, etc. Sa sensibilité aux toxiques est bien connue. Environnement Canada, l’EPA américaine et d’autres

organismes gouvernementaux ont développé des bioessais normalisés qui emploient *Daphnia magna*. La sensibilité du Daphtoxkit F™ magna est similaire à celle des bioessais de toxicité normalisés.

Les éphippies sont placées dans de l'eau de culture et incubées pendant trois jours avant le début des essais de toxicité. Les tests sont effectués sur des plaques d'essai à puits multiples en polycarbonate comprenant six puits de rinçage et 24 puits pour les dilutions de la solution toxique, avec des néonates de ≤ 24 heures. Un témoin (eau seulement) et 5 concentrations en 5 répétitions peuvent être effectuées sur chaque plaque. Chaque puit contenait 10 mL de la solution d'essai et 5 néonates.

La concentration létale pour 50 % des organismes (CL_{50}) est déterminée après 24 et 48 heures d'exposition à 10 mL de la solution d'essai.

Pour chaque trousse, il est recommandé de faire un essai de contrôle avec le toxique de référence, le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). Les résultats devraient se situer dans les limites stipulées sur la feuille de spécification fournie avec la trousse. Un autre critère de la validité de l'essai est que le nombre de morts et d'organismes immobiles ne doit pas dépasser 10 % dans le groupe de contrôle. L'essai doit être répété si ce critère n'est pas respecté.

3.4.2.2 Le Thamnotoxkit F™

Cette trousse utilise le crustacé *Thamnocephalus platyurus*, connu pour sa plus grande sensibilité aux produits chimiques que *Streptocephalus proboscideus*, un crustacé couramment utilisée dans les bioessais (Centeno *et al.*, 1993). Beak International *et al.* (1999) ont montré que cette trousse permettait d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec l'essai conventionnel avec *Daphnia magna*.

Les kystes de *Thamnocephalus platyurus* éclosent 24 heures avant le début des essais de toxicité. Un test de CL_{50} de 24 heures est effectué sur une plaque de polystyrène. Chaque plaque contient 24 puits : six puits de rinçage, un témoin et cinq concentrations différentes en 3 répétitions dans les puits restants. Un millilitre de la solution d'essai est introduit dans chaque puit avec 10 larves.

L'essai de contrôle devrait être effectué avec du dichromate de potassium. Les résultats devraient se situer dans les limites indiquées sur la feuille de spécifications fournie avec chaque

trousse. De plus, le pourcentage de mortalité du groupe témoin ne devrait pas dépasser 10 %. Si cela se produit, le test n'est pas valide et il faut le recommencer.

3.4.2.3 L'Ostracodtoxit F™

Cette trousse sert à un test de toxicité de contact direct de six jours pour les sédiments d'eau douce. Toutefois, nous n'avons pas exposé l'Ostracode *Heterocypris incongruens* aux sédiments mais plutôt à des solutions d'essai. Les kystes d'ostracodes ont été placés dans de l'eau de culture 52 heures avant le début des essais. Les essais ont été effectués sur des plaques de 12 puits (soit pour un témoin et deux concentrations en quatre répétitions, ou pour trois concentrations en quatre répétitions), dans lesquels 10 mL de solution d'essai (incluant la nourriture algale en suspension) sont introduits avec 10 ostracodes.

L'inhibition de la croissance et le pourcentage de mortalité sont déterminés après six jours. La mortalité moyenne du groupe témoin ne doit pas dépasser 20 %, et la longueur moyenne des ostracodes doit atteindre au moins 400 µm. Si ces critères ne sont pas respectés, les essais sont invalides et doivent être recommencés.

3.4.2.4 Détermination des concentrations d'essai

Pour trouver la concentration à laquelle les organismes aquatiques seraient exposés durant un essai de toxicité, nous avons consulté des documents sur la toxicité de l'endotoxine Cry1Ab du Bt pour les organismes cibles (Crecchio et Stotzky, 1998; Tapp et Stotzky, 1995). La CL₅₀ dépend de l'espèce utilisée, la voie d'exposition et la forme de la toxine et peut varier de 0,9 à 26 µg/mL. Enfin, nous avons décidé d'exposer des organismes à 1, 5, 25, 50 et 125 µg/mL de toxine Cry1Ab du Bt.

Les organismes d'essai ont également été exposés à la protoxine et au tampon dans lequel les toxines étaient présentes après la purification ou la dialyse. Pour la protoxine, les concentrations d'essai étaient de 2, 10, 50, 100 et 250 µg/mL. Avant la dilution des solutions toxiques et des tampons, le pH a été ajusté à 8,5 (Tris-HCl 1 M).

4 Résultats

4.1 IDENTIFICATION DES AIRES D'ÉTUDE

4.1.1 Épandage de Bt

Antérieurement, le Bt était épandu sur les cultures de choux, de brocolis et de pommes de terre au Québec (ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec ou MAPAQ, communication personnelle). Cette pratique n'est plus suivie pour bon nombre de raisons, dont le coût élevé des biopesticides par rapport à celui des insecticides chimiques courants, la difficulté de leur application et leur faible résistance au soleil et à la pluie. Jean-Charles Côté, un chercheur spécialisé dans l'application du Bt en agriculture chez Agriculture et Agroalimentaire Canada à Saint-Jean-sur-le-Richelieu (Québec) nous a fourni des informations utiles. Il a également offert d'échantillonner pour nous un site expérimental d'épandage de Bt.

Pour le milieu urbain, nous avons contacté Jacques Boisvert (Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec), ainsi que GDG Environnement (Cap-de-la-Madeleine, Québec) et Sylvico (Longueuil, Québec), les deux principales entreprises d'épandage de Bt pour le contrôle des moustiques. M. Savignac, président de GDG Environnement, a accepté de révéler l'emplacement des sites d'épandage si nécessaire.

Pour le secteur forestier, nous avons contacté un organisme sans but lucratif, SOPFIM, qui se spécialise dans la protection des forêts contre les insectes et les maladies. Cet organisme utilise le Bt depuis de nombreuses années pour contrôler les insectes ravageurs, en particulier la Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*). Préoccupé par la persistance de l'insecticide Bt dans le sol et l'eau, Ghislain Rousseau nous a permis de prélever des échantillons sur les sites traités au Bt.

Après l'examen de toutes les informations existantes sur l'épandage du Bt dans ces trois secteurs d'activités, nous avons décidé de nous concentrer sur le secteur de la foresterie. Avec l'aide de M. Rousseau, qui a mentionné que son équipe avait remarqué la persistance du Bt dans le sol et l'eau après l'épandage, nous avons été capables d'identifier quelques sites en partant de la zone au nord de la rivière Gatineau jusqu'à Montréal en suivant la rivière des Outaouais (figure 2).

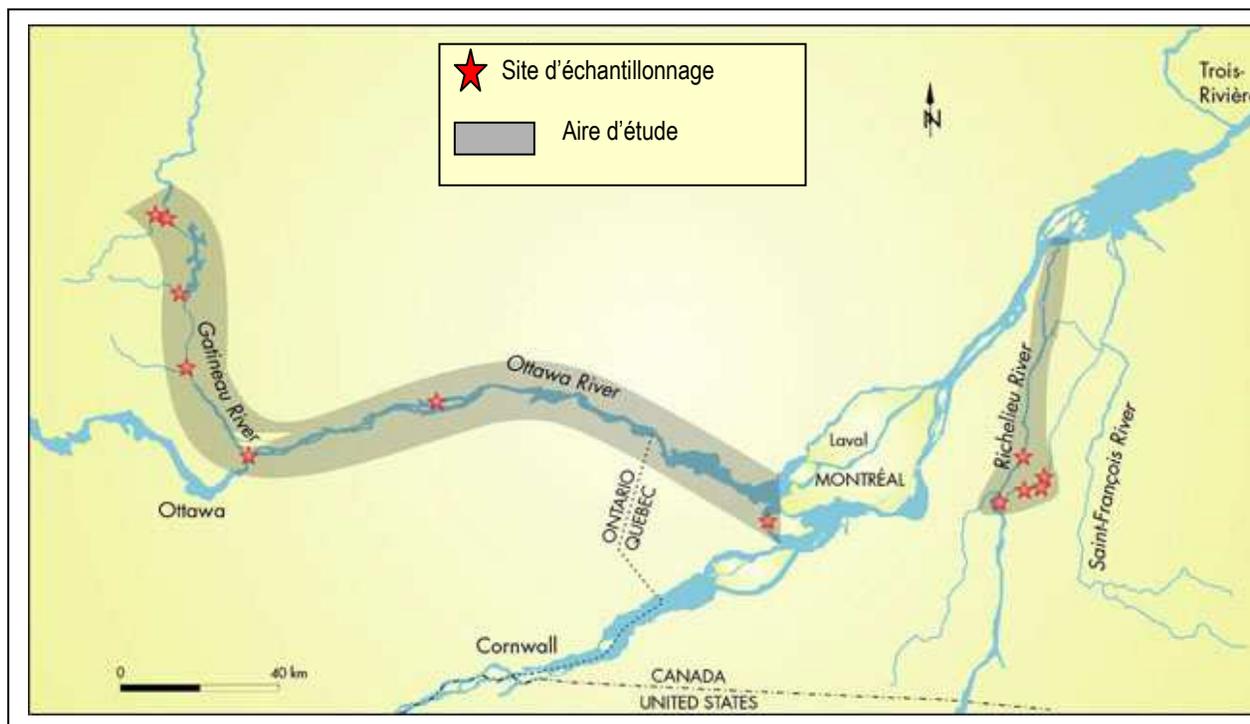


Figure 2 Aire d'étude

Le plan d'échantillonnage était le suivant : prélèvements d'échantillons avant l'épandage, deux ou trois semaines après et trois mois après. Les sédiments et les eaux de surface ont été échantillonnés.

4.1.2 Maïs Bt

Pour identifier les endroits où le maïs Bt était cultivé, nous avons étudié des cartes de différentes régions productrices de maïs, produites par le ministère de l'Environnement du Québec (MEQ). Nous avons alors contacté l'Union des producteurs agricoles (UPA) du Québec et Statistiques Canada afin d'obtenir de l'information sur la culture du maïs destiné à l'alimentation humaine et animale et sur les compagnies qui produisent du maïs Bt.

Nous avons obtenu l'information la plus pertinente sur le Bt de Bernard Lachance, du MAPAQ, à Saint-Hyacinthe (Québec), qui nous a aidés à identifier notre aire d'étude.

Nous avons décidé d'échantillonner dans le secteur de la rivière du Richelieu, où le maïs Bt est très cultivé (figure 2). Ainsi, le sol, les sédiments et les eaux de surface ont été échantillonnés à proximité de champs de maïs Bt dans les rivières des Hurons et Richelieu et le fleuve Saint-Laurent (Québec).

Nous avons décidé de prélever des échantillons trois fois par année :

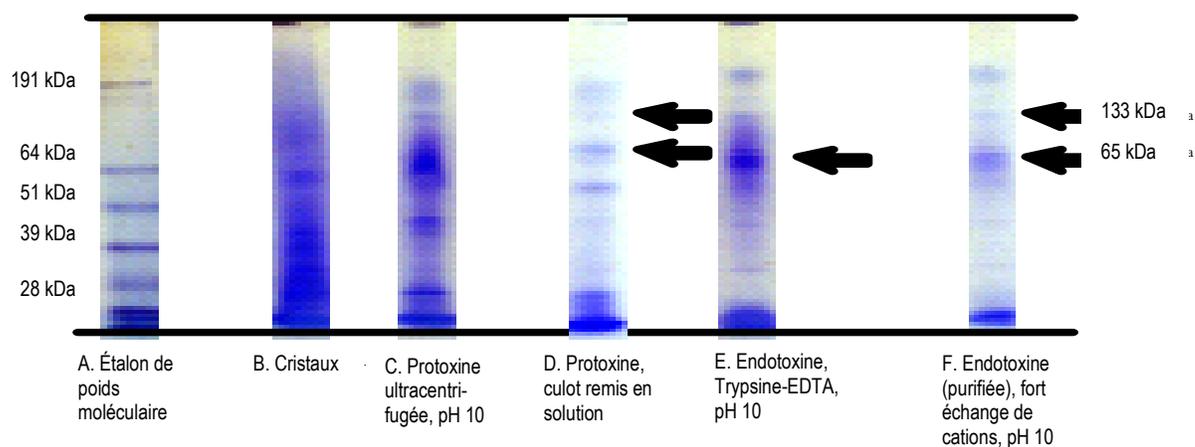
- avant l'ensemencement,
- deux à trois semaines après la pollinisation (à la fin d'août),
- deux à trois semaines après la récolte (à la fin de novembre).

4.2 TOXINES DU BT ET DU MAÏS BT

4.2.1 Caractérisation de Cry1Ab à partir de cultures de Bt

Dans le milieu naturel, la toxine Cry1Ab est habituellement trouvée sous la forme de cristaux qui sont insolubles dans l'eau à un pH de 6 à 8. En effet, l'analyse de l'électrophorèse sur gel de la forme cristalline de Cry1Ab a révélé que ces cristaux avaient une faible résolution (figure 3A). Lorsque le pH de la suspension de cristaux était augmenté à 10, le surnageant qui en résultait (après centrifugation à 200 000 g pendant 60 minutes à 4 °C) révélait des bandes à 135 kDa et 65 kDa. Le culot contenait également des traces de protéines. Il faut souligner que la suspension de cristaux, lorsqu'elle est solubilisée à un pH de 10, contient à la fois la toxine (65 kDa) et la protoxine (135 kDa). Cela indique que les cristaux de la souche *Bt kurstaki* dans des milieux avec un pH naturel ne pourraient être une source de la toxine Cry1Ab, à l'opposé du maïs Bt, qui ne produit que la forme toxique. Une purification supplémentaire du surnageant par un traitement à la trypsine-EDTA à un pH alcalin, suivie d'une chromatographie d'échange d'anions, montre un enrichissement de la fraction de 65 kDa par rapport à la protoxine. L'addition de cristaux Cry1Ab du Bt et de la toxine du maïs Bt à des échantillons de sol produit des changements importants (figure 3 B). La Cry1Ab du Bt se fragmente rapidement et produit une protéine de 54 kDa au cours de la première heure de mélange (et après réchauffement à 37 °C pendant 30 minutes) et disparaît rapidement après les jours 4 et 7. La toxine Cry1Ab du maïs Bt tend à disparaître aux jours 4 et 7. Le pH du tampon d'extraction n'influence pas la récupération des protéines ou de la toxine. Ces résultats indiquent que la protoxine et la toxine ne sont pas stables dans les échantillons de sol et tendent à se dégrader.

A



B

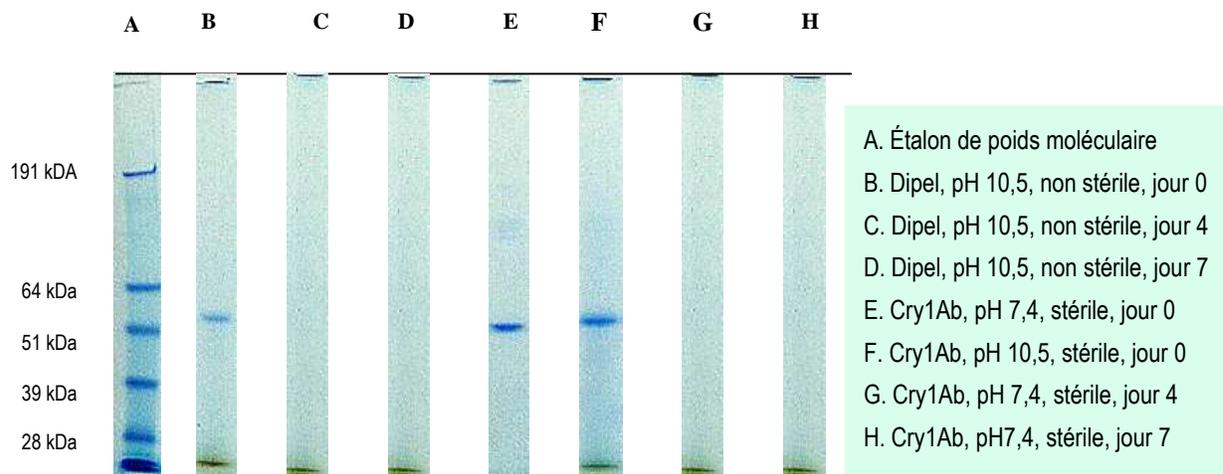
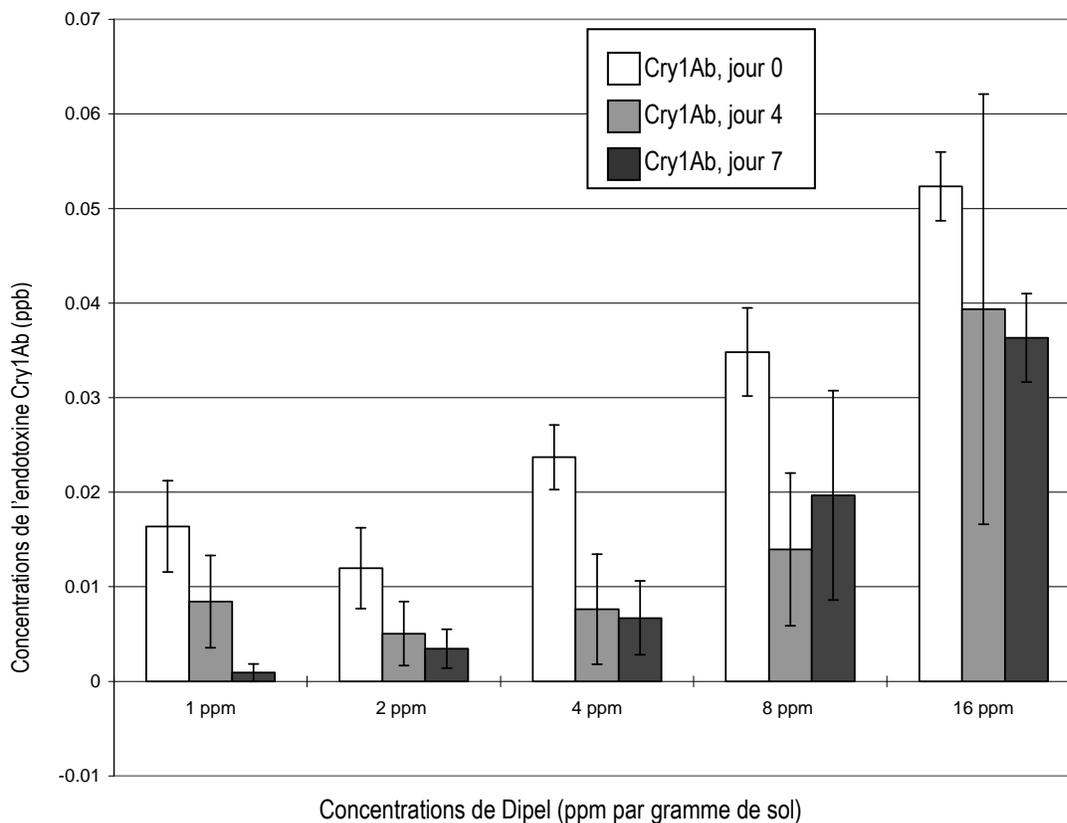


Figure 3 Formes moléculaires de Cry1Ab (A) et stabilité (B) dans des échantillons de sol

4.2.2 Persistance des cristaux de Bt dans les sols

Les concentrations de Cry1Ab dans les sols riches en silice et non stériles, extrait à un pH de 7,4, ont augmenté légèrement avec la dose de cristaux de Cry1Ab; ces concentrations ont

diminué dans les échantillons de sol après la période d'incubation (figure 4). Une analyse de la variance non paramétrique avec deux facteurs indique qu'ils (la concentration des cristaux ajoutés et le temps) ont eu une influence significative ($p < 0,05$) sur la quantité de Cry1Ab soluble. Toutefois, il n'y a pas eu interaction du temps et de la concentration, ce qui suggère que les protéines extractibles à pH 7,4 ne sont pas produites avec le temps (les protéines extractibles sont associées à la quantité initiale de cristaux ajoutés et se dégradent avec le temps dans le sol).

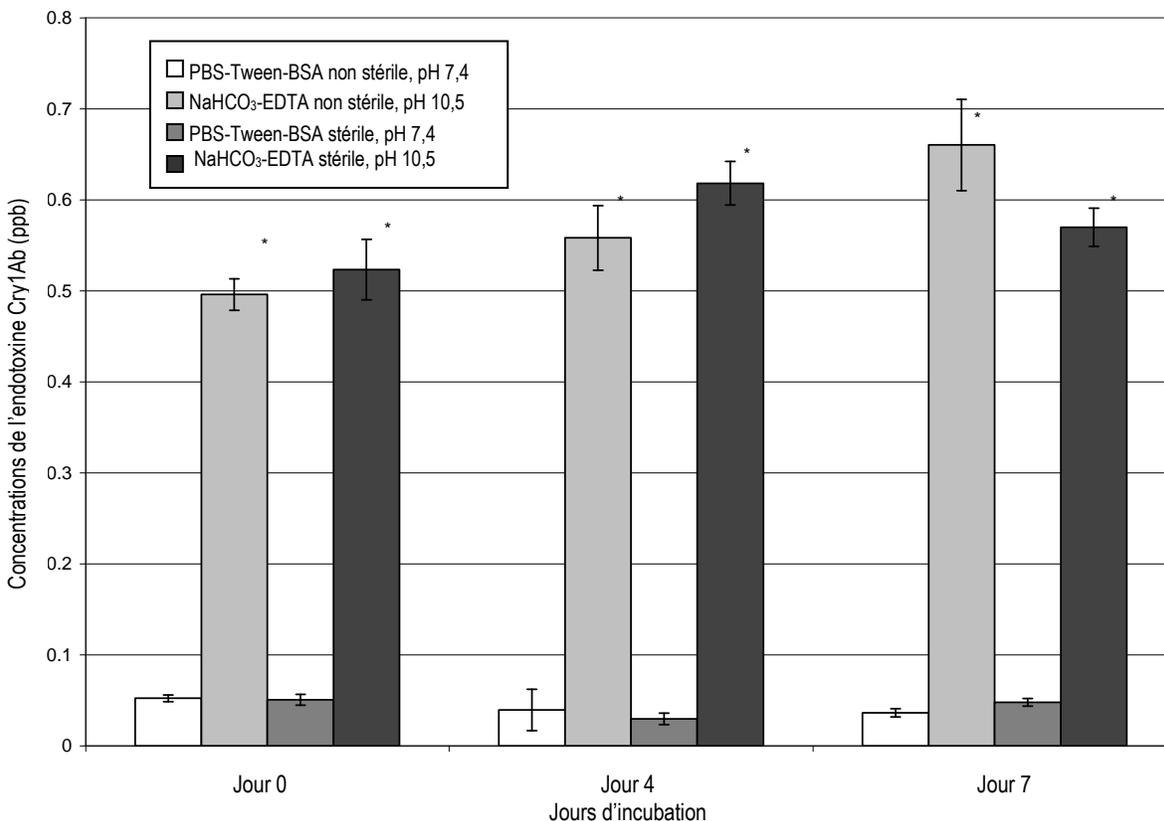


Remarque. – Limite de détection de la méthode = 0,14 ppb; moyenne \pm erreur standard.

Figure 4 **Persistance des cristaux de Cry1Ab dans des sols riches en silice**

Ces échantillons de sol ont également subi une extraction à pH 10 pour récupérer les cristaux afin de vérifier si la quantité totale de cristaux diminuait avec le temps (figure 5). Les résultats montrent que la quantité totale de cristaux (Cry1Ab extractible à pH 10) est demeurée

inchangée avec le temps, mais qu'il reste des résidus détectables de toxines solubles (environ 5 %). Cela indique qu'une petite fraction de Cry1Ab du Bt pourrait être extraite à pH 7,4 dans les échantillons environnementaux.



Remarque. – Les données représentent la moyenne avec une erreur-type de $n = 4$ répétitions; * Indique une différence significative entre les traitements.

Figure 5 Influence du pH dans l'extraction de la toxine Cry1Ab de sols riches en silice

La récupération de la toxine dans des sols riches en argile était plus faible que dans des sols riches en silice, que ce soit avec des tampons neutres ou alcalins, ce qui a entraîné une forte variation des répétitions des mêmes échantillons (résultats non présentés). Comme l'ont décrit Tapp *et al.* (1994) et Crecchio et Stotzky (1988), la toxine Cry1Ab du Bt *kurstaki* s'adsorbe et se lie aux particules de sol, surtout les particules d'argile et d'acides humiques, ce qui rend sa récupération extrêmement difficile. La toxine liée peut retenir sa bioactivité envers les insectes

cibles pendant 234 jours, puisque la toxine est moins disponible pour la dégradation microbienne (Tapp et Stotzky, 1998).

4.2.3 Persistance et demi-vie

4.2.3.1 Sols

Le mélange de la toxine Cry1Ab avec des sols riches en silice tend à diminuer sa concentration avec le temps (figure 6A). La demi-vie estimée ($t_{1/2}$) de la toxine Cry1Ab était de 10 jours dans des sols non stériles et de 9 jours dans des sols stériles. Les mêmes expériences ont été répétées avec des sols riches en argile, et les résultats montraient une tendance similaire, mais avec une plus grande variation (résultats non présentés). Comme mentionné précédemment, la toxine était adsorbée et liée aux particules d'argile, ce qui a résulté en une récupération moins efficace.

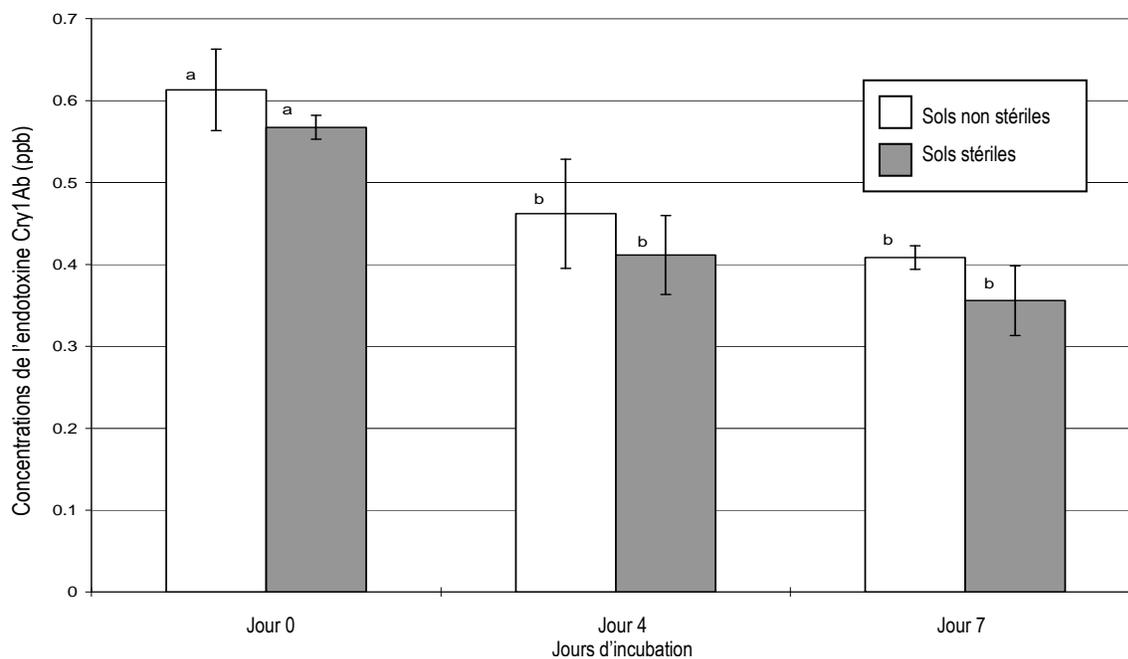
4.2.3.2 Eaux de surface

La stabilité de la toxine Cry1Ab dans les eaux de surface a fait également l'objet d'une étude (figure 6B). La présence de microorganismes dans les eaux de surface a un impact plus évident sur la persistance de la toxine. En effet, la demi-vie de la toxine était réduite dans l'eau non filtrée, avec une demi-vie estimée de 4,4 jours. L'élimination des microorganismes par filtration sur une membrane à pores de 0,22 μm a résulté en une absence de dégradation de la toxine même après sept jours.

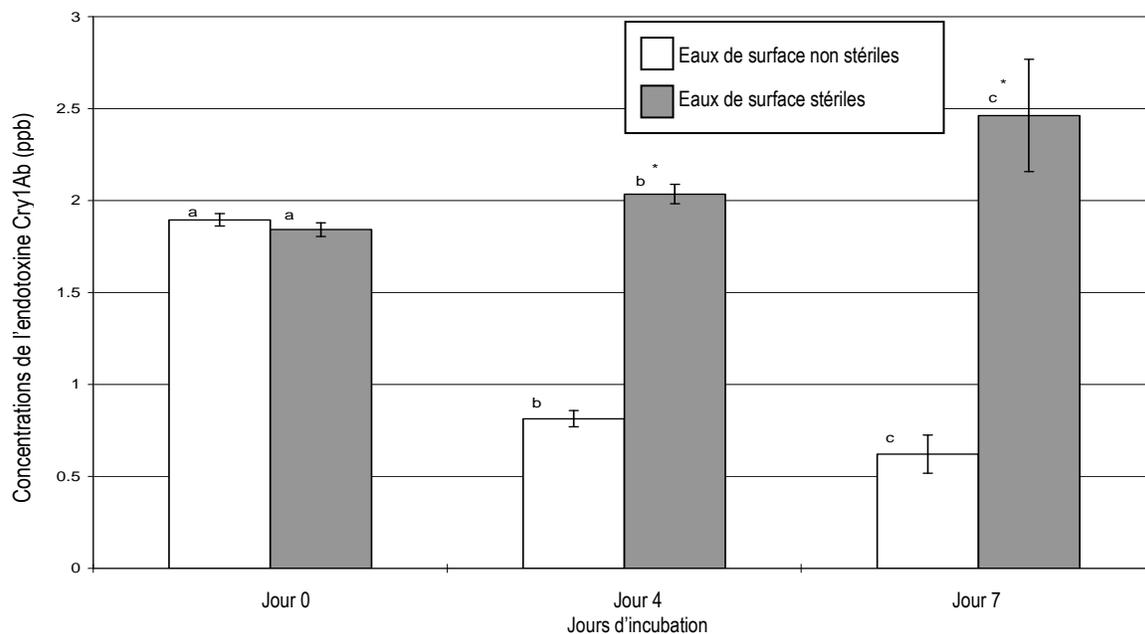
4.2.4 Analyse isotopique

Une autre façon de déterminer l'origine de Cry1Ab dans l'environnement consiste à faire l'analyse isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de Cry1Ab (figure 7). Une analyse isotopique de la toxine purifiée du Bt et du maïs Bt révèle qu'elle pourrait être distinguée facilement. En effet, la toxine Cry1Ab d'origine bactérienne contient plus d'isotopes lourds (^{13}C et ^{15}N) que celle d'origine végétale (maïs Bt) et par conséquent des éléments plus lourds. Ces résultats offrent la possibilité d'identifier les sources de Cry1Ab dans l'environnement.

A



B



Remarque. – Dans le même groupe – comme les stériles – différentes lettres indiquent une différence significative, alors qu'un astérisque signifie une différence significative entre les groupes.

Figure 6 Stabilité de Cry1Ab dans les sols riches en silice (A) et dans les eaux de surface (B)

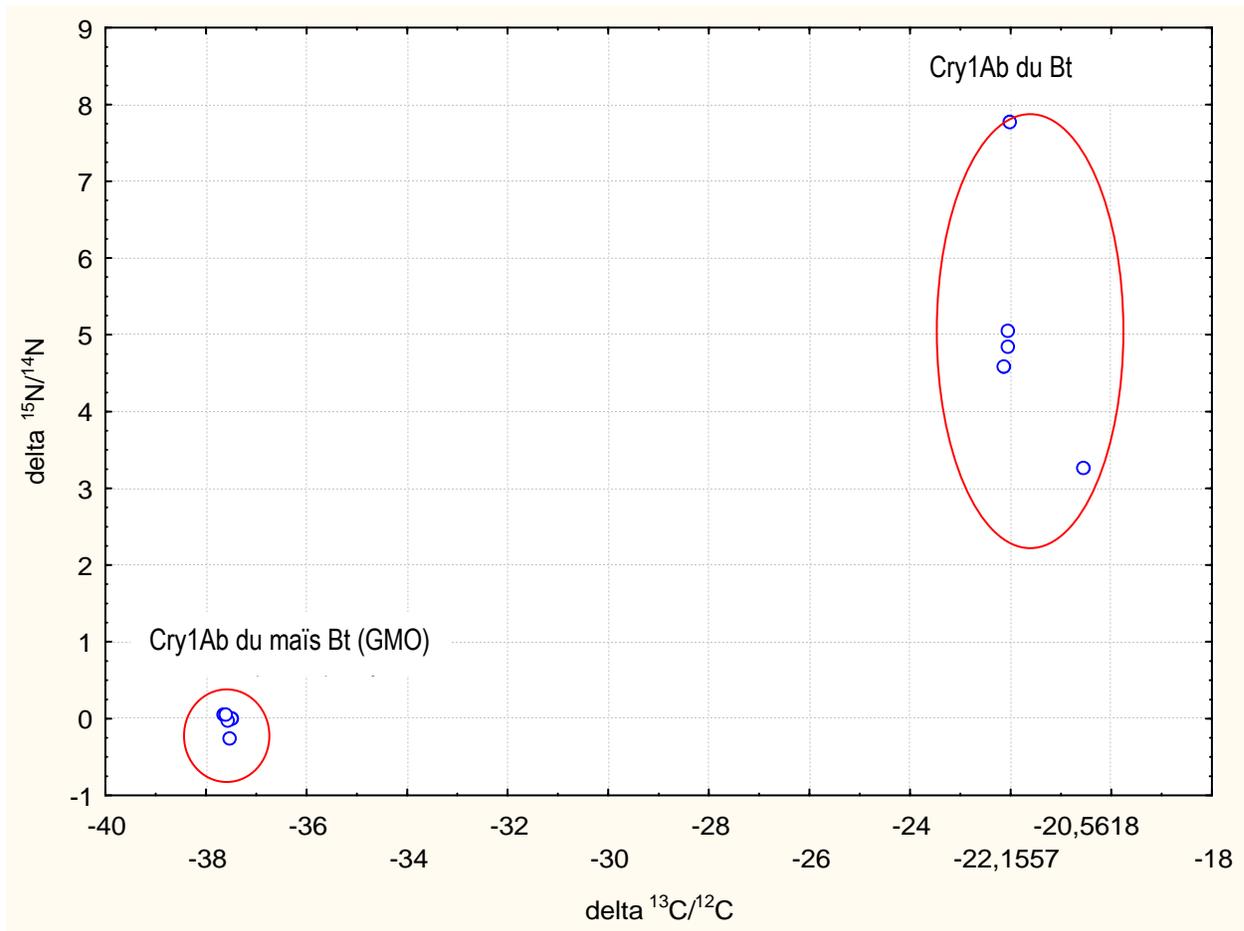


Figure 7 Analyse d'isotopes stables de carbone et d'azote dans des Cry1Ab d'origines bactériennes et végétales

4.2.5 Échantillons environnementaux

Les concentrations de la toxine Cry1Ab dans des échantillons environnementaux prélevés d'une zone traitée au Bt et d'un site à proximité d'un champs de maïs Bt sont présentées au tableau 1. Des traces de Cry1Ab extraite à pH 7,4 ont été trouvées aux deux endroits. Fait digne de remarque, la toxine Cry1Ab était plus répandue dans les sédiments en provenance de la région du champ de maïs Bt. Il n'y avait aucune corrélation significative entre les concentrations de Cry1Ab et le nombre de *Bacillus*, ce qui laisse croire que les concentrations de Cry1Ab ne sont pas liées à la présence de bactéries dans le sol des cultures de maïs Bt.

Tableau 1
Concentrations de Cry1Ab dans une zone arrosée au Bt
et au voisinage d'un champ de maïs Bt

Site	Milieu	Cry1Ab soluble (ppb)	Nombre total de <i>Bacillus</i> (FCU par mL ou g)
Champ de maïs			
	Eaux de surface		
	2 m en amont	< LD	< 10
<i>Après pollinisation</i>	2 m en aval	< LD	150
	2,5 km en aval (à la jonction de l'affluent 1)	< LD	230
	8,5 km en aval (dans l'affluent 1)	< LD	< 10
	16,5 km en aval (à la jonction de l'affluent 2)	< LD	< 10
	29,5 km en aval (dans l'affluent 2)	0,2	< 10
	82 km en aval (à la jonction du Saint-Laurent)	< LD	< 10
		Sédiments	
	2 m en amont	0,5	11 000
	2 m en aval	< LD	4 000
	2,5 km en aval (à la jonction de l'affluent 1)	< LD	8 000
	8,5 km en aval (dans l'affluent 1)	< LD	2 200
	16,5 km en aval (à la jonction de l'affluent 2)	< LD	500
	82 km en aval (à la jonction du Saint-Laurent)	< LD	10 000
	Sol		
	Sol (maïs sauvage)	< LD	13 000
	Sol (maïs Bt)	< LD	14 000
<hr/>			
<i>2 semaines après le labour</i>			
	Eaux de surface		
	2 m en amont	< LD	10
	2 m en aval	< LD	10
	2,5 km en aval (à la jonction de l'affluent 1)	< LD	< 10
	82 km en aval (à la jonction du Saint-Laurent)	< LD	< 10
	Sédiments		
	2 m en amont	0,7	7 700
	2 m en aval	0,9	910
	2,5 km en aval (à la jonction de l'affluent 1)	< LD	1 800
	82 km en aval (à la jonction du Saint-Laurent)	0,6	7 700
	Sol		
	Sol (maïs sauvage)	< LD	41 000
	Sol (maïs Bt)	0,3	14 000
<hr/>			
Zone traitée au Bt <i>kurstaki</i>			
Septembre 2001			
	Eaux de surface		
	Affluent 1 traité ^a	0,5	0,09*
	3 km en aval	0,2	ND
	27 km en aval (non traité) ^b	0,1	0,06*
	46 km en aval (à la jonction de l'affluent 2)	ND	ND
	74 km en aval (à la jonction de l'affluent 3)	0,6	ND
	121 km en aval (dans l'affluent 3)	0,3	ND
	214 km en aval (à la jonction du Saint-Laurent)	0,7	ND

Site	Milieu	Cry1Ab soluble (ppb)	Nombre total de <i>Bacillus</i> (FCU par mL ou g)
Sédiments			
	Affluent 1 traité ^a	ND	ND
	3 km en aval	ND	ND
	27 km en aval (non traité) ^b	2,0	ND
	46 km en aval (dans l'affluent 2)	ND	ND
	74 km en aval (à la jonction de l'affluent 3)	ND	ND
	121 km en aval (dans l'affluent 3)	0,7	ND
	214 km en aval (à la jonction du Saint-Laurent)	ND	ND

Remarque. – LD : limite de détection de la trousse ELISA (Envirologix) = 0,1 ppb; N.D. : non déterminé.

* Représente en fait le nombre de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* dans 10 000 FCU/L.

a Ce cours d'eau a été traité pour la première fois en 2001.

b Cours d'eau non traité en 2001 mais traité durant les cinq années précédentes.

4.3 GÈNES

L'extraction de l'ADN des échantillons de sol, de sédiments et d'eaux de surface n'a pas été concluante à cause de la présence d'acides humiques qui inhibent la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et de la contamination de certains échantillons par des amplicons générés par la PCR du maïs Dipel® et du maïs Bt. L'extraction a bien fonctionné dans le cas de ces deux derniers produits, et la PCR effectuée sur les extraits avec les amorces universelles (pour *cryI*) et maïs Bt MON810 a généré les bons amplicons (Dipel® : 276 paires de base; maïs Bt : 194 paires de base; figure 8).

La séquence de l'amplicon du maïs Bt est la suivante :

```
GATGTTTGGGTTGTtGTCCATGGCYGCTTGGTATCTSCATTACAATGAAATGA
GCAAAGACTATGTcAGTVACACTGGTCAACACTAGGGAGAAGGCATCGAGC
AAGAgAcGTATGTRAAGAGAAGCAATAtAGTgTCAGTKGGTAGAYACTAGAYA
CCATCAGGAGGTAAGGMGAcCMaCAAAAAGGMaACT
```

Après discussions avec M. Charles Greer (Institut de recherche en biotechnologie de Montréal) au sujet de l'extraction de l'ADN du sol, nous avons décidé d'employer une autre méthode d'extraction qui enlève les acides humiques des extraits. Cette méthode est décrite à l'annexe 4.

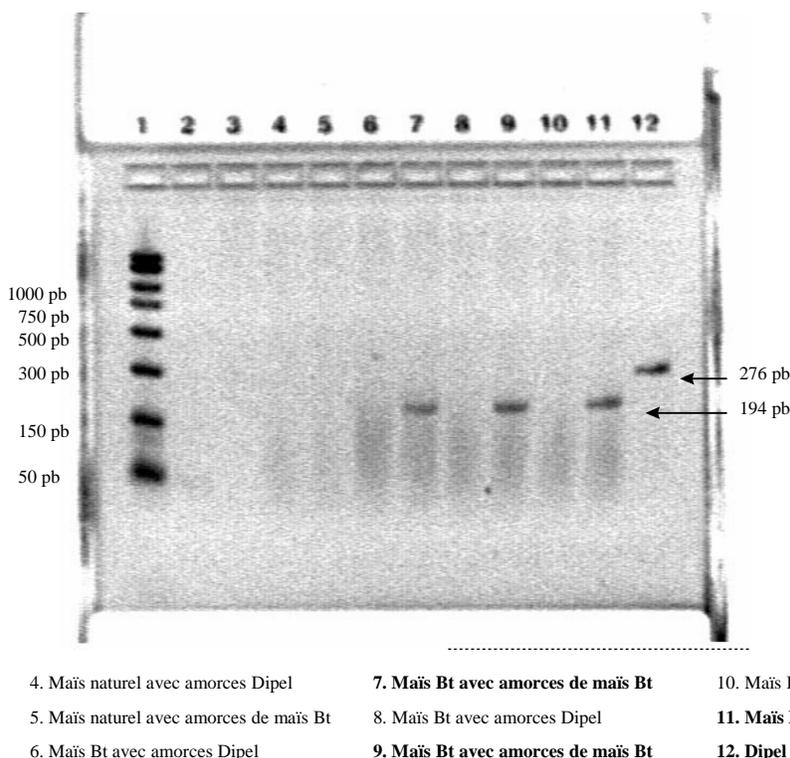


Figure 8 Électrophorèse des extraits de maïs Dipel® et Bt après la PCR

4.4 TOXICITÉ POUR LES ORGANISMES AQUATIQUES

Des échantillons de toxines ont été envoyés à M. van Frankenhuyzen pour vérifier leur bioactivité contre la Tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*, *Lepidoptera : Tortricidae*). Les résultats du bioessai ont indiqué que la toxine de Bt était inactive, aucun insecte étant mort durant l'essai. Ainsi, aucun bioessai n'a été réalisé avec des organismes aquatiques.

Les raisons possibles de l'absence de bioactivité sont :

- une dégradation rapide de la toxine après purification et ou neutralisation du pH;
- une contamination de la solution de toxines par d'autres protéines qui interfèrent avec l'essai de détermination du contenu en protéine, ce qui résulte en la surestimation de la concentration de la protéine Cry1Ab. Cela entraîne une sous-exposition des insectes.

Nous avons alors décidé d'exposer des organismes aquatiques à des extraits de protéines de maïs Bt. Aucun test de toxicité n'a été effectué avec cet extrait. Sa bioactivité contre l'organisme cible (la Tordeuse des bourgeons de l'épinette) doit être vérifiée. Ces tests seront effectués au printemps 2003.

5 Discussion

Les concentrations de Cry1Ab dans l'environnement proviennent probablement de sources diverses, incluant a) le Bt *kurstaki* (Bt-k) naturel ou d'autres sérotypes (Porcar et Caballero, 2000; Masson *et al.*, 1998) dans des lessivats; b) l'application de suspensions à base de Bt-k pour contrôler les infestations de larves de lépidoptères; et c) le lessivage de Cry1Ab à partir du maïs Bt (exsudat des racines, dégradation du pollen et des résidus du maïs). La présence du Bt-k naturel dans les sols est rare, comme l'ont montré DeLucca *et al.* (1981). En effet, ces auteurs ont trouvé que parmi un total de 46 373 isolats provenant de 115 champs, seulement 94 isolats contenaient du Bt-k (occurrence de 0,2 %), la seule variété qui avait été épanchée pendant 10 ans. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude, où la faible occurrence du gène *cryIAb*, comparée à celles de *cryIC*, *cryID* et *cryIE*, a été observée dans des habitats terrestres et aquatiques (Martinez et Caballero, 2002). La souche Bt-k n'exprime pas toujours *cryIAb*, ce qui montre la complexité des relations entre l'expression du gène *cryIAb*, ses sérotypes et sa toxicité. De surcroît, l'expression du gène *cryIA* du Bt suit un patron saisonnier, alors que les gènes *cryIAa* et *cryIC* sont souvent trouvés au printemps et que le gène *cryIAa* prédomine à l'automne (Kim *et al.*, 1998). Pourtant, l'épandage de Bt est une bonne source potentielle de Cry1Ab dans les champs agricoles, et les spores peuvent survivre longtemps après l'épandage (DeLucca *et al.*, 1981). Par conséquent, l'épandage de Cry1Ab sous forme de spores et de cristaux (comme Dipel®) pourrait contribuer au signal immunologique, comme le montre la présente étude. L'analyse de corrélation des concentrations de Cry1Ab dans l'environnement par rapport à la présence du gène *cryIAb* de la bactérie trouvées par les essais de PCR pourrait indiquer que les cristaux bactériens sont une source de contamination. Dans la présente étude, l'absence de corrélation entre le nombre total de *Bacillus* et les concentrations de Cry1Ab trouvée dans les échantillons de sols et de sédiments laisse croire que statistiquement au moins, la source la plus probable de Cry1Ab était le maïs Bt. Une corrélation positive a toutefois été trouvée dans des sols dopés au Dipel®. Du point de vue environnemental, le nouveau gène inséré devrait être muni d'un marqueur (comme une séquence précise d'acides aminés) qui permettrait de le différencier plus facilement du gène naturel (le *cryIAb* du Bt).

L'analyse isotopique offre la possibilité d'identifier les sources de Cry1Ab dans le milieu aquatique. En effet, les organismes au bas de la chaîne alimentaire (les décomposeurs) contiennent des éléments plus lourds que les organismes situés plus haut (producteurs primaires et secondaires) (Wada *et al.*, 1991). Ceci a été confirmé par des fractions purifiées de Cry1Ab du Bt et du maïs Bt dans cette étude. Cette approche a l'avantage de pouvoir identifier les sources de Cry1Ab dans des échantillons environnementaux bien qu'il soit nécessaire de procéder à de longues étapes de préparation et de purification pour obtenir des quantités adéquates de Cry1Ab de pureté suffisante.

La persistance de cette toxine semble reliée principalement aux propriétés des sols et des eaux de surface. La toxine Cry1Ab a été trouvée dans la rhizosphère de sols cultivés au maïs Bt, comme l'ont déterminé des essais immunologiques et de toxicité avec des larves (Saxena et Stotzky, 2001). La présente étude a trouvé que la demi-vie de la toxine Cry1Ab était de 4 à 10 jours, selon la présence de microorganismes dans les eaux de surface et les sols. À notre connaissance, c'est la première fois que l'on rapporte la persistance de la toxine Cry1Ab dans les eaux de surface. Le Bt *kurstaki* a survécu relativement longtemps (50 % de survie jusqu'à 55 jours) dans de l'eau distillée, de l'eau du robinet, de l'eau de lac et de l'eau de mer (Menon et De Mastral, 1985). La survie du Bt *kurstaki* suivait l'ordre suivant : eau de mer < eau distillée \approx eau du robinet < eau de lac. Ces auteurs ont également montré que la quantité de chlore résiduel utilisée dans les systèmes de traitement des eaux ne semblait pas suffire à détruire cette souche de Bt. L'argile semble agir comme un puit pour ces toxines, augmentant la demi-vie de la toxine et réduisant sa disponibilité pour la biodégradation et la toxicité (Saxena *et al.*, 2002; Stotzky, 2000).

L'exposition du pollen de maïs Bt à la lumière ultraviolette pour plus de 240 heures (10 jours) semble n'avoir aucun effet sur la concentration de Cry1Ab et sur sa toxicité pour les larves d'*Ostrinia nubilalis* (Ohlfest *et al.*, 2002). Une autre étude a constaté que la protéine Cry1F des cristaux d'insecticide dans le plant de maïs *Zea mays* L. se dégradait rapidement, avec une demi-vie de 0,6 jour et un temps de dégradation de 6,9 jours 90 % du temps (Herman *et al.*, 2002). En se fondant sur l'analyse de l'électrophorèse sur gel, la présente étude a trouvé que la toxine Cry1Ab du maïs Bt se dégradait très rapidement. La forme cristalline de Cry1Ab est relativement stable dans les échantillons de sol qui nécessitent des milieux alcalins et des protéases pour

produire la protoxine et la toxine Cry1Ab, bien qu'une petite fraction de la toxine Cry1Ab ait pu être récupérée à pH 7,4 comme on l'a déterminé par un essai immunologique.

À partir de travaux de terrain récents, des traces de Cry1Ab extractible à pH 7,4 ont été trouvées dans des cultures de maïs Bt et dans des milieux arrosés au Bt *kurstaki*. Ces constatations concordent avec les analyses en laboratoire de sols et d'eaux de surface dopés avec des cristaux de Cry1Ab montrant une libération de la protéine dans la fraction soluble à pH 7,4. La présence de Cry1Ab extraite à pH 7,4 devrait être étudiée en fonction de la Cry1Ab extraite en milieu alcalin (de cristaux). Si les concentrations de Cry1Ab extraite à pH 7,4 sont corrélées significativement avec celles à pH 10,5, alors la source probable de Cry1Ab serait les cristaux de Bt. L'absence de corrélation entre Cry1Ab en conditions neutres et alcalines indiquerait que les cultures génétiquement modifiées exprimant Cry1Ab sont la source. Dans la présente étude, la source de Cry1Ab extraite à pH 7,4 de la zone de culture de maïs Bt n'a pas été identifiée, bien qu'une absence de corrélation avec le nombre de *Bacillus* ait été observée. Parce que toutes les souches de *Bacillus* ou même de Bt *kurstaki* n'expriment pas toujours la protéine (Martinez et Caballero, 2002), la corrélation devrait être vérifiée soit en fonction de la présence de cristaux dans l'environnement (avec la Cry1Ab extraite en milieu alcalin) ou de la présence de gènes *cry1Ab* d'origine bactérienne. Cependant, une analyse isotopique stable semble être une méthode plus définitive pour trouver l'origine de Cry1Ab dans l'environnement. Les valeurs $\delta^{15}\text{N}$ pour la Cry1Ab provenant du maïs Bt sont équivalentes à celles trouvées pour le maïs naturel (Wada *et al.*, 1991). Toutefois, les valeurs $\delta^{13}\text{N}$ de Cry1Ab étaient très faibles et se rapprochaient plus des légumes à C3 que des plantes à C4, où le maïs est associé avec ce dernier type d'assimilation du carbone. Si cela s'avère exact, le maïs Bt perdrait sa capacité d'incorporer le CO_2 dans un composé à 4 atomes de carbone comme l'oxaloacétate, une étape qui précède la fixation du CO_2 dans le cycle C3. Cette signature isotopique pourrait également indiquer que le maïs a été cultivé à des températures fraîches. Cette hypothèse est confirmée par l'observation que des homogénats de feuille de maïs Bt ($\delta^{13}\text{C} = 16,16 \pm 0,08$) contiennent beaucoup moins de $\delta^{13}\text{C}$ que le maïs naturel ($\delta^{13}\text{C} = -15,22 \pm 0,16$; test de *t*, $p < 0,001$) dans la même région. Cette hypothèse devrait, bien sûr, être vérifiée avec des essais plus précis.

En conclusion, les concentrations de Cry1Ab dans des conditions neutres et alcalines pourraient constituer une méthode peu coûteuse pour l'examen préalable de cette toxine dans

l'environnement. Dans les échantillons montrant une absence de corrélation entre les conditions alcalines et neutres, une analyse isotopique pourrait être employée afin de confirmer la présence de Cry1Ab provenant de cultures génétiquement modifiées ou de bactéries.

Références

- Aljanabi, S.M. et I. Martinez (1997). « Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques ». *Nucleic Acids Research*, 25 (22) : 4692-4693.
- Beak International, Environnement Canada et J. Ford Co. (1999). *Évaluation de micro-bioessais pour la surveillance et l'identification de la toxicité des effluents de l'industrie papetière*. Fiche « Technologies Saint-Laurent – Eaux usées industrielles ». Environnement Canada – Région du Québec, Direction de la protection de l'environnement.
- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khamraev, E. Troiskaya, E.A. Dubitsky, N. Berezina et Y. Margalith (1997). « Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis* ». *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12) : 4883-4890.
- Bester, M.J., H.C. Potgieter et W.J.H. Vermaak (1994). « Cholate and pH reduce interference by sodium dodecyl sulfate in the determination of DNA with Hoescht ». *Analytical Biochemistry*, 223 (2) : 299-305.
- Centeno, M.D., L. Brendonck et G. Persoone (1993). « Biological/ecological characteristics of large freshwater branchiopods from endorheic regions and consequences for their use in cyst-based toxicity tests » dans A.M.V.M. Soares et P. Calow (éd.), *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests*. Lewis Publishers.
- Chiueh, L.C., Y.L. Chen, J.H. Yu et D.Y.C. Shih (2001). « Detection of four types of genetically modified maize by polymerase chain reaction and immuno-kit methods ». *Journal of Food and Drug Analysis*, 9 (1) : 50-57.
- Crecchio, C. et G. Stotzky (1998). « Insecticidal activity and biodegradation of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soils ». *Soil Biology and Biochemistry*, 30 : 463-470.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J.H. Baum et D. Dean (1998). « Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3) : 807-813.
- DeLucca, A.J., J.G. Simonson et A.D. Larson (1981). « *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States ». *Canadian Journal of Microbiology*, 27 : 865-870.
- Dickman, M. (2000). « Impacts of a mosquito selective pesticide, Bti, on the macroinvertebrates of a subtropical stream in Hong Kong ». *Chemosphere*, 41 (1-2) : 209–217.

- Doucet, R. (1994). *La science agricole : climat, sols et productions végétales du Québec*. Éditions Berger, Eastman (Québec). 699 pages.
- Environnement Canada (2002). *Non-Pesticidal Control of Insects*. Fiche produite par la Direction de la protection de l'environnement, Région de l'Atlantique. http://www.ns.ec.gc.ca/epb/factsheets/pesticides/non_pest.html
- Giroux, I., M. Duchemin et M. Roy (1997). *Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture intensive de maïs au Québec. Campagnes d'échantillonnage de 1994 et 1995*. Ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction des écosystèmes aquatiques. Envirodoq EN970099, rapport PES-8, 60 pages.
- Herman, R.A., J.D. Wolt et W.R. Halliday (2002). « Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 : 7076-7078.
- Hudon, M., W.H. Foott et P. Martel (1985). *Insectes nuisibles au maïs dans l'est du Canada*. Agriculture Canada. http://www.agr.gc.ca/cal/epub/1788f/1788_cover_f.html.
- Joung K.B. et J.C. Côté (2000). *A Review of the Environmental Impacts of the Microbial Insecticide Bacillus thuringiensis*. Bulletin technique n° 29. Sur le site Internet d'Agriculture et Agroalimentaire Canada : http://res2.agr.gc.ca/stjean/publication/bulletin/bacillus_thuringiensis_e.pdf
- Kim, H.S., D.W. Lee, S.D. Woo, Y.M. Yu et S.K. Kang (1998). « Seasonal distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from sericultural environments in Korea ». *Journal of General and Applied Microbiology*, 44 : 133-138.
- Kondo, S., M. Fujiwara, M. Ohba et T. Ishii (1995). « Comparative larvicidal activities of the four *Bacillus thuringiensis* serovars against a chironomid midge, *Paratanytarsus grimmii* (Diptera: Chironomidae) ». *Microbiological Research*, 150 (4) : 425-428.
- Losey, J.E., L.S. Rayor et M. Carter (1999). « Transgenic pollen harms monarch larvae ». *Nature*, 399 (6733) : 214.
- Luo, K., D. Banks et M.J. Adang (1999). « Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* ». *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2) : 457-464.
- MAPAQ – Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (2002). Communications personnelles avec les bureaux de L'Assomption, Saint-Rémi et Sainte-Martine.
- Martineau, R. (1985). *Insectes nuisibles des forêts de l'est du Canada*. Éditions Marcel Broquet, La Prairie (Québec). 283 pages.

- Martinez, C. et P. Caballero (2002). « Contents of Cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats ». *Journal of Applied Microbiology*, 92 : 745-752.
- Masson, L., M. Erlandson, M. Puzstai-Carey, R. Brousseau, V. Juarez-Pérez et R. Frutos (1998). « A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains ». *Applied and Environmental Microbiology*, 64 : 4782-4788.
- Masson, L., Y.J. Lu, A. Mazza, R. Brousseau et M.J. Adang (1995). « The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities ». *Journal of Biological Chemistry*, 270 (35) : 20309-20315.
- Meadows, J., S.S. Gill et L.W. Bone (1990). « *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti* ». *Invertebrate Reproduction and Development*, 17 : 73-76.
- Menon A.S. et J. De Mastral (1985). « Survival of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in waters ». *Water, Air, and Soil Pollution*, 25 : 265-274.
- Nester, E.W., L.S. Thomashow, M. Metz et M. Gordon (2002). *100 years of Bacillus thuringiensis: A Critical Scientific Assessment*. American Academy of Microbiology, Washington, DC. 18 pages.
- Ohlfest, J.R., L.C.H. Jesse, R. Jurenka et J.J. Obrycki (2002). « Stability of insecticidal Cry 1Ab protein in transgenic Bt corn pollen exposed to UV irradiation ». *Journal of the Kansas Entomological Society*, 75 : 48-51.
- Porcar, M. et P. Caballero (2000). « Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic event ». *Journal of Applied Microbiology*, 89 : 309-316.
- Ren, Z., E. Ma et Y. Guo (2002). « Chromosome aberration assays for the study of cyclophosphamide and *Bacillus thuringiensis* in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae) ». *Mutation Research*, 520 (1-2) : 141-150.
- Rigby, S. (1991). *Bt in Crop Protection*. PJB Publications, Richmond, Surrey, UK.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^e édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxena, D. et G. Stotzky (2001). « *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria and fungi in soil ». *Soil Biology and Biochemistry*, 33 : 1225-1230.
- Saxena, D., S. Flores et G. Stotzky (2002). « Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events ». *Soil Biology and Biochemistry*, 34 : 133-137.

- Saxena, D., S. Flores et G. Stotzky (1999). « Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn ». *Nature*, 402 : 480.
- SOPFIM – Société de la protection des forêts contre les insectes et maladies (1992). *Programme quinquennal (1993-1997) de pulvérisations aériennes d'insecticides contre certains insectes forestiers. Tome 1 – Tordeuse des bourgeons de l'épinette*. Étude d'impact environnemental réalisée par Lavalin Environnement Inc. (1991) pour la SOPFIM, Quebec.
- Stotzky, G. (2000). « Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids ». *Journal of Environmental Quality*, 29 : 691-705.
- Tapp, H. et G. Stotzky (1998). « Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil ». *Soil Biology and Biochemistry*, 30 (4) : 471-476.
- Tapp, H. et G. Stotzky (1995). « Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays ». *Applied and Environmental Microbiology*, 61 : 1786-1790.
- Tapp, H., L. Calamai et G. Stotzky (1994). « Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals ». *Soil Biology and Biochemistry*, 26 (6) : 663-679.
- Wada, E., H. Mizutani et M. Minagawa (1991). « The use of stable isotopes for food web analysis ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30 : 361-371.

Annexes

1 Composition des solutions

A. Protéines

Tampons d'extraction

Tampon neutre :

- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) : NaCl 150 mM, KH_2PO_4 5mM, NaHCO_3 1 mM, pH de 7,4,
- Tween 20 : 0,2 %,
- Albumine sérique de bovin (BSA) : 1 %.

Tampon alcalin :

- NaHCO_3 100 mM,
- Acide éthylène diamino tétraacétique (EDTA) 10 mM, pH de 10,5.

B. ADN

Tampon d'homogénéisation des grains de maïs

- NaCl 0,4 M,
- Tris-HCl 10 mM, pH de 8,0,
- Acide éthylène diamino tétraacétique (EDTA) 2 mM.

TE

- Tris-HCl 10 mM à pH 8,0
- NaCl 100 mM
- EDTA 1 mM

2 Méthode de dénombrement

Le dénombrement de Bt a été effectué par Bodycote Division Envirolab de Sainte-Foy (Québec).

Méthode pour les sols et sédiments

- Ajouter 225 mL d'eau peptonée 0,1 % à 25 g d'échantillon;
- mélanger 2 minutes;
- étaler 0,2 mL sur 10 géloses MYP*;
- incuber 24 ± 2 heures à 35 ± 5 °C;
- dénombrer les colonies de *Bacillus*; et
- confirmer la présence de *Bacillus thuringiensis* en utilisant la coloration de Smirnoff sur un frottis pour identifier les cristaux.

Méthode pour les eaux de surface

- Laver le filtre avec de l'eau peptonée;
- filtrer 100 mL d'eau;
- ajouter de l'eau peptonée et rincer le filtre;
- placer le filtre sur de la gélose MYP*;
- incuber 24 ± 2 heures à 35 ± 5 °C;
- dénombrer les colonies de *Bacillus*; et
- confirmer la présence de *Bacillus thuringiensis* en utilisant la coloration de Smirnoff sur un frottis pour identifier les cristaux.

* Gélose MYP : milieu sélectif et différentiel développé par D.A.A. Mossel, M.J. Koopmann et E. Jongerius et décrit dans *Applied Microbiology*, 1967, vol. 15, pp. 650-653.

3 Cultures de Bt

Préparation du milieu liquide et des préparations de sels

Milieu liquide

- 7,5 g de NaCl/1,5 L;
- 7,5 g d'extrait de levure/1,5 L;
- 12,0 g de bactotryptone/1,5 L;
- agar 1,5 % (w/v);
- verser 25 mL de ce milieu dans des boîtes de Pétri en plastique stériles sous une hotte biologique;
- exposer à la lumière ultraviolette jusqu'à ce que le milieu ait refroidi;
- mettre les boîtes de Pétri dans des sacs de plastique, deux par sac; sceller et placer au réfrigérateur.

Préparation de sels PGSM

- 12,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /500 mL;
- 0,2 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /500 mL;
- 1,4 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /500 mL;
- 2,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /500 mL;
- acidifier au besoin à pH 6,0-6,5 avec un acide stérilisé;
- filtrer pour stériliser.

Préparation de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- 18,3 g/500 mL;
- filtrer pour stériliser;
- le milieu peut devenir un peu trouble après addition de la solution.

Congélation du Bt

Le Bt est inoculé dans une solution de glycérol à 50 % (v/v) et congelé à -80°C .

Méthode

- Préparer une solution de glycérol 50 % (v/v) avec du NaCl 150 mM;

- autoclaver la solution
- introduire 500 μL de cette solution dans un tube stérile pour centrifugation de 2 mL;
- ajouter 500 μL de culture de Bt (100 mL) en phase de croissance exponentielle (densité optique de 0,6 à 600 nm);
- entreposer les tubes à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

4 Extraction de l'ADN des sols

A. Méthode

Étapes de lavage

- Ajouter 1 mL de tampon pour sol (voir ci-dessous) à 0,5 g d'échantillon et mélanger à l'agitateur Vortex pendant 30 secondes, puis inverser pendant 1 minute et 30 secondes;
- centrifuger à 6000 tr/min pendant 5 minutes à 4 °C, puis retirer le surnageant;
- ajouter 1 mL de tampon de lavage 2 (voir ci-dessous) au culot et mélanger à l'agitateur Vortex pendant 30 secondes, puis inverser pendant 1 minute et 30 secondes;
- centrifuger à 6000 tr/min pendant 5 minutes à 4 °C, puis retirer le surnageant;
- ajouter 1 mL de tampon de lavage 3 (voir ci-dessous) et mélanger à l'agitateur Vortex pendant 30 secondes, puis inverser pendant 1 minute et 30 secondes;
- centrifuger à 6000 tr/min pendant 5 minutes à 4 °C, puis retirer le surnageant.

Étapes d'extraction

- Ajouter 450 µL d'eau distillée stérilisée au culot et mélanger à l'agitateur Vortex pendant environ 2 secondes pour déloger le culot;
- ajouter 50 µL de Tris-HCl 250 mM à pH 8,0 contenant 5 mg de lysozyme;
- incuber à 30 °C et mélanger en inversant pendant 30 minutes;
- transférer dans un bain d'eau à 37 °C, incuber pour 30 autres minutes et mélanger en inversant toutes les 10 minutes;
- ajouter 5 µL de protéinase K (20 mg/mL), incuber pendant 1 heure à 37 °C et mélanger en inversant toutes les 10 minutes;
- ajouter 50 µL de SDS 20 %, incuber à 85 °C pendant 30 minutes et mélanger doucement en inversant toutes les 10 minutes;
- centrifuger à 13 000 tr/min (13 600 g) pendant 10 minutes à température ambiante dans une microcentrifugeuse, puis transférer le surnageant dans un tube pour centrifugation de 1,5 mL;
- ajouter ½ volume d'acétate d'ammonium 7,5 M, mélanger doucement en inversant et incuber sur glace pendant 15 minutes;
- centrifuger à 13 000 tr/min (13 600 g) pendant 5 minutes à 4 °C, puis transférer le surnageant dans deux tubes pour centrifugation de 1,5 mL;

- ajouter 1 volume d'isopropanol froid et précipiter l'ADN à -20 °C jusqu'au lendemain;
- centrifuger à 14 000 tr/min (15 800 g) pendant 15 minutes à 4 °C et décanter le surnageant;
- laver le culot avec 500 µL d'éthanol à 70 % et taper doucement le tube ou mélanger en l'inversant;
- centrifuger à 14 000 tr/min (15 800 g) pendant 5 minutes à 4 °C et décanter le surnageant;
- sécher le culot à l'air (pendant environ 30 minutes); et
- ajouter 200 µL de TE à pH 8,0 (voir ci-dessous) au culot (100 µL par tube), placer sur de la glace, puis sur une plaque agitatrice pour permettre au culot de se dissoudre lentement (environ 1 heure) et combiner l'ADN des tubes.

Étapes de purification

- Ajouter du polyvinylpolypyrrolidone lavé à l'acide (PVPP, voir ci-dessous) dans une solution de phosphate de potassium 20 mM (pH 7,0) dans des colonnes vides et stériles pour microcentrifugation placées à l'intérieur d'un tube de microcentrifugeuse et centrifuger à 2900 tr/min (735 g) pendant 3 minutes à température ambiante;
- jeter tout liquide accumulé dans le tube;
- insérer l'extrait d'ADN (50 à 100 µL) dans le centre de la colonne en veillant à ne pas toucher les parois de la colonne;
- centrifuger à 2900 tr/min pendant 3 minutes à température ambiante en s'assurant que la face inclinée de la colonne remplie fait face au milieu de la centrifugeuse; et
- entreposer l'extrait propre d'ADN à -20 °C.

B. Tampons de lavage

Tampon pour les sols

- Tris-HCl 50 mM à pH 8,3
- NaCl 200 mM
- EDTA 5 mM
- Triton X-100 0,05 %

Tampon de lavage 2

- Tris-HCl 50 mM à pH 8,3

- NaCl 200 mM
- EDTA 5 mM

Tampon de lavage 3

- Tris-HCl 10 mM à pH 8,3
- EDTA 0,1 mM

C. Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) lavé à l'acide

- Suspendre 150 g de PVPP insoluble dans 4 L de HCl 3 M et agiter pendant 12 à 16 heures à température ambiante;
- laisser décanter le PVPP et enlever le surnageant;
- suspendre le PVPP dans 4 L d'eau distillée, mélanger pendant 4 heures et laisser décanter jusqu'au lendemain à 4 °C;
- enlever le surnageant;
- placer le PVPP dans une bouteille en plastique et centrifuger à 2000 tr/min pendant 8 minutes;
- enlever le surnageant;
- ajouter 4 L de phosphate de potassium 20 mM (pH 7,4) et mélanger pendant 4 heures; et
- répéter jusqu'à ce que le pH atteigne 7,0.