



Revue semestrielle – Université Ferhat Abbas Sétif 1

REVUE AGRICULTURE



## Les protéines insecticides binaires Vip1, Vip2 de la souche entomopathogène *Bacillus thuringiensis*

Sellami Sameh<sup>1,\*</sup>, Tounsi Slim<sup>1</sup> et Kais Jamoussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Biopesticides, B .P. "1177" 3018. Sfax, Tunisie\* Auteur correspondant: Laboratoire des Biopesticides, Centre de Biotechnologie de Sfax

E-mail : sellamisameh@gmail.com

Tel. /Fax: +216 74 440453

### ARTICLE INFO

Reçu : 01/06/2106

Accepté : 15/07/2106

#### Mots Clés :

**Mots clés :** *Bacillus thuringiensis*, Vip1, Vip2, coléoptère.

#### Key words:

*Bacillus thuringiensis*, Vip1, Vip2, coleopteran.

### RÉSUMÉ

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie utilisée mondialement en tant qu'insecticide biologique. Elle est caractérisée par la sécrétion des protéines insecticides Vips (Vegetative Insecticidal Proteins) au cours de la phase de croissance végétative. On distingue 4 classes des protéines Vip : Vip1, Vip2, Vip3 et Vip4. Les protéines Vip3 sont actives contre les lépidoptères tel que *Agrotis ipsilon* (Noctuelle baignée), alors que des toxines binaires Vip1 et Vip2 sont toxiques pour les coléoptères, essentiellement la chrysomèle des racines du maïs ou *Diabrotica virgifera virgifera*. La protéine Vip1 est le composant de fixation aux cellules intestinales, alors que Vip2 est une ADP-ribosyltransférase qui cible l'actine des cellules en empêchant sa polymérisation. Au cours de cette revue nous envisageons de résumer toutes les caractéristiques des protéines Vip1, Vip2, ainsi que leurs modes d'action.

#### Abstract

*Bacillus thuringiensis* is an entomopathogenic bacterium used as a biopesticide. It is characterized by the secretion of the vegetative insecticidal proteins Vips during the vegetative growth phase. We noted the presence of four classes of Vip proteins: Vip1, Vip2, Vip3 and Vip4. Vip3 proteins are active against the lepidopteran larvae like *Agrotis ipsilon* however; Vip1 and Vip2 binary toxins are toxic against the coleopteran larvae, essentially towards the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. Vip1 protein is the component used for the binding to the midgut cells; however, Vip2 is an ADP-ribosyltransferase which alters the actin of the midgut cells and inhibits its polymerization. During this report, we resumed all the characteristics related to Vip1, Vip2 proteins and their mode of action.

### 1. Introduction

*Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) est une bactérie sous forme de bâtonnet, à Gram positif, aérobie et sporulante. Durant sa phase végétative (active), *B. thuringiensis* possède une longueur de 5 µm et une largeur de 1 µm et est pourvue de flagelles. C'est une bactérie ubiquitaire, ce qui signifie que l'on peut la retrouver un peu partout dans la nature; que ce soit dans le sol, sur le feuillage, dans l'eau et même dans l'air (Carlton et Gonzalez, 1985). Elle fait partie du groupe *Bacillus cereus* qui comprend six espèces dont *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoïdes* et *Bacillus weihenstephanensis*. Par ailleurs, elle est étroitement liée à *Bacillus cereus* mais elle se distingue par la présence des mégaplasmides de tailles de 2 à 250 kb (McDowell et al., 1991) portant entre autres les gènes qui codent pour les protoxines Cry formant des cristaux protéiques actifs sur une panoplie de larves d'insectes appartenant à différents ordres parmi lesquels les coléoptères (coccinelles), les lépidoptères (papillons) et les diptères (mouches) (Schnepf et al., 1998).

En plus des protéines « Cry », certaines souches de *B.thuringiensis* produisent au cours de la phase de croissance végétative des protéines solubles douées également d'activité insecticide : il s'agit des protéines Vip1, Vip2, Vip3 et Vip4. Ces protéines Vips (Vegetative Insecticidal Proteins) sont connues comme des bioinsecticides de deuxième génération. Elles ne présentent aucune homologie avec les  $\delta$ -endotoxines et possèdent une activité insecticide sur un large spectre d'insectes (Hernandez-Rodriguez et al. 2009 ; Feitelson et al. 1992; Schnepf et al., 1998). Jusqu'à maintenant, il y a environ 15 gènes *vip1*, 20 gènes *vip2*, 101 gènes *vip3*, et 1 seul gène *vip4* qui ont été isolés (Crickmore et al., 2016). Les données relatives à la protéine Vip4 demeurent encore inconnues. Les protéines Vip3 (80-90 kDa) sont actifs sur un large spectre de larves de lépidoptères tels qu'*Agrotis ipsilon* et *Spodoptera frugiperda*, alors que les protéines Vip1, Vip2 sont actives sur les coléoptères, essentiellement la chrysomèle des racines du maïs ou *Diabrotica virgifera virgifera*. Ces dernières appartiennent à la famille des toxines bactériennes binaires, ressemblant aux toxines clostridiales mammifères de la famille C2 et aux toxines iota (Fang et al., 2007). Au cours de cette revue, nous nous sommes intéressés à récapituler toutes les études réalisées sur les protéines insecticides Vip1, Vip2.

## 2. Caractéristiques Générales des protéines Vip1 et Vip2

Les protéines Vip1 et Vip 2 sont produites par certaines souches de *B. thuringiensis* ainsi que d'autres souches comme *Bacillus cereus* (Jucovic et al., 2008), *Bacillus sphaericus* (Ramasamy et al., 2008) et *Brevibacillus laterosporus*. Elles sont codées par le même opéron où l'espace intergénique entre les deux ORFs est de 4 pb.

La toxine binaire Vip produite par *B. thuringiensis* ssp. *toumanoffi* HD201 appartient à la famille des "actin-ADP-ribosylating toxins" qui est un groupe distinct des toxines A-B où (A) : Vip2Ac responsable de l'activité enzymatique et (B) : Vip1Ac responsable de la translocation du composant A à travers la membrane cellulaire (Barth et al., 2004). Ces deux polypeptides constituant la protéine binaire sont actifs sur les larves de certains coléoptères tels que les chrysomèles des racines du maïs *Diabrotica virgifera virgifera* (Jucovic et al., 2008) et *Diabrotica barberi* (Ellis et al., 2002 ; Warren et al., 1997) ou encore la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis*. Ces ravageurs sont faiblement affectés par les  $\delta$ -endotoxines.

La combinaison de deux types de toxines constituerait une stratégie préventive de résistance aux toxines de *B. thuringiensis*. Ainsi, si un insecte acquiert une résistance à l'une des toxines, l'autre toxine pourrait agir et éviter les dégâts qui peuvent avoir lieu.

### 2.1. Distribution et localisation des gènes *vip1*, *vip2*

L'étude de la distribution des gènes *vip1*, *vip2* a démontré qu'ils se trouvent dans environ 10 % des souches de *B. thuringiensis* (Warren et al., 1997; Hernández-Rodríguez et al., 2009 ; Sattar et al., 2008 ; Shingote et al., 2013). La propagation des gènes *vip3* dans la nature est plus remarquable et plus importante que celle des gènes *vip1* et *vip2* (Hernández-Rodríguez et al., 2009). D'autre part, Espinasse et al. (2003) ont montré que la distribution des protéines secrétées Vip3, Cry1I, Vip1, Vip2 et la  $\beta$ -exotoxine chez *B. thuringiensis* n'est pas faite au hasard et qu'il existe un lien entre elles. En effet, ils ont trouvé que les souches qui produisent les  $\beta$ -exotoxines hébergent les gènes *vip1* et *vip2* et que celles qui possèdent les gènes *vip3*, disposent aussi des gènes *cry1I*. Ceci suggère que les déterminants génétiques des 4 gènes sont plasmidiques. Ce résultat a été prouvé par Mesrati et al., 2005 qui a démontré que les gènes *vip3* et *cry1I* sont plasmidiques et portés par le même plasmide. Egalement, Gonzalez et al., (1982) et Levinson et al., (1990) ont montré que les déterminants génétiques intervenant dans la synthèse des  $\beta$ -exotoxine sont présents au niveau du même plasmide que quelques gènes *cry*. Des études récentes ont également prouvé la localisation plasmidique des gènes *vip1*, *vip2* (Murawska et al., 2013 ; Bi et al., 2015).

### 2.2. Expression des protéines Vip1, Vip2 et activité insecticide

Les gènes *vip1*, *vip2* sont codés par le même opéron et sont séparés par un espace intergénique de 4 pb. Les deux gènes sont exprimés d'une manière simultanée et leurs traduction à partir du même transcrit est essentielle pour assurer des taux élevés d'expression des deux protéines. La transcription des gènes *vip1*, *vip2* commence au début de la phase exponentielle, se poursuit pendant la phase stationnaire et se maintient avec des taux élevés pendant la phase de sporulation (Bi et al., 2015 ; Shi et al., 2004 ; 2007).

La toxicité des protéines Vip1, Vip2 a été réalisée sur plusieurs espèces d'insectes appartenant à différents ordres (coléoptère, lépidoptère, diptère, hémiptère et nématodes). La toxicité s'est détectée pour plusieurs espèces de coléoptères (Tableau 1), mais également pour l'espèce d'hémiptère *Aphis gossypii* (Sattar and Maiti, 2011).

**Tableau 1:** Exemples de protéines Vip1, Vip2 actives sur les coléoptères

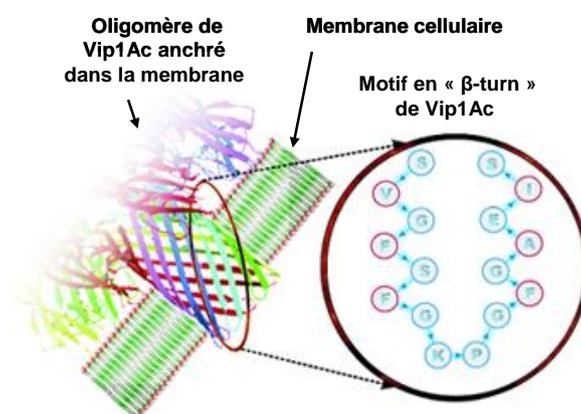
Protéine	Espèces d'insectes	Activité insecticide (LC <sub>50</sub> )	Références
Vip1Aa/Vip2Aa	<i>Diabrotica longicornis barberi</i> <i>Diabrotica undecimpuncta tahowardi</i> <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	ND ND 40/20 ng/g diet	Warren et al., 1997
Vip1Ad+Vip2Ag	<i>Anomala corpulenta</i> <i>Holotrichia oblita</i> <i>Holotrichia parallela</i>	(220 ng/g soil) (120 ng/g soil) (80 ng/g soil)	Bi et al., 2015
Vip1Da+Vip2Ad	<i>Anthonomus grandis</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	(207 µg/ml) (37 ng/ml)	Boets et al., 2011
Protéines Vip1, Vip2 ayant 88% de similarité avec Vip2Ac et Vip1Ac	<i>S. zeamais</i>	ND	Shingoteet et al., 2013b

ND: non déterminé

LC<sub>50</sub>: concentration létale pour 50% des larves

### 2.3. Les protéines Vip1

Les protéines Vip1 sont de 60 à 100 kDa et possèdent un peptide signal au niveau de la partie N-terminale responsable de sa sécrétion vers le milieu extracellulaire (Ramasamy et al., 2008 ; Leuber et al., 2006). La séquence primaire de la protéine Vip1Ac a présenté des similarités de séquence aux composants C2-II des toxines C2 produites par *Clostridium botulinum* (29% d'identité) et aux composants Ib des toxines Iota de *Clostridium perfringens* (31% d'identité). La protéine oligomérique Vip1Ac a été purifiée sous forme native, ce qui a permis de constater *in vitro* qu'elle forme un canal oligomérique, ionique et sélectif d'anions en présence d'une membrane de bicouche lipidique (Jucovic et al., 2008 ; Leuber et al., 2006). Il a été démontré que des feuilletts  $\beta$  se rassemblent pour former une structure en «  $\beta$ -turn » transmembranaire où les résidus hydrophobes sont du côté de la bicouche lipidique et les résidus hydrophiles sont du côté de la lumière du canal. L'oligomérisation de la protéine active Vip1A après l'interaction avec un récepteur donné serait une étape essentielle pour la formation des pores qui seront le chemin putatif du passage de Vip2 (Figure 1).



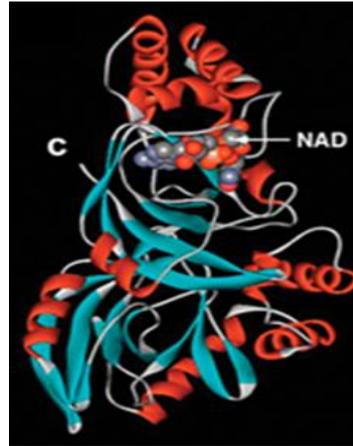
**Figure 1 :** Modèle de l'oligomère de Vip1Ac de *B. thuringiensis* intégré dans la membrane cellulaire de l'insecte cible et formant un canal ionique qui permettrait la translocation de Vip2Ac (Leuber et al., 2006).

### 2.4. Les protéines Vip2

La protéine Vip2 est une ADP-ribosyl transférase, NAD dépendante d'environ 45 kDa, possédant un peptide signal au niveau de la partie N-terminale responsable de sa sécrétion vers le milieu extracellulaire (Ramasamy et al., 2008 ; Leuber et al., 2006).

Des alignements de séquences ont montré que la protéine Vip2Ac de *Bacillus cereus* présente des similarités avec d'autres composants enzymatiques de plusieurs toxines binaires, de 95% avec Vip2Aa de *Bacillus cereus*, de 89% avec Vip2Ab de *B. thuringiensis* et de 36-38% d'identité avec les toxines C2 produites par *Clostridium botulinum* (Aktories et al., 1986), "iota toxins" de *C. perfringens* (Stiles et Wilkens 1986), les toxines de *C. spiroforme* (Simpson et al., 1989) et de *C. difficile* (Popoff et al., 1988).

La structure cristalline de Vip2A(c) de *B. cereus* a montré qu'elle est formée d'un mélange de structures  $\alpha/\beta$  formant deux domaines N-terminal (résidus 60-265) et C-terminal (résidus 266-461) ayant une homologie structurale entre eux malgré qu'ils ne montrent que 24% d'identité de séquence. Chaque domaine est formé d'un noyau sous forme d'un « sandwich  $\beta$  » constitué de 5 feuillets  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_4, \beta_8, \beta_7, \beta_2$ ) au niveau du domaine N-terminal;  $\beta_9, \beta_{12}, \beta_{16}, \beta_{15}, \beta_{10}$  au niveau du domaine C-terminal) et 3 autres feuillets  $\beta$  antiparallèles ( $\beta_3, \beta_6, \beta_5$ ) au niveau du domaine N-terminal;  $\beta_{11}, \beta_{14}, \beta_{13}$  au niveau du domaine C-terminal). Autour de ce noyau sont arrangées 5 hélices  $\alpha$  consécutives ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5$ ) au niveau du domaine N-terminal ;  $\alpha_6, \alpha_7, \alpha_8, \alpha_9, \alpha_{10}$  au niveau du domaine C-terminal) (Tsuge et *al.*, 2003 ; Han et *al.*, 1999 ; Barth et *al.*, 1998). La structure cristalline du complexe Vip2Ac-NAD a montré que la liaison de la molécule NAD se fait au niveau de la séquence C-terminale qui joue le rôle du domaine enzymatique (Figure 2).

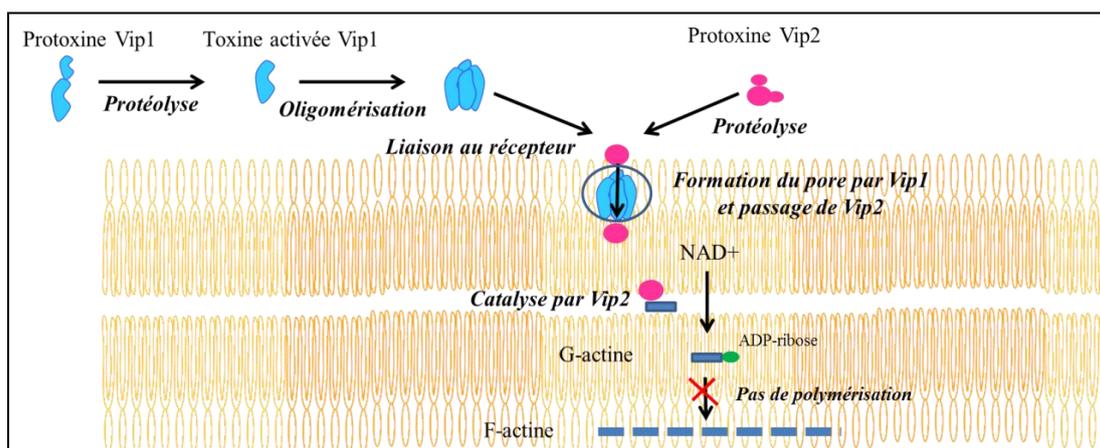


**Figure 2 :** Structure 3D de la protéine Vip2 de *B. cereus* avec la molécule NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (Han et *al.*, 1999).

### 2.5. Mode d'action des protéines Vip2-Vip1

Leuber et *al.* (2006) ont proposé une succession d'étapes résumant l'action des protéines Vip1 et Vip2. En effet, une fois ingérées par la larve cible, la protoxine Vip1 subit un clivage protéolytique grâce au pH alcalin (9-11) de l'intestin larvaire et à la présence des protéases de type trypsine-like. La protéine Vip1 ainsi activée va se lier sous forme d'oligomères à des récepteurs spécifiques se trouvant au niveau des microvillosités de l'intestin moyen des larves cibles sous la forme d'une structure en «  $\beta$ -turn » transmembranaire (Figure 3).

A l'état naturel, la polymérisation de l'actine G au niveau du cytosquelette des cellules intestinales de l'insecte forme des polymères d'actine nommés actines fibrillaires (actine F). Ces derniers constituent des cellules normales et un intestin fonctionnel. La protéine Vip2 en tant que ADP ribosyltransférase catalyse le transfert d'un groupement ADP et d'un groupement ribose liés à une molécule appelée NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) vers les monomères d'actine G (Globulaire) au niveau de l'arginine en position 177, inhibant ainsi la polymérisation des micro-filaments et la formation de l'actine polymérique, d'où la disruption de l'intégrité du cytosquelette cellulaire et de la membrane cytoplasmique causant ainsi la mort de l'insecte (Barth et *al.*, 2004 ; Han et *al.*, 1999).



**Figure 3** : Modèle proposé du mode d'action des protéines binaires Vip1, Vip2

### 2.6. Expression des protéines Vip1, Vip2 chez les plantes

Malgré l'importance économique des protéines Vip1, Vip2 puisqu'elles sont très actives vis-à-vis du ravageur le plus intéressant du maïs *Diabrotica virgifera virgifera*, leurs expressions dans les plantes s'avère non réalisable dû à l'activité enzymatique de la protéine Vip2. C'est pour cette raison que Jucovic et al. (2008) ont exprimé la protéine Vip2 sous une forme de zymogène appelé « ProVip2 ». En effet, la partie C-terminale de Vip2 était étendue de telle façon que l'activité enzymatique a été masquée. Par la suite, il a été démontré que les larves d'insectes *Diabrotica virgifera virgifera* alimentées par des échantillons de maïs transgénique avec « ProVip2 » ont été mortes et la partie ajoutée au niveau de la séquence C-terminale de Vip2 a été éliminée par les enzymes protéolytiques de l'intestin des larves d'insectes.

### 3. Conclusion

Les toxines Vip1, Vip2 se considèrent comme une classe de toxines à effet biopesticide très promoteur essentiellement pour contourner les problèmes de résistance aux autres toxines insecticides utilisées d'une manière excessive.

### Références Bibliographiques

- Aktories, K., Ankenbauer, T., Schering, B. and Jakobs, K.H. (1986) ADP-ribosylation of platelet actin by botulinum C2 toxin. *Eur. J. Biochem.* 161,155–162.
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M.R. and Stiles, B.G. (2004) Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 373-402.
- Barth, H., Blöcker, D., Behlke, J., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Benz, R. and Aktories, K. (2000) Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J Biol Chem.* 275, 18704–18711.
- Barth, H., Preiss, J.C., Hofmann, F. and Aktories, K. (1998) Characterization of the catalytic site of the ADP-ribosyltransferase *Clostridium botulinum* C2 toxin by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 29506–29511.
- Bi Y, Zhang Y, Shu C, Crickmore N, Wang Q, Du L, Song F, Zhang J. 2015. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to *Scarabaeoidea* larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:753-60.
- Carlton, B.C., Gonzalez, J.M. (1985) Plasmids and  $\beta$ -endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. In: Hoch, J.A., Setlow, P. (Eds.), *Molecular Biology of*
- Crickmore, N., Zeigler, DR., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. and Dean, DH. (2011) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Ellis, R.T., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, H.E., Schwab, G.E., Knuth, M., Russell, J., Cardineau, G.A. and Narva K.E. (2002) Novel *Bacillus thuringiensis* Binary Insecticidal Crystal Proteins Active on Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1137-1145.
- Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D. and Sanchis, V. (2003) Occurrence and Linkage Between Secreted Insecticidal Toxins in Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 47, 501-507.
- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J.-Z., Shelton, A.M., Cheng, J., Feng, M.G. and Shen, Z. (2007) Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 956-961.

- Feitelson JS, Schnepf HE, Narva KE, Stockhoff BA, Schmeits J, Loewer D, Dullum CJ, Muller-cohn J, Stamp L, Morrill G, Finstad-lee S. 2003. Pesticidal toxins and nucleotide sequences which encode these toxins. U S Patent No. 6,656,908,B2.
- Gonzalez, J.M. Jr, Brown, B.J. and Carlton, B.C. (1982) Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 6951-6955.
- Han, S., Craig, J.A., Putnam, C.D., Carozzi, N.B. and Tainer, J.A. (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. Nat. Struct. Biol. 6, 932–936.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Boets, A., Van Rie, J. and Ferré, J. (2009) Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. J Appl Microbiol.107, 219-25.
- Jucovic, M., Walters, F.S., Warren, G.W., Palekar, N.V. and Chen, J.S. (2008) From enzyme to zymogen: engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity. Protein Eng. Des. Sel. 21, 631-638.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A. and Benz, R. (2006). Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. Biochemistry. 45, 283-288.
- Levinson, B.L., Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.C., González, J.M. Jr. (1990) Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. J.Bacteriol. 172, 3172-3179.
- McDowell, DG. and Mann, NH. (1991) Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD1-DIPEL. Plasmid. 25, 113-120.
- Mesrati, A.L., Tounsi, S. and Jaoua, S. (2005 a) Characterization of a novel *vip3*-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid.FEMS Microbiol. Lett. 244, 353-358. Microbial Differentiation. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 246–252.
- Murawska E, Fiedoruk K, Bideshi DK, Swiecicka I. 2013. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain IS5056, an isolate highly toxic to *Trichoplusiani*. Genome Announc1:e00108-13.
- Popoff, M.R. and Boquet, P. (1988) *Clostridium spiroforme* toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin. Biochem.Biophys. Res. Commun. 152, 1361–1368.
- Ramasamy, B., Nadarajah, V.D., Soong, Z.K., Lee, H.L. and Mohammad, S.M. (2008) A preliminary study of the bioactivity of vegetative proteins extracted from Malaysian *Bacillus thuringiensis* isolates. Trop Biomed. 25, 64-74.
- Sampurna Sattar, Pradip K. Biswas, Munshi A. Hossain, Mrinal K. Maiti, Soumitra K. Sen and Asitava Basu. Search for Vegetative Insecticidal Proteins (VIPs) from local isolates of *Bacillus thuringiensis* effective against lepidopteran and homopteran insect pests. Journal of Biopesticides 1: 216-222.
- Sattar S, Maiti MK. 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. J. Microbiol. Biotechnol 21: 937-946.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dan, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Mol. Biol.Rev. 62, 775-806.
- Shi Y, Xu W, Yuan M, Tang M, Chen J, Pang Y. 2004. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. J; Appl. Microbiol. 97:757–765.
- Shi, Yongxia., Ma, Wenli., Yuan, Meijin. ,Sun, Fan. and Pang, Yi. (2007) Cloning of *vip1/vip2* genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. World J. Microbio. Biot. 23, 501-507.
- Shingote PR, Moharil MP, Dhumale DR, Deshmukh AG, Jadhav PV, Dudhare MS, Satpute NS.2013a. Distribution of *vip* genes, protein profiling and determination of entomopathogenic potential of local isolates of *Bacillus thuringiensis*. Bt Res 4:14-20.
- Simpson, L.L. (1989) The binary toxin produced by *Clostridium botulinum* enters cells by receptor-mediated endocytosis to exert its pharmacologic effects. J. Pharmacol. Exp. Ther.251, 1223–1228.
- Stiles, B.G. and Wilkens, T.D. (1986) Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two non linked proteins for biological activity. Infect. Immun. 54, 683–688.
- Tsuge, H., Nagahama, M., Nishimura, H., Hisatsune, J., Sakaguchi, Y., Itogawa, Y.,Katunuma, N. and Sakurai, J. (2003) Crystal structure and site-directed mutagenesis of enzymatic components from *Clostridium perfringens* iota-toxin. J. Mol. Biol. 325, 471-483.
- Warren, G.W. (1997) Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of cornpests. In advances in insect control, the role of transgenic plants (Carozzi, N.B. and Koziel,M. Eds.) Taylors, and Francis, Ltd, p. 109-121.