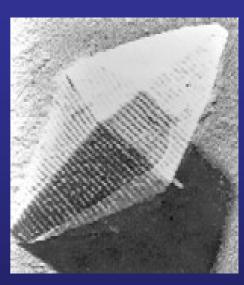
Bacillus thuringiensis: modes d'action et résistance





Jean-Michel Vassal

Cirad – UMR CBGP

Centre de Biologie et de Gestion des Populations

Montpellier; France

GERICO Ouagadougou 2004 UMR CBGP - Centre de Biologie et de Gestion des populations









Bacillus thuringiensis (Berliner)

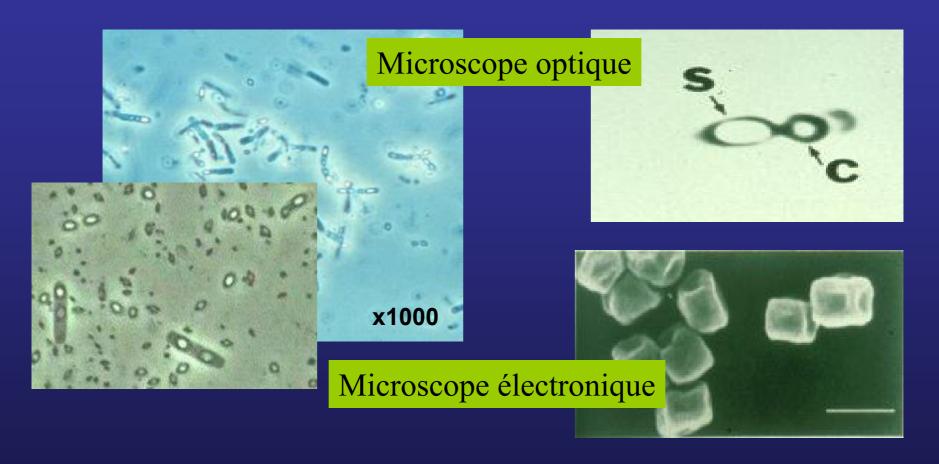
La bactérie

- Historique
- Les toxines et leur classification
- Spectre d'hôte
- Mode d'action
- Son utilisation en tant que biopesticide
- Son utilisation dans les OGM

Les problèmes de Résistance

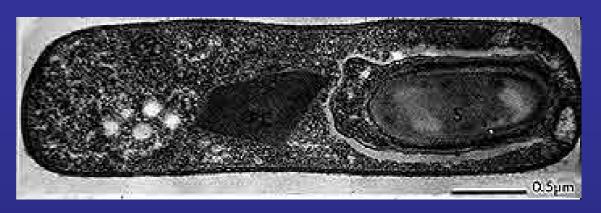
- Au champ et au laboratoire
- Les mécanismes

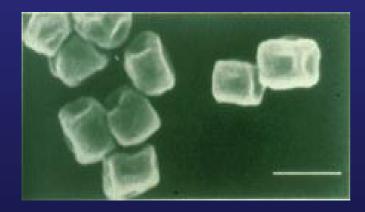
 Bacillus thuringiensis est une bactérie sporulante du sol gram+ qui produit des toxines aux propriétés insecticides.

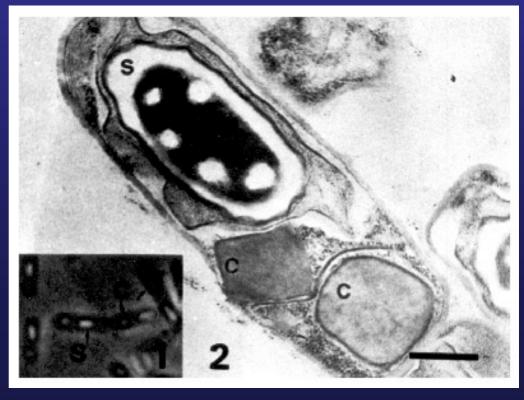


 Cette bactérie a été utilisée depuis plus de 40 ans comme insecticide biologique, et représente maintenant plus de 90% du marché total des biopesticides





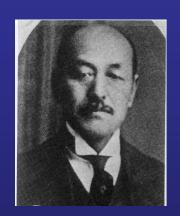




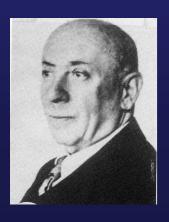
Bacillus thuringiensis:

Plus de 90 ans d'histoire...

- quelques dates clefs



- 1901 : Le bactériologiste Japonais Shigetane ISHIWATA isole une bactérie sur des chenilles de *B. mori* (L.).
- Il nomme cette bactérie « Sottokin » (Bacillus sotto) (Sudden Death Bacillus) et décrit sa culture et sa pathologie sur le ver à soie.
- •Il pose déjà l'hypothèse de l'intervention d'une toxine (Ishiwata, 1905)



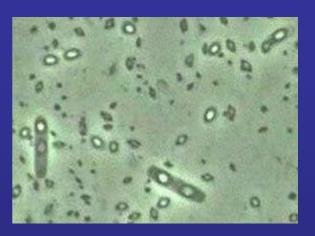
• 1911 : Le biologiste Allemand Ernst BERLINER isole un agent similaire chez des chenilles d'*Ephestia kuehniella* (Zeller) originaires de Thuringe (Allemagne)



Perte de l'isolat de Berliner

1927 : Re-isolement par Mattes sur les mêmes insectes de même origine

- •1928-1930 : lancement d'un projet pionnier aux Etats Unis et en Europe sur le développement d'un biopesticide à base de Bt contre la pyrale du maïs Ostrinia nubilalis (Hubner).
 - Essais en Hongrie
 - Arrêt dans les années 30

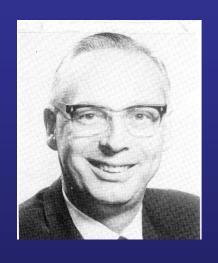


Microscope optique Contraste de phase

1938 : Première formulation commerciale (Sporéine) par les Laboratoires Libec.

Principalement utilisée pour protéger la farine contre les teignes (*Ephestia sp.*)

Les travaux vont reprendre après la seconde guerre mondiale.



•1950-1960 : de nombreux travaux de la part de E. STEINHAUS

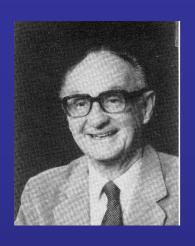
 Des formulations commerciales aux USA et en Europe :

Thuricide: 1957 aux USA

•Bathurine : Tchécoslovaquie Bt subsp *Thuringiensis*

•Entobaktirine: URSS Bt subsp *Galleriae*

•Dendrobaciline: URSS Bt subsp Dendrolimus



1954 : Angus montre pour la première fois que les spores par elles-mêmes n'ont aucun effet, et qu'une dissolution alcaline des cristaux a le même effet que le complexe spores / cristaux

	Method of dosing larvae		
eventually los to the as	By feeding	By injection	
Original culture Spores and crystals (1 × 10 ⁵ spores/larva)	Paralysis within 4 h Septicemia within 12 h	Septicemia within 12 h No paralysis	
Alkali-treated culture 1. Spore fraction (1 × 10 ⁷ spores/larva)	No effect	Septicemia within 12 h	
2. Supernatant	Paralysis within 4 h No septicemia	No effect	
3. Supernatant dialyzed	Paralysis within 4 h No septicemia	No effect	
 Supernatant heated 70°C for 30 min 	No effect	No effect	

^{*}This table is reproduced from: Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature 173: 545-546.

1970 : H Dulmage et C. Beegle assemblent la première collection de souches de *Bt*, comprenant notamment la souche HD-1, très utilisée par la suite comme biopesticide.

1972 : première homologation en France

1977 : isolement de la première souche de *Bt* toxique envers des moustiques, alors qu'on ne connaissait jusque là que des souches toxiques pour les Lépidoptères

1983 : isolement d'une souche de *Bt* toxique envers certains Coléoptères



1960-1980 : H. de Barjac développe un système d'identification basé sur l'analyse sérologique des flagelles des cellules végétatives. Le sérotype flagellaire devient alors une méthode de choix dans la dénomination des différentes souches de *Bt.* (ex : H3a3b ser kurstaki) (80)

- •1981: premier clonage du gène codant pour une protéine Cry
- •1983: isolement d'une souche de *Bt* toxique envers certains Coléoptères
- •La découverte de nouvelles souches de *Bt* actives sur d'autres cibles que les Lépidoptères favorise la mise en place de programmes de screening : prospection de souches et recherche des couples souche-cible(s)
- 1989: Proposition d'une nouvelle nomenclature et d'un schéma de classification basée sur la structure des protéines (Höfte et Whiteley)
- •Années 1990 : arrivée sur le marché des premières plantes transgéniques synthétisant des toxines cry



•1998 : Crickmore et al. proposent une nomenclature révisée, basée sur le système de classification des P450.

Cette nomenclature est basée sur l'étude de l'homologie des séquences en acides aminés des toxines.



Exemple:

les protéines Cry et Cyt ont moins de 25% d'homologie Cry1Aa et Cry1Ac ont plus de 75% d'homologie

Trois grandes familles de toxines

- Cry (crystal) Toxines trois domaines
 - Lepidoptères Diptères Coleoptères Orthoptères Hyménoptères
 - Nématodes et protozoaires
- Cyt (cytotoxic) Cyt1 et 2
 - Activité cytolytique in vitro. In vivo (Diptères)
- VIP (vegetative insecticidal protein) Pas de cristaux – exotoxines thermosensibles
 - Vip1 et Vip2 (52 et 100Kd) toxine binaire Coléoptères (Diabrotica)
 - Vip 2 activité cytotoxique et Vip1 récepteur
 - Vip3 (88,5 Kd)- Lépidoptères (Agrotis-Spodoptera)

- BIN-like (Toxines binaires)
 - Cry34 et Cry35 (équivalentes aux toxines BinA/BinB de Bacillus sphaericus) – Coléoptères
 - Cry36 Coléoptères
- Mtx2/3-like
 - Cry15A (équivalentes aux toxines Mtx2 et Mtx3 de Bacillus sphaericus) – Manduca sexta
 - Cry33 et CryNT32 (serovar thompsoni)
 - CryC35 et CryC53 (homologues à CryNT32) chez le serovar cameroun. Activité inconnue
 - Cry38 et Cry23A (en association avec Cry34/35) active sur Anthonomus grandis
 - Cry37A-Cry23A (Coléoptères)
 - Cry 22 (75 à 86 kd) Hyménoptères-Coléoptères
 - Cry6 actives sur nématodes

- Bacillus thuringiensis produit aussi d'autres protéines :
 - différentes enzymes lysantes : des chitinases, hémolysines, phospholipases, protéases, etc....
 - des β-exotoxines au vaste spectre d'activité (des Insectes aux vertébrés). Ce sont des nucléotides thermostables inhibant l'ARN polymérase. Un des critères de choix des souches utilisées comme insecticides porte sur l'absence de ces β-exotoxines dangereuses pour l'homme
- Toxines Cry produites par d'autres bactéries
 - Cry18 : Penibacillus popilliae Coléoptères
 - Cry16 et Cry17 : Clostridium bifermentans -Diptères

300 gènes Cry

(http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)

22 gènes Cyt

Des bases de données sur leur activité insecticide

(http://www.glfc.forestry.ca/Bacillus/Web98.adb)

(http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)

Cry1Ac1 B.t. kurstaki HD-73,.t. kurstaki HD-244 Bombyx mori (Lepidoptera:

Bombycidae); Agrotis segetum, Helicoverpa armigera,

Helicoverpa zea, Heliothis virescens, Mamestra brassicae,

Trichoplusia ni, Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae); Ephestia kuehniella, Sciropophaga incertulas, Chilo suppressalis, Ostrinia nubilalis (Lepidoptera:

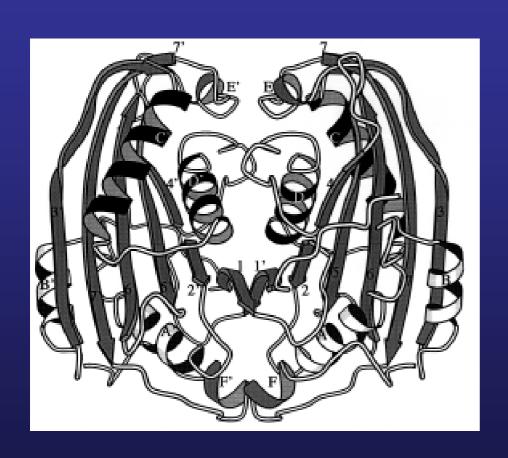
Pyralidae); Manduca sexta (Lepidoptera: Sphingidae); Lymantria dispar (Lepidoptera: Lymantriidae); Pieris brassicae (Lepidoptera: Pieridae)

Cry1Ad1 B.t. aizawai PS811 Trichoplusia ni, Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae); Choristoneura fumiferana (Lepidoptera: Tortricidae); Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae)

Cry1Ae1 B.t. alesti Heliothis virescens, Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae)

Cry1Af1 B. thuringiensis Reported dual activity against Diptera and Lepidoptera

Les toxines Cyt:



Un multimère de la toxine pourrait former un pore dans la membrane, ou une action détergente moins spécifique

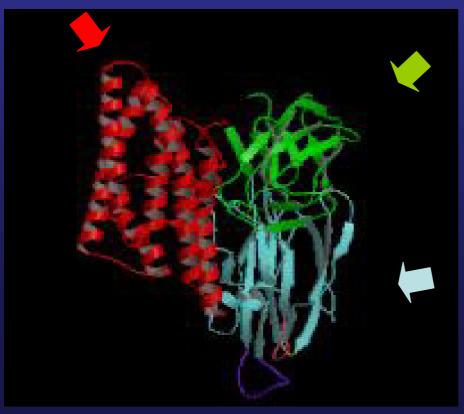
Les toxines Cyt synergisent l'activité de nombreuses toxines Cry chez divers insectes

Multimère formé par 2 Cyt2B

Les toxines 3D-CRY:

Domaine 1:

Formation du pore – action toxique Similarités de structure avec d'autres toxines bactériennes (Hémolysine, colicine et domaine de translocation membranaire de la toxine diphtérique)



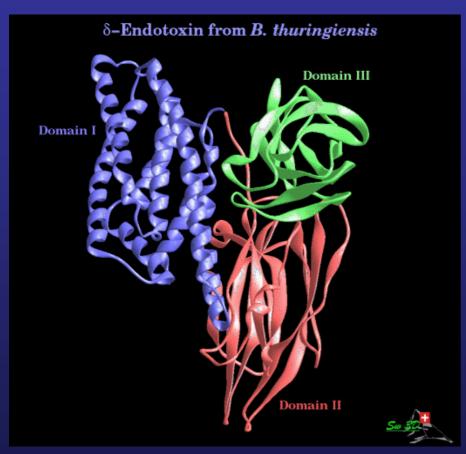
Domaine 3:

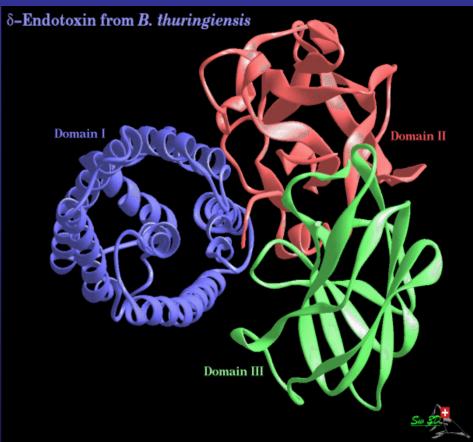
Fixation sur le récepteur et formation du pore Sa structure évoque celle des domaines des récepteurs cellulosiques de la galactose oxydase ou de la B-galacturonidase

Domaine 2:

Interaction avec le récepteur Homologie avec d'autres protéines (carbohydrate –binding proteins) (vitelline 75%, lectine jacaline 64%)

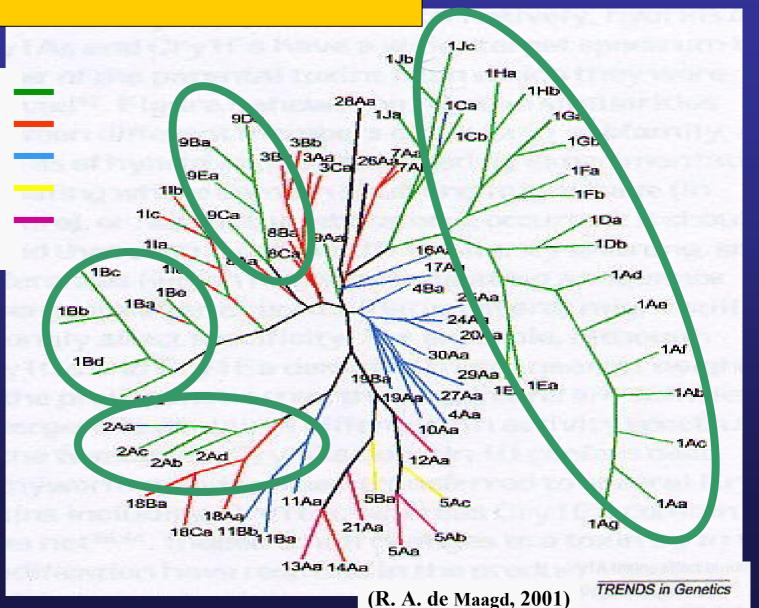
Les toxines 3D-CRY:



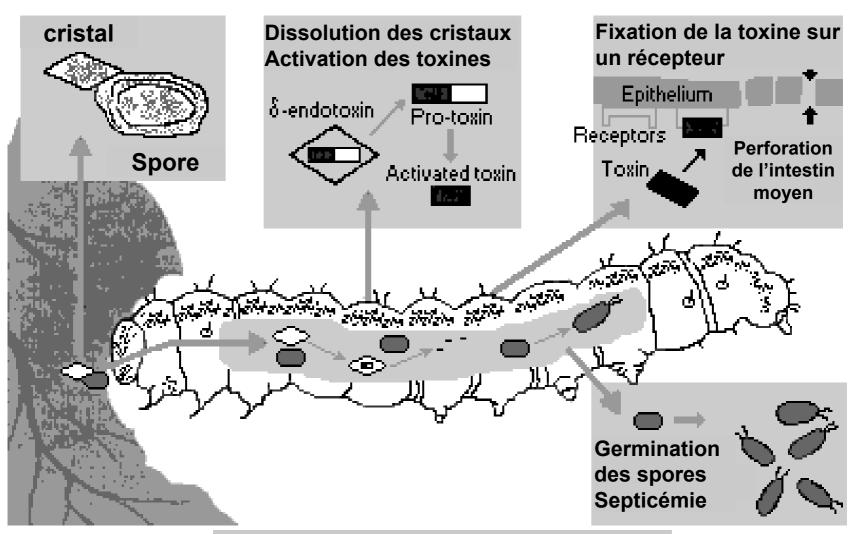


Phylogenic tree of domain 1 of Bt toxins

Lepidoptera
Coleoptera
Diptera
Hymenoptera
Nematodes

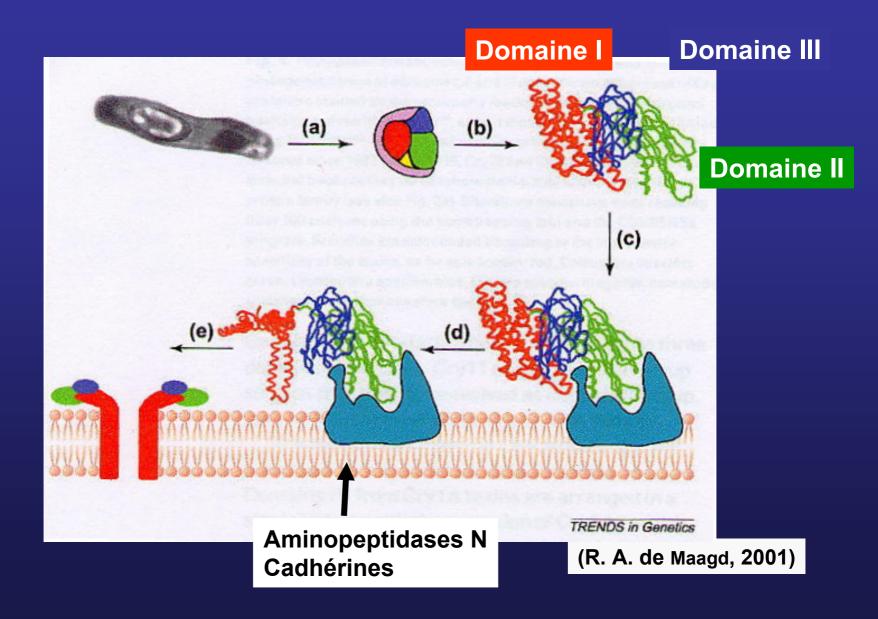


Mode d'action des toxines cry



Mode d'action de Bacillus thuringiensis

Mode d'action des toxines cry



Ce mode d'action permet de dégager deux raisons différentes à la spécificité de chaque toxine pour un spectre d'Insectes parfois très réduit :

- -Une spécificité de liaison de la toxine avec des récepteurs de la paroi intestinale.
 - Lépidoptères : protéines glycosylées
 - Aminopeptidase N, Cadhérines, Glycoconjugué
 - APN-Cry1A et Protéines GPI (Glycophosphatidylinositol)
- -Une spécificité par rapport à l'activité protéolytique et au pH intestinal de l'insecte, variables d'une cible à l'autre et déterminants dans l'efficacité de la toxine.
 - Lépidoptères et diptères (Ph alcalin, arginine majoritaire, activée par des protéases à sérine)
 - Coléoptères (Ph acide, lysine majoritaire, activation par des protéases à cystéine)

Bt biopesticide : trois cibles : Lépidoptères

Product	Formulation	Manufacturer
Dipel	Wettable powder Emulsifiable concentrate	Abbott Laboratories
Thuricide	Wettable powder Aqueous concentrate	Sandoz Agro, Inc.
Javelin	Aqueous concentrate Wettable granules	Sandoz Agro, Inc.
Bactospeine	Wettable powder Flowable concentrate	Solvay & Cie/Duphar B. V.
Futura	Flowable concentrate	Solvay & Cie/Duphar B. V.
Foray	Flowable concentrate	Novo Industries
Biobit	Flowable concentrate Wettable powder	Novo Industries
Bathurin 82	<u> </u>	JZD Slusovice (Weiser 1986)
Biodart	Aqueous concentrate	ICI
Agree	(Combination of subsp. kurstaki and aizawai)	Ciba Geigy
Condor	Emulsifiable concentrate	Ecogen
Foil	(Combination of subsp. kurstaki and tenebrionis)	Ecogen
MVP	(Subsp. kurstaki crystals in killed Pseudomonas cells)	Mycogen

Diptères (Moustiques)

Product Formulation		Manufacturer		
Vectobac	Wettable powder Aqueous concentrate Granules Technical powder	Abbott Laboratories		
Teknar	Liquid	Zoecon/Sandoz		
Bactimos	Wettable powder Granules Pellets	Solvay & Cie/Duphar B. V.		
Skeetal	Liquid	Novo Industries		
Baktokulicid		VPO Biopreparat (Weiser 1986)		
Moskitur		JZD Slusovice (Weiser 1986)		

Coléoptères (Chrysomèles)

Beegle et Yamamoto, 1992

Product	Registration date	Manufacturer	
M-One	1988	Mycogen	
M-Trak	1991	Mycogen	
Trident	1988	Sandoz Agro, Inc.	
Trident II	1990	Sandoz Agro, Inc.	
Foil*	1990	Ecogen	
Di Terra	1991	Abbott Laboratories	
Novodor	Pending	Novo Industries	

^{*}Combination subsp. kurstaki and tenebrionis.

La résistance à Bacillus thuringiensis

1985: McGaughey

-1er cas de résistance à Bt sur Plodia interpunctella (Population sur un stock de grain)



•1990 : Tabashnick et al.

- Plutella xylostella à Hawaï
C'est pour l'instant le premier cas
connu de résistance à la suite de
traitements intensifs au champ à
Hawaï.

D'autres cas ont rapidement suivi. C'est cependant encore la seule espèce résistante au champ

Aujourd'hui:

Diptères

Culex quinquefasciatus
 Cry4A, Cry4B, Cry11Aa, Cyt1Aa

Aedes aegypti

Coléoptères

Chrysomela scripta Cry3AaLeptinotarsa decemlineata Cry3Aa

Lépidoptères

Cadra cautellaDipel

Helicoverpa armigera Cry1Ac

Helicoverpa zea Cry1Ac

Heliothis virescens
 Cry1Ab, Cry1Ac, Dipel

Homeosoma electellum Dipel

- Ostrinia nubilalis Cry1Ac

Pectinophora gossypiella Cry1Ac

- Plodia interpunctella Dipel, HD112, HD133, HD198

- Plutella xylostella Dipel, Javelin, Cry1C, XenTari, Cry1Ac,

Cry1Ab, Cry1Ac+Cry1C,

Spodoptera exigua Cry1C

Spodoptera littoralis Cry1C

Trichoplusia ni Cry1Ab

(Huang et al., 1999; Gould et al., 1997; Liu et al., 1999; Tabashnik et al., 1994; Wirth et al., 1997; Frutos et al., 1999; Whalon and McGaughey, 1998; Lu et al, 2004))

Chez Helicoverpa armigera: (uniquement au laboratoire)

Incomplètement dominant

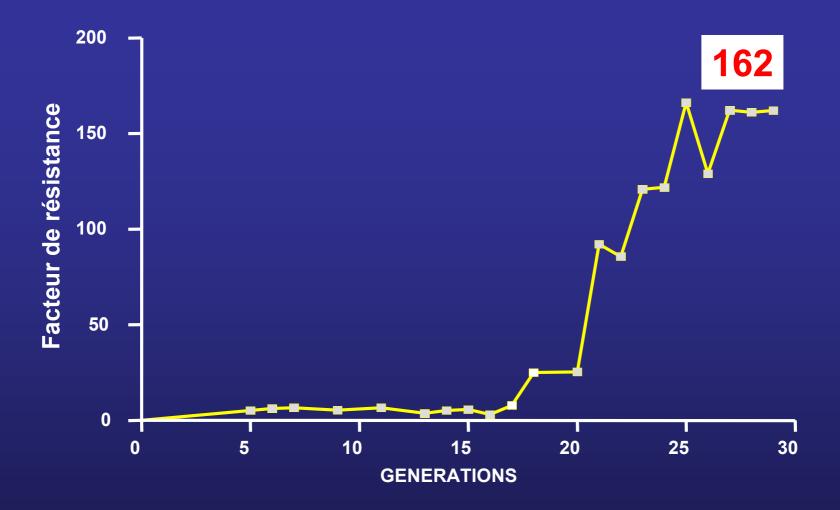
• En Australie : Akhurst et al, 2003 Incomplètement récessif

• En Chine: Liang et al, 2000

• En Inde: Kranthi et al. 2000

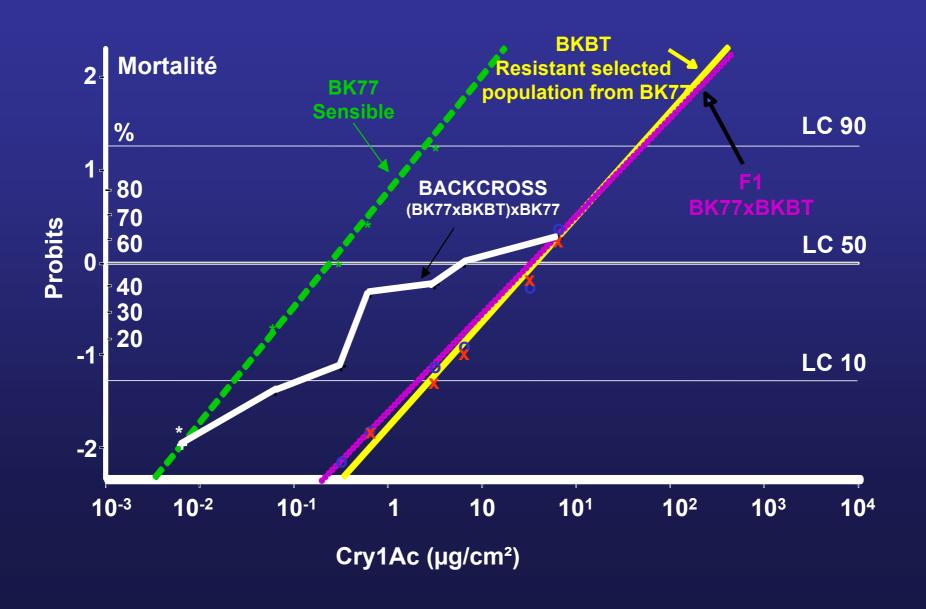
• En Afrique : Uraichuen 2002 — Complètement dominant

Une constante : de nombreuses résistances croisées avec les toxines de la famille Cry1A



Evolution de la résistance à Cry1Ac dans une population de laboratoire d'Helicoverpa armigera BK77 (Origine Bouaké, Côte d'Ivoire)

Héritabilité de la résistance chez BK77 sélectionnée par Cry1Ac



Dominance de la résistance (D_{CL}) de *H. armigera* (BKBT) à la toxine Cry1Ac calculée après 27 générations de la sélection

Population	CL50 (µg/cm²) ^a	Pente±ET ^a	D_{CL}^c	nd
BK77	0,24 (0,11 -0,41)	1,27±0,22		180
BKBT	38,93 (23,32-84,88)	1,15±0,21		270
Fl^{ϵ}	34,68 (21,11-71,72)	1,16±0,20	0,97	270
\mathbf{F}, \mathbf{F}	38,37 (21,48-95,76)	1,00±0,20	0,99	270

[&]quot;Valeurs représentent les regroupements de deux essais indépendants. Les nombres entre parenthèse sont de 95% des intervalles de confiance.

b ET : Ecart type

^e niveau de dominance (logCL_{ss} - logCL_{ss}) / (logCL_{ss} - log CL_{ss}), où CL_{ss}, CL_{ss} et CL_{ss} sont les CL_{so} des homozygotes résistants, hétérozygotes et homozygotes sensibles, respectivement.

^d Nombre des larves testées y compris le témoins

descendants issus des croisements entre les femelles BK77 et les mâles BKBT

f descendants issus des croisements entre les mâles BK77 et les femelles BKBT

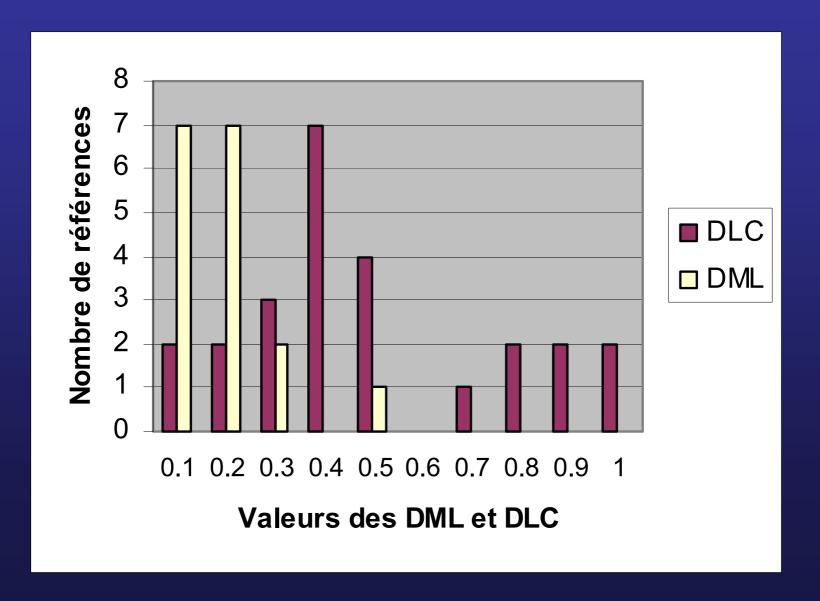
Résistance croisée effectuée à la 21ème génération de BKBT aux endotoxines de *B. thuringiensis*

Taviaca	BK77		BKBT		FR^b	
Toxines	Pente	CL ₅₀ (µg/cm ²) ^a	Pente	CL ₅₀ (µg/cm ²)	rĸ	
CrylAa	1,71	3,95 (3,38-4,58)	0,87	164,14 (96,01-339,53)	41,55	
CrylAb	1,41	1,36 (1,13-1,65)	1,30	1213,63 (715,25-5139,79)	892,38	
CrylAc	1,13	0,26 (0,22-0,32)	0,77	24,86 (10,39-126,30)	95,62	
Cry2Aa	1,56	1,82 (1,57-2,14)	1,39	2,39 (1,14-4,02)	1,31	

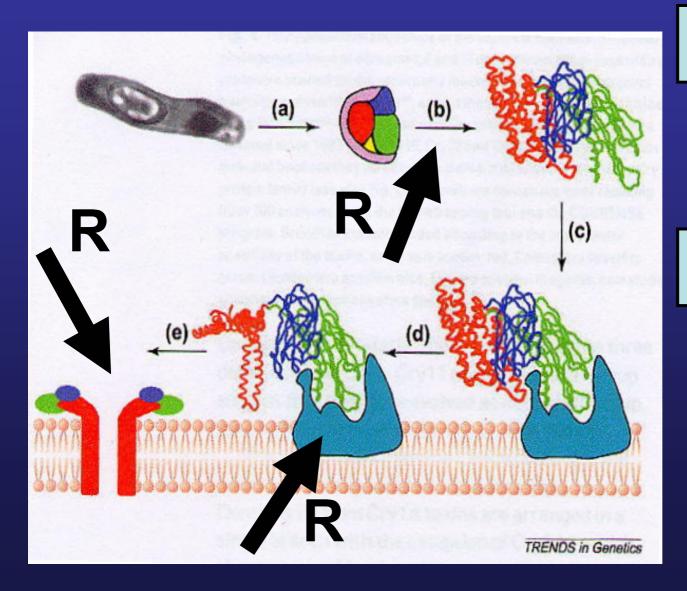
[&]quot;Valeurs représentent les regroupements de deux essais indépendants. Les nombres entre parenthèse sont de 95% des intervalles de confiance.

^b Facteur de résistance des CL₅₀ pour BKBT par rapport à BK77

Distribution des niveaux de dominance dans la littérature



Les mécanismes de résistance



Solubilisation (a),

Processus protéolytique (b)

passage à travers la membrane péritrophique (c),

fixation sur le récepteur (d)

insertion dans la membrane (e),

formation du pore,

lyse osmotique des cellules

Changements dans l'activité protéolytique

- Absence d'une protéase nécessaire à l'activation des toxines
 - Pas de dissolution de la protoxine
 - Chez P. interpunctella (Oppert et al, 1996, 1997)
- Dégradation plus rapide de la toxine activée qui est en principe résistante aux protéases
 - Chez H. virescens (Forcada et al. 1996)

Modification de la (ou des) cibles (Aminopeptidases N, cadhérines)

- Réduction de l'affinité pour les sites récepteurs
 - Chez *P. interpunctella* (Van Rie, 1990)
 - Chez H. armigera (Akhurst et al., 2004)
 - Chez *H. virescens* (Jurat-Fuentes et al. 2002)
 - Glycolisation altérée d'une glycoprotéine membranaire
- Diminution du nombre des sites récepteurs
 - Chez *H. virescens* (Forcada et al. 1996)

