



TITRE :INTERACTIONS DES TOXINES INSECTICIDES CRY
AVEC LE MUCUS DU TUBE DIGESTIF

Programme : Risk OGM 2010

Synthèse

Christina NIELSEN-LEROUX

INRA-UMR 1319- Micalis & AgroParisTech
Centre INRA de Jouy en Josas
78350 Jouy en Josas

Christina.nielsen@jouy.inra.fr
+33134652101
+33623057899

N° de contrat : 11-MERES-RISKOOGM-3-CVS-59
Programme :190-0190-THUR-BSAF
Date du début de contrat : 23/11/2011

Jouy en Josas le: 20 Mai 2016

Etat de l'art et objectifs

Des données scientifiques et les questions sociétales avaient (2010-2011) montré la nécessité de l'évaluation de nouveaux risques associés à la consommation de toxines insecticides Cry de *Bacillus thuringiensis*, exprimées dans certaines plantes génétiquement modifiées (PGM), et notamment pour la toxine Cry1Ab, exprimée dans le maïs Bt MON810. Cette étude était fondée sur des résultats obtenus par les partenaires (Nielsen-Leroux *et al.*, INRA-Micalis) du projet. Nous avons en effet montré, de façon inattendue, que ces toxines peuvent se lier et dégrader la matrice péritrophique, une structure tubulaire riche en mucus qui protège l'intestin. Étant donné la forte homologie entre certains composants du mucus d'invertébrés et de vertébrés, notamment les glycoprotéines de la famille des mucines, il était important d'acquérir des connaissances précises sur la capacité des toxines Cry à se fixer et à dégrader le mucus du tube digestif de l'insecte puis d'analyser si cette interaction était également effective avec le mucus de vertébrés (mammifères). L'objectif était d'approfondir l'étude des interactions entre les toxines Cry et les composants du mucus de différentes origines afin de déterminer si les analyses de risques doivent être ajustées pour prendre en compte les nouvelles propriétés des toxines Cry. L'enjeu de cette recherche est donc d'évaluer si ces toxines insecticides ont un effet (positif ou négatif) sur les cellules à mucus et/ou sur le mucus lui-même, afin de mieux comprendre l'impact de ces plantes OGM sur les organismes cibles et non cibles.

Méthodologies :

Nous avons caractérisé les interactions Cry-Mucus à l'aide de la toxine Cry1Ab purifiée et activée par protéolyse de la partie N-terminale. De poids moléculaire de 66 kDa, (proche de celle exprimée dans le maïs MON810), la toxine utilisée est issue d'une production hétérologue chez *Escherichia coli* ou homologue chez *Bacillus thuringiensis*. Des anticorps monoclonaux anti-Cry1Ab ont été utilisés pour évaluer l'interaction toxine - mucus et sa spécificité (ELISA). La recherche de molécules cibles a été effectuée à l'aide de plusieurs techniques biochimiques d'interaction protéine-protéine (ligand blot, pull-down, cross-linking). La détection a été réalisée soit avec la toxine directement marquée (par la biotine ou des fluorophores), soit par immuno-détection. La toxine Cry1Ab a été testée sur différents mucus : les matrices péritrophiques (MP) du stade larvaire de l'insecte ravageur *Galleria mellonella* (teigne de la ruche d'abeille), les mucines d'estomac de porc (commerciales), le mucus isolé d'intestins de souris et les surnageants de culture de cellules épithéliales d'origine humaine produisant du mucus. Des analyses sur l'effet de la toxine ont été faites *in vitro* (tests enzymatiques, effet sur les glycosylation des mucus, mesures de rhéologie) et *in vivo* (dégradation de la MP, réponses de toxicité/stress sur culture cellulaire, effets histo-pathologiques sur le mucus et les cellules intestinales de souris). Des études par gavage avec la toxine ont été menées chez des souris pendant 28 jours afin d'évaluer l'effet de l'interaction toxine - mucus sur la réponse immunitaire globale et spécifique. Enfin, les MP des larves de *G. mellonella* ayant consommé des feuilles de maïs MON810 ont été analysées.

Résultats majeurs, leur impact et suite :

1. Effets de Cry1Ab sur la matrice péritrophique de l'insecte *G. mellonella*

L'insecte *G. mellonella* est utilisé comme modèle d'infection pour analyser le rôle de la bactérie *B. thuringiensis* (Bt) car cet insecte n'est pas sensible à la toxine Cry1Ca. En effet, à forte dose, les chenilles ne meurent pas, en revanche on observe une dégradation de la MP. Nous avons testé si cela était également le cas avec Cry1Ab. Cette toxine à forte dose n'est pas non plus toxique seule, elle fragilise également la MP aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. La toxine est détectée dans la MP à l'aide d'anticorps monoclonaux très sensibles. Cela montre que Cry1Ab peut reconnaître les structures riches en mucus de l'insecte.

2. Effets des feuilles du maïs Bt MON810 chez *G. mellonella*

Dans le projet, il avait été envisagé de purifier la toxine Cry1Ab des feuilles du maïs MON810 mais cela n'a pas été possible car la quantité de toxine présente dans les plantes est très faible (de l'ordre de 10 µg/g de feuille fraîche). Néanmoins, nous avons fait ingérer les feuilles du MON810 et de la lignée isogénique parentale à des larves de *G. mellonella* afin d'étudier l'effet de cette PGM sur la MP. Aucun impact sur la MP ou sur la santé des chenilles n'a été mis en évidence avec les feuilles du MON810. Pour la suite, il serait intéressant et certainement plus aisé de produire la forme présente dans le MON810 dans un autre système d'expression eucaryote afin de travailler avec une protéine la plus proche possible de celle présente dans le maïs MON810..

3. La toxine Cry1Ab se lie à tous les types de mucus testés

In vitro, la toxine Cry1Ab interagit avec la MP, le mucus intestinal de souris et les mucines gastriques de porc. Le signal obtenu par immunodétection augmente avec la concentration des mucus utilisés jusqu'à atteindre un plateau. Ces résultats suggèrent l'existence de sites d'interaction spécifiques de la toxine au sein de ces mucus. Le parallélisme observé entre les données des interactions mucus-Cry1Ab et celles de l'interaction hautement spécifique du contrôle positif mAb120-Cry1Ab confirme cette hypothèse. Une liaison de Cry1Ab au mucus intestinal et à la MP est également observée respectivement *in vivo* chez la souris et *ex vivo* chez *G. mellonella*. Dans ces conditions, Cry1Ab a donc une affinité pour certains composants des mucus étudiés.

4. Domaines de la toxine Cry1Ab impliqués dans la liaison aux mucus

Plusieurs mAb spécifiques de différentes régions de Cry1Ab ont été identifiés comme inhibiteurs de la liaison toxine – mucus, notamment le mAb104 qui inhibe presque complètement cette liaison avec les différents mucus testés. D'autres mAb ont un effet dépendant du type de mucus. C'est le cas du mAb23 qui inhibe en partie la liaison de la toxine au mucus de souris (et dans une moindre mesure aux mucines de porc) mais pas aux MP d'insecte. Ce résultat suggère l'existence de domaines d'interaction qui diffèrent légèrement en fonction du type de mucus considéré. Plusieurs approches ont été utilisées afin de déterminer la partie de la toxine impliquée dans la liaison. La séquence reconnue par le mAb104 est vraisemblablement localisée dans la partie C-terminale de la toxine Cry1Ab entre L₄₆₆ et L₆₁₇, mais d'autres analyses seront nécessaires pour confirmer ces données.

5. Importance de la liaison aux composants glycosylés

Les mucus sont riches en protéines fortement glycosylées (e.g. les mucines chez les mammifères et les péritrophines de la MP chez l'insecte). Afin de vérifier si la partie glycosylée est impliquée dans la liaison, des expériences de compétition avec des lectines et des sucres ont été conduites. Toutefois, dans nos conditions, il n'a pas été possible d'inhiber la liaison toxine - mucus. La déglycosylation des mucus n'a pas non plus affecté la liaison de Cry1Ab. Ces résultats diffèrent de ceux observés précédemment pour Cry1Ac chez un autre insecte (Valaitis *et al.*, 2013).

6. Cibles potentielles de Cry1Ab dans les mucus

Différentes approches permettant d'étudier les interactions protéine-protéine (ligand blot et pull-down suivis d'analyses en spectrométrie de masse) ont été utilisées afin d'identifier les composants des mucus impliqués dans la liaison à la toxine Cry1Ab. Les résultats ont mis en évidence plusieurs candidats, indiquant que ce ne sont pas uniquement les glycoprotéines du mucus qui sont ciblées mais également des molécules qui y sont adsorbées. Afin de déterminer l'importance relative de ces molécules, d'autres analyses seront nécessaires.

7. Effets de Cry1Ab sur les cellules humaines en culture

En utilisant plusieurs lignées de cellules intestinales humaines productrices de mucus, nous avons mesuré l'effet de deux toxines Cry sur la viabilité cellulaire et la production de mucines. Nous avons également étudié l'effet des toxines sur la voie de signalisation NF-κB et sur l'expression de différents marqueurs de l'immunité tels que TGFβ1 et IDO-1 ou de la production de mucine. Nous avons

montré que Cry1Ab et Cry1Ca n'affectent ni la viabilité des cellules, ni les réponses immunitaires ou la production de mucines des lignées cellulaires utilisées.

8. Effets de Cry1Ab *in vivo* chez la souris

Après 28 jours de gavage intra-gastrique avec Cry1Ab (100 µg de toxine par jour), aucune différence histopathologique (effets sur cellules, couches de mucus) n'est constatée entre les coupes d'intestins et de colons des souris ayant reçu la toxine et celles des souris « contrôle ». En revanche, une réponse humorale spécifique est mise en évidence chez les souris ayant reçu la toxine. En effet, une production d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques de Cry1Ab est observée. Par contre, aucun IgE spécifique (réponse allergique) n'est détecté dans ces conditions. Ces résultats mettent en évidence une certaine immunogénicité *in vivo* déjà connue de Cry1Ab chez la souris mais aucun effet négatif sur ces souris n'est constaté pour les aspects étudiés.

Conclusions/ perspectives :

Les résultats de ce projet ont permis de faire évoluer nos connaissances sur la spécificité des toxines Cry de *B. thuringiensis* et aussi de répondre à certaines questions à propos de l'évaluation des risques liés aux PGM. Nos approches sont novatrices ; à notre connaissance, il s'agit de la première analyse qui s'est focalisée spécifiquement sur les interactions entre les toxines Cry et le mucus du tube digestif de différents organismes (insectes et mammifères). Il s'avère ainsi que la toxine Cry1Ab ne se lie pas seulement au mucus d'insectes mais aussi aux mucus de vertébrés, remettant donc en question la spécificité connue de ces toxines. Toutefois, il est nécessaire de distinguer l'effet de lyse suivi de la mort des cellules intestinales des insectes cibles de l'effet de liaison sur les différents mucus testés au cours du projet. Sur la base de nos résultats, on ne peut pas considérer le phénomène de liaison comme un risque. Afin de mieux comprendre ces données, il faudrait approfondir les recherches sur plusieurs axes. Il serait par exemple intéressant d'analyser l'effet d'un aliment riche en toxine Cry sur le microbiote intestinal de modèles mammifères et insectes cibles/non cibles. Par ailleurs, alors que le nombre de toxines Cry exprimées et associées dans les PGM ne cesse d'augmenter, il semble important d'évaluer la capacité des autres toxines Cry à se lier au mucus et les éventuels effets combinatoires sous-jacents. Enfin, il serait opportun à l'avenir de prendre en compte ces nouvelles propriétés des toxines Cry à se lier aux substances riches en mucus dans l'évaluation des risques liés aux PGM.

Vulgarisation : Présentations & publications

Le projet a été présenté au congrès international de la « Society for Invertebrate Pathology » (SIP 2014) à Mainz en Allemagne ainsi que lors du conseil scientifique de l'INRA à Jouy-en-Josas en décembre 2014. Il a été présenté, sur invitation, à un congrès sur la Lutte biologique (SICONBIOL 2015) à Rio, au Brésil, en juin 2015 et le sujet a été sélectionné pour une présentation orale lors du Congrès international Bacillus-ACT à New Delhi en Inde, en octobre 2015.

Un article basé sur les résultats les plus importants (et notamment la capacité de Cry1Ab à se lier à plusieurs types de mucus) est en cours de rédaction et il sera soumis dans un journal d'un bon niveau d'impact. Un deuxième article plus centré sur les études sur l'insecte avec Cry1Ca est aussi en cours de rédaction. Enfin, nous programmons de rédiger un article plus descriptif concernant toutes les analyses (biochimiques) en relation avec la MP de *G. mellonella* afin de valoriser les nombreuses données acquises lors du projet mais qui ne figureront pas dans la publication principale.