

## Note bibliographique

# Amélioration des activités insecticides des protéines Vip3 de *Bacillus thuringiensis*

S. SELLAMI<sup>1</sup>, L. ABDELKEFI MESRATI<sup>1</sup>, S. TOUNSI<sup>1</sup>, K. JAMOSSI<sup>1</sup>

(Reçu le 18/04/2016; Accepté le 08/06/2016)

## Résumé

Les protéines Vip3 sont des biopesticides de deuxième génération synthétisées et sécrétées par *Bacillus thuringiensis* au cours de la phase végétative. Ces protéines, découvertes au milieu des années 1990, présentent un grand intérêt pour lutter contre différents insectes ravageurs appartenant à l'ordre des lépidoptères parmi lesquels *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua* et *Spodoptera frugiperda*. Plusieurs recherches ont été menées sur les protéines Vip3 en vue d'élargir leur spectre d'action, d'améliorer leur action insecticide et contourner les problèmes de résistance apparus suite à l'utilisation massive des  $\delta$ -endotoxines, considérés comme des biopesticides de première génération. Dans cette revue nous faisons état de la plupart des recherches menées sur l'amélioration des activités insecticides des protéines Vip3 de *Bacillus thuringiensis*.

**Mots-clés:** *Bacillus thuringiensis*, Vip3, Activité insecticide

## Abstract

Vip3 proteins were considered as a second generation of biopesticides. They are synthesized and secreted by *Bacillus thuringiensis* during the vegetative growth phase. Vip3 proteins, which are discovered in 1990, are of great interest for the control of Lepidopteran insects pests such as *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. Many researches were conducted on the Vip3 proteins in order to enlarge their spectrum, improve their insecticidal activities and resolve the problems of resistance that appeared recently after the massive use of  $\delta$ -endotoxins, considered as first generation of biopesticides. In this review, we tried to summarize research studies interested in the improvement of the insecticidal activities of Vip3 proteins.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Vip3, Insecticidal activity

## INTRODUCTION

Les protéines Vips (Vegetative Insecticidal Proteins) sont produites durant la phase végétative du cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*. Elles sont détectées à partir de la phase exponentielle jusqu'à des heures tardives de la phase de sporulation, témoignant de leur importante stabilité (Estruch et al., 1996; Sellami et al., 2011). Il existe actuellement environ 136 gènes *vips* qui se classent en quatre groupes, communément nommés *vip1*, *vip2*, *vip3* et *vip4* (Crickmore et al., 2016, <http://www.bt.nomenclature>). Les protéines Vip1 et Vip2 sont des protéines binaires toxiques pour les coléoptères. Aucune donnée n'est disponible pour la protéine de type Vip4. Quant à la protéine de type Vip3, faisant l'objet de notre revue, c'est une protéine d'environ 90 kDa montrant une toxicité élevée contre les lépidoptères (Estruch et al., 1996; Sellami 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). Par ailleurs, Espinasse et al. (2003) ont montré que la distribution des protéines sécrétées Vip3, CryII, 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 *cryII*. 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 *cryII* sont plasmidiques et portés par le même plasmide. Également, Gonzalez et al. (1982) et Levinson et al., (1990) ont montré que les déterminants génétiques intervenant dans la synthèse des  $\beta$ -exotoxines sont présents au niveau du même plasmide que quelques gènes *cry*.

Les  $\delta$ -endotoxines, considérées comme des biopesticides de première génération, ont été largement utilisés pour lutter contre les insectes ravageurs. Contrairement à ces  $\delta$ -endotoxines formant des cristaux pendant la phase de sporulation, les protéines Vip3 sont des protéines sécrétées dans le milieu de culture durant le stade végétatif de *B. thuringiensis* (Estruch et al., 1996; Schnepf et al., 1998). Elles ne présentent pas de similarités de séquences avec les  $\delta$ -endotoxines et ne se lient pas aux mêmes types de récepteurs cellulaires (Lee et al, 2003; Fang et al., 2007). Une autre différence vient du fait que les deux types de protéines ne présentant pas le même spectre d'insectes sensibles (Schnepf et al., 1998). Tous ces arguments consolident l'utilisation des toxines Vip3 comme alternatives des  $\delta$ -endotoxines dans le but de contourner

<sup>1</sup> Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Biopesticides, B.P:1177, 3018, Sfax, Tunisie. E-mail: sellamisameh@gmail.com

les problèmes de résistance récemment développés suite à l'utilisation massive des toxines Cry et également afin d'élargir et d'améliorer le spectre d'activité insecticide. Ainsi, plusieurs stratégies ont été adoptées pour accroître l'efficacité des protéines Vip3 tels que la recherche de nouvelles toxines Vip3, le développement de toxines hybrides, l'interaction avec d'autres protéines à activités insecticides, ou encore la conception de protéines chimériques. Au cours de cette revue, nous faisons un tour d'horizon des travaux réalisés en la matière et ayant pour but l'amélioration des activités insecticides des protéines Vip3 de *Bacillus thuringiensis*.

**Les protéines Vip3 de *Bacillus thuringiensis* et leurs activités insecticides**

Le nombre total d'acides aminés de la plupart des protéines Vip3 est d'environ 790, codant pour une protéine de 89 kDa. La partie N-terminale des protéines Vip3 est hautement conservée, alors que la partie C-terminale est très variable suggérant qu'elle intervient dans la spécificité des insectes cibles (Rang et al., 2005; Wu et al., 2007).

La partie N-terminale des protéines Vip3 contient une séquence signal responsable de la translocation des protéines à travers la membrane. Cette séquence est constituée de quelques acides aminés chargés positivement suivi d'une région hydrophobe qui sera clivée après la sécrétion (Doss et al., 2002, Chen et al., 2003) (Figure 1). Cependant, le mécanisme de sécrétion des protéines Vip3 est encore non élucidé. La conservation très importante de la partie N-terminale des protéines Vip3 peut suggérer qu'elle intervient dans le repliement de la protéine ou dans l'interaction aux récepteurs (Chakroun et al., 2016).

Des études sur la partie C-terminale ont montré que les derniers acides aminés de cette partie sont critiques pour l'activité et la stabilité de ces protéines puisque leurs suppressions, substitutions ou l'ajout d'autres acides aminés mènent à la perte de l'activité insecticide (Selvapandiyan et al., 2001; Gayen et al., 2012).

La structure secondaire prédite de la protéine Vip3 a suggéré que la partie N-terminale est majoritairement construite d'hélices  $\alpha$ , alors que la partie C-terminale est riche en hélices  $\beta$  et en coudes. Cependant, la structure tridimensionnelle des protéines Vip3 est encore non élucidée jusqu'à maintenant; seuls les derniers 200 acides aminés ont été modélisés et découverts homologues au domaine II des protéines Cry (Wu et al., 2007) (Figure 2).

Les protéines Vip3 sont toxiques envers un grand nombre d'insectes, essentiellement des lépidoptères qui sont non sensibles aux protéines Cry. Le tableau 1 englobe les différentes classes des protéines Vip3 et les insectes qui leur sont susceptibles.

**Construction de gènes hybrides de vip3 et de protéines chimériques**

Afin d'améliorer l'activité insecticide et d'élargir le spectre d'action des différentes protéines insecticides de *B. thuringiensis*, les chercheurs se sont orientés d'une part vers la construction de gènes hybrides composés d'éléments régulateurs de l'expression et de la traduction et de séquences codantes provenant de plusieurs gènes, d'autre part vers la conception de protéines chimériques suite à la fusion de différentes séquences codantes provenant de différents gènes afin d'obtenir de nouvelles propriétés, et finalement la combinaison des deux cas précédents.



Figure 1: Schéma représentatif de la structure des protéines Vip3

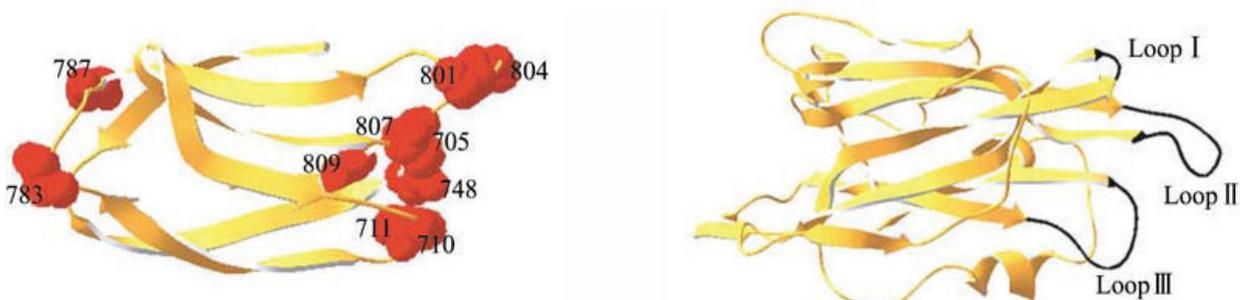


Figure 2: Structure tridimensionnelle des derniers 200 acides aminés de la protéine Vip3A (A) Domaine II des protéines Cry (B) (Wu et al., 2007)

**Tableau 1: Tableau récapitulatif du spectre d'activités insecticides de différentes classes des protéines Vip3**

Protéine	Larves d'insectes	Références
Vip3Aa1	<i>Agrotis ipsilon</i> , <i>Helicoverpa virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Bombyx mori</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Mamestra brassicae</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Lobesia botrana</i>	Estruch et al., 1996, Ruiz et al., 2014, Hernandez-Martinez et al., 2013, Fang et al., 2007, Sena et al., 2009
Vip3Aa7	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Plutella xylostella</i>	Dong et al., 2012 a, b, Song et al., 2008
Vip3Aa9	<i>Agrotis ipsilon</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Spodoptera litura</i> , <i>Chilo partellus</i> , <i>Phthorimea operculella</i>	Selvapandiyan et al., 2001
Vip3Aa10	<i>Agrotis ipsilon</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Spodoptera litura</i> , <i>Bombyx mori</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i>	Doss et al., 2002
Vip3Aa11	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Ostrinia furnacalis</i>	Liu et al., 2007
Vip3Aa13	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Spodoptera litura</i>	Chen et al., 2003
Vip3Aa14	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Spodoptera litura</i> , <i>Earias vitella</i> , <i>Pieris brassicae</i>	Bhalla et al., 2005, Saraswathy et al., 2008
Vip3Aa16	<i>Prays oleae</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Ephestia kuehniella</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Agrotis segetum</i> , <i>Tuta absoluta</i> , <i>Ectomyelois ceratoniae</i>	Abdelkefi et al., 2009, Abdelkefi et al., 2011 a, b, Chakroun et al., 2012, Ben Hamadou et al., 2013, Sellami et al., 2015, Boukedi et al., 2015
Vip3Aa19	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Ostrinia furnacalis</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Spodoptera exigua</i>	Liu et al., 2007
Vip3Aa29	<i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Chilo suppressalis</i> , <i>Chironomus tepperi</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Spodoptera exigua</i>	Yu et al., 2012
Vip3Aa43	<i>Spodoptera albula</i> , <i>Spodoptera cosmioidea</i> , <i>Spodoptera eridania</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i>	Bergamasco et al., 2013
Vip3Aa45	<i>Chrysodeixis chalcites</i> , <i>Lobesia botrana</i> , <i>Mamestra brassicae</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Spodoptera littoralis</i>	Palma et al., 2013
Vip3Aa50	<i>Anticarsia gemmatilis</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i>	Figueiredo et al., 2013
Vip3Aa58	<i>Spodoptera exigua</i> , <i>Cydia pomonella</i> , <i>Dendrolimus pini</i>	Baranek et al., 2015
Vip3Aa59	<i>Spodoptera exigua</i> , <i>Cydia pomonella</i> , <i>Dendrolimus pini</i>	Baranek et al., 2015

### Expression des gènes *vip3* sous le contrôle de différents éléments régulateurs

La substitution du promoteur végétatif du gène *vip3Aa7* par le promoteur sporulation indépendant pro3A du gène *cry3A* (Agaisse et Lereclus, 1994) a amélioré la production de la nouvelle protéine Vip3Aa7 d'environ 3,2 fois plus que celle native chez une souche de *B. thuringiensis* acristallifère et a conféré par la suite un taux de toxicité plus élevé d'environ 10 fois vis-à-vis de *Spodoptera exigua* (Zhu et al., 2006).

Un autre type de substitution a été réalisé en fusionnant les promoteurs sporulation-dépendants BtI-BtII du gène *cry1Aa* (Wong et al., 1983) avec le gène *vip3Aa9* (*vip-s*) afin de surproduire la protéine correspondante dans *B. thuringiensis* et en vue de l'obtenir sous forme d'inclusions. L'ajout de la séquence Shine-Dalgarno, STABSD, du gène *cry3A* à l'extrémité 5' et de la séquence rétro-régulatrice positive du gène *cry1Aa* à l'extrémité 3' dans la construction a augmenté significativement le taux

d'expression de la protéine Vip-s. L'absence du terminateur de transcription n'aboutit qu'à l'accumulation de 1 à 2 % de Vip-s, alors que sa présence augmente le taux d'expression de ces protéines. Ceci résulte probablement d'une meilleure stabilité de l'ARNm qui est protégé contre la dégradation par les exonucléases (Arora et al., 2003). L'expression de ces protéines s'effectue sous forme de corps d'inclusion dans *B. thuringiensis*. Ceci facilitera le développement de formulations pour l'application de ce type de protéines comme insecticide (Arora et al., 2003). Notons que la réussite de cette construction s'est produite suite à l'excision de 39 acides aminés du côté N-terminal de la protéine Vip3. En effet, cette séquence jouerait probablement le rôle d'un peptide signal responsable de la sécrétion de Vip3 par *B. thuringiensis* (Arora et al., 2003). Ces résultats sont confirmés par Chen et al. (2004) qui ont exprimé l'ORF de *vip184* sous le contrôle des promoteurs et des séquences Shine Dalgarno des gènes *cry1A* et *cry3A*. Dans ce même contexte, Sellami et al., 2011 ont cloné le gène *vip3LB* sous le contrôle des deux promoteurs spo-

ulation-dépendants BtI-BtII dans le but d'étendre son expression pendant la phase de sporulation de *B. thuringiensis*. Ainsi, la sur-expression de cette protéine aussi bien pendant la phase végétative que de sporulation a provoqué l'amélioration de l'activité insecticide envers les larves de *Spodoptera littoralis*.

De même et afin d'améliorer l'activité insecticide d'une souche de *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* (Chankhamhaengdechaa *et al.*, 2008), le gène *vip3* a été cloné sous le contrôle du promoteur P19 de l'opéron *cryIIAa* au lieu de son promoteur natif. L'étude sur le plan transcriptionnel en utilisant la technique de la RT-PCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) a montré que les taux d'expression du gène *vip3* à partir du promoteur P19 avec le terminateur du gène *vip3* étaient plus élevés que ceux trouvés lorsque le gène *vip3* était sous le contrôle de son propre promoteur. Par contre, l'expression de *vip3* sous le contrôle du promoteur P19, en fusion avec la séquence codante pour la protéine chaperonne P20 et ayant comme terminateur celui de l'opéron P19, présente les taux d'expression les plus bas. Ces auteurs ont donc conclu que le terminateur du gène *vip3A* stabilise l'ARN messager de ce gène d'une manière plus efficace que le terminateur de l'opéron P19, et que la protéine chaperonne P20 n'améliore ni l'expression ni la toxicité. Sur le plan traductionnel, une amélioration de l'expression de la protéine Vip3 a été trouvée au niveau des surnageants de culture de la souche hébergeant la fusion promoteur P19-Vip3, au cours de la phase de sporulation et ce après 20 h et 48 h de culture, provoquant ainsi l'amélioration de la toxicité de 4,1 et 2,5 fois, respectivement.

### Mutation, Addition et Délétion

La mutation, l'addition et la délétion de quelques résidus d'acides aminés au niveau de la séquence C-terminale influence totalement l'activité insecticide. Une étude sur le chimère Vip3AcAa (Fang *et al.*, 2007) a montré que la mutation des deux derniers acides aminés de la séquence C-terminale IK (Isoleucine-lysine) à LG (Leucine-glycine) aboutit à l'altération totale de l'activité insecticide envers *Spodoptera exigua* et *Helicoverpa armigera*. Toutefois, les mutations IK à LR (Leucine-Arginine) provoque l'amélioration de la toxicité envers *Spodoptera exigua*. Ils ont démontré également que la délétion des 3 derniers acides aminés (Sérine-Isoleucine-Lysine) ou l'addition d'une succession d'Histidines après le dernier acide aminé provoquent la perte totale de l'activité envers les deux lépidoptères testés.

D'autre part, ce même groupe a démontré que toutes les protéines mutantes et inactives sont très sensibles à la digestion par la trypsine (Li *et al.*, 2007; Sellami *et al.*, 2015). De plus, le fragment polypeptidique de taille 62 kDa représentant la toxine Vip3 active et ayant été exprimé seul chez *E. coli* était biologiquement inactif et sensible à l'action des trypsines. Ceci montre que la partie N-terminale serait nécessaire pour le repliement correct de la protéine Vip3 entière et ainsi pour former la protéine de taille 62 kDa qui représente la portion active et résistante à l'action des trypsines, malgré qu'elle sera clivée pour activer la protéine (Lee *et al.*, 2003). Dans

ce même contexte, Sellami *et al.*, 2016 ont montré que l'ajout de 2 résidus (RS) ou encore de 11 résidus d'acides aminés (RSRPGHHHHHH) du côté C-terminal a déstabilisé la protéine Vip3A1-4. Ils ont remarqué que la forme entière de 88 kDa correspondant à la protéine Vip3A1-4 diminue tout en ajoutant des acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine et que l'abondance de la forme de protéolyse de 66 kDa était plus importante suite à l'addition des résidus (RS) par rapport aux résidus 11R (RSRPGHHHHHH). Ils ont également remarqué que l'ajout de (39R) du côté N-terminal a déstabilisé entièrement la protéine Vip3A1-4. Les tests de toxicité ont montré que les larves d'*Ephestia kuehniella* étaient peu affectées par l'effet de l'ajout de (11R) et pas affectés par celui de (2R) en comparaison avec la forme sauvage qui était toxique. D'autre part, la forme protéolysée de la protéine Vip3A1-4 obtenue suite à l'addition d'une succession de 39 acides aminés au niveau de la séquence N-terminale s'est avérée inactive, démontrant l'importance de la présence de cette extrémité.

### Détermination de la région minimale toxique de Vip3A

Afin de déterminer le segment polypeptidique minimal des protéines Vip3 qui préserve l'activité insecticide sur les Lépidoptères, des gènes renfermant des délétions correspondant aux extrémités N- ou C-terminales ont été construits, exprimés chez *E. coli* et utilisés pour réaliser des tests de toxicité vis-à-vis de *Chilo partellus* et *Spodoptera litura* (Selvapandiyar *et al.*, 2001). Les résultats montrent que Vip-S agit différemment vis-à-vis des deux insectes:

- La délétion de 39 acides aminés du côté N-terminal n'altère pas l'activité envers *Chilo partellus* mais réduit la toxicité envers *Spodoptera litura* d'une manière remarquable.
- La délétion de 154 acides aminés du côté C-terminal provoque la réduction de la toxicité envers *C. partellus* et n'abolit pas l'action vis-à-vis de *S. litura*.

### Échange de domaines des protéines Vip3

Une étude a combiné l'action des deux protéines Vip3Ac1 et Vip3Aa1 présentant une différence significative au niveau de la séquence d'acides aminés. La protéine Vip3Ac1 possède une activité importante et plus élevée vis-à-vis de *Spodoptera frugiperda* et de *Helicoverpa zea* en comparaison avec Vip3Aa1. D'autre part, l'activité de Vip3Ac1 est plus faible que celle de Vip3Aa1 envers *Bombyx mori*. En plus, les deux protéines Vip3Aa1 et Vip3Ac1 ne présentent pas d'activité pour *Ostrinia nubilalis*. Cette étude a révélé que le spectre d'action de la protéine Vip3Ac1 est altéré par l'échange de domaines avec la protéine Vip3Aa1. En effet, l'union de la partie N-terminale et la partie C-terminale des deux protéines formant ainsi la protéine chimérique Vip3AcAa: NterVip3Ac (600 résidus)-CterVip3Aa (190 résidus) devient toxique contre *Ostrinia nubilalis* et présente une toxicité plus élevée vis-à-vis de *Spodoptera frugiperda*, ce qui montre que les variations existant au niveau des séquences influencent les différences des propriétés insecticides (Fang *et al.*, 2007).

### Fusion du gène *vip3* avec la séquence C-terminale du gène *cry1C*

Après avoir exprimé le gène *vip3Aa7* sous le contrôle du promoteur, du terminateur et de la séquence STABSD (Shine Delgarno) du gène *cry1C* et provoqué ainsi le changement de l'expression de la protéine Vip3Aa7 dans la cellule mère de *B. thuringiensis* au lieu d'être sécrétée dans le surnageant, une fusion avec la séquence C-terminale du gène *Cry1C* a été réalisée. Cette fusion a provoqué l'augmentation de la synthèse de la protéine Vip3Aa7 sous forme de corps d'inclusion, ce qui facilite le développement de techniques de formulation.

Les deux fusions réalisées présentent une activité très faible envers les lépidoptères *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua* et *Plutella xylostella* par rapport à la protéine Vip3Aa native. Ceci est peut-être dû au mauvais repliement des protéines dans les deux cas (Song et al., 2008).

### Fusion du gène *vip3* avec la totalité de l'ORF du gène *cry1C*

Une fusion chimérique a été construite avec les deux régions codantes de deux protéines *Cry1Ac* et *Vip3Aa14*. L'expression de cette fusion chez *E. coli* a donné une protéine stable de taille 140 kDa. Il a été démontré que la protéine *Cry1Ac* est active sur *Helicoverpa armigera* et *Plutella xylostella* mais pas sur *Spodoptera litura*. D'autre part, la protéine *Vip3Aa14* est active sur *S. litura* mais pas sur *H. armigera* et *P. xylostella*. La nouvelle fusion *Cry1Ac-Vip3Aa14* préserve l'activité de *Cry1Ac* mais perd partiellement celle de *Vip3Aa14*. Ceci a été expliqué par le mauvais repliement de la protéine *Vip3Aa14* (Saraswathy et al., 2008).

### Interactions avec autres protéines insecticides

Le synergisme d'action a été observé entre les protéines *Vip3Aa* et *Cyt2Aa* contre les larves de lépidoptères *Chilo suppressalis* et *Spodoptera exigua* après leurs co-expression chez *E. coli*. Au contraire, cette combinaison a été peu antagoniste vis-à-vis des larves de *C. quinquefasciatus* (Yu et al., 2012). D'autre part, Bergamasco et al., (2013) a reporté le synergisme d'action entre les protéines *Vip3A* et *Cry1Ia* chez trois espèces de *Spodoptera* (*S. frugiperda*, *S. albula* et *S. cosmioides*), mais notamment un antagonisme limité chez *Spodoptera eridania*.

Dans ce même contexte, Lemes et al., 2014 ont trouvé un antagonisme d'action entre *Cry1Ca* et *Vip3Aa*, *Vip3Ae* ou *Vip3Af* et entre *Vip3Af* avec *Cry1Aa* ou *Cry1Ac* vis à vis *H. virescens*. Ils ont également démontré qu'une combinaison entre *Vip3Aa* et *Cry1Ca* était antagoniste envers *S. frugiperda*, mais synergétique pour le lépidoptère *Diatraea saccharalis*.

Le mécanisme qui explique ce synergisme et antagonisme est encore non élucidé. Mais, Lemes et al., (2014) a expliqué que l'antagonisme entre *Vip3A* et *Cry1C* est peut-être dû à une interaction physique entre les deux protéines empêchant l'accès aux récepteurs membranaires. Alors que le synergisme peut être expliqué par la formation d'hétéro-oligomères qui améliorent le pouvoir de l'insertion

aux récepteurs membranaires ou la formation des pores, comme c'est déjà proposé pour *Cry1Ac* and *Cry1Aa* (Lee et al., 1996).

### Rôle de la protéine chaperonne P20

La protéine chaperonne P20 est optionnelle chez *B. thuringiensis israelensis* (Dervyn et al., 1995). Son rôle s'est avéré important au cours de la formation du cristal contenant *Cyt1A* (McLean et al., 1987) et durant l'expression de la protéine *Cry11A* (Yoshisue et al., 1992). Pour étudier l'influence de cette protéine chaperonne sur la production de la protéine *Vip3A* et sur l'activité insecticide, une co-expression des protéines P20 et *Vip3A* a été réalisée. Pour ce faire, un plasmide recombinant portant les deux types de gènes a été construit et a été transféré chez une souche de *B. thuringiensis* acristallifère *Cry* (-) et *vip3A* (-). Le suivi de la production de *Vip3A* par Western blot a montré que la production de la protéine atteint son maximum après 48 h de croissance et se maintient élevé durant la phase de sporulation. L'ajout de la protéine P20 a amélioré le taux d'expression de la protéine *Vip3A* d'environ 1,5 fois. Ceci suggère que la protéine P20 interagira avec la protéine *Vip3A* native durant la phase de sporulation, la stabilise et la protège de la protéolyse non spécifique. Pour les tests de toxicité réalisés avec *Spodoptera litura*, l'activité insecticide de *Vip3A* reste la même avec ou sans co-expression avec la protéine P20 (Shi et al., 2006).

De plus, la co-expression du gène codant P20 avec le gène *cry1Ac* a provoqué l'augmentation de la production de la protéine *Cry1Ac* d'environ 2,5 fois plus qu'en absence de P20, la formation de cristaux de grandes tailles qui peuvent atteindre environ 3 fois la taille de ceux obtenus sans co-expression de P20 et par la suite l'obtention d'un taux de toxicité plus élevé vis-à-vis de *Heliothis armigera* (Shao et al., 2001).

### Expression hétérologue du gène *vip3* et OGM (Organismes Génétiquement Modifiés)

Pour contrôler les insectes ravageurs, le gène *vip3A* a été transféré dans différents hôtes : plante, champignon, bactérie.

#### Chez les champignons

Le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* possède une activité insecticide vis-à-vis de plusieurs insectes ravageurs. Afin d'améliorer ses activités entomopathogènes, Qin et al. (2010) ont intégré le gène *vip3Aa1* à ce champignon. La protéine *Vip3Aa1* (88 kDa) a été détectée au niveau du cytoplasme des conidies fongiques recombinantes. Ces dernières ont été par la suite utilisées pour l'infection des larves du lépidoptère *Spodoptera litura* à travers leurs administrations au moyen de feuilles pulvérisées. La protéine *Vip3Aa1* a été également détectée au niveau de l'intestin larvaire, mais sous une forme protéolysée (62 kDa) et ce après 18 h et 36 h suite à l'ingestion des conidies.

## Chez les Bactéries

La bactérie *Escherichia coli* a été utilisée pour réaliser l'expression hétérologue des protéines Vip3. Pour ce faire, plusieurs vecteurs ont été utilisés, il s'agit par exemple du plasmide p-*Bluescript* ayant servi au clonage du gène *vip3A* puis testée sur les larves de Lépidoptère *Agrotis ipsilon* causant ainsi la mort des larves (Estruch et al., 1996) ou encore du plasmide pET qui a été utilisé pour cloner plusieurs gènes *vip3* en fusion avec une étiquette Histidine tels que le gène *vip3V* (Doss et al., 2002) et *vip3LB* (Mesrati et al., 2009). Ces protéines ont conservé leurs activités lorsqu'elles sont présentes chez *E. coli* ou après leur purification.

D'autre part, le gène *vip3Aa* a été clone chez *Pseudomonas fluorescens* dans le but de produire des insecticides pulvérisables à base de Vip3A seuls ou combinés avec des protéines Cry (Hernández-Rodríguez et al., 2013).

## Les plantes transgéniques

L'incorporation des gènes insecticides de *B. thuringiensis* dans les plantes semble être la solution idéale pour lutter contre les ravageurs du fait que les toxines incorporées s'expriment d'une manière continue et sont protégées des rayonnements UV. Plusieurs gènes *cry* ont été introduits dans les plantes, en commençant par le tabac (Barton et al., 1987) et beaucoup d'autres cultures comme la pomme de terre, le riz, le maïs et le coton (Tabashnik et al., 2010; James et al., 2009; Adang et al., 1993; Fujimoto et al., 1993). Des plantes transgéniques de *B. thuringiensis* ont été réalisées partout dans le monde et ont contribué à la diminution de l'utilisation des produits chimiques et à la suppression d'insectes ravageurs tel que la teigne du coton *Plutella gossypiella* (Tabashnik et al., 2010; James et al., 2009).

Entrées récemment aux marchés commerciaux, les protéines Vip3 ont été exprimées au niveau de plusieurs plantes transgéniques tels que le tabac (Singh et al., 2008), le maïs (Raybould et al., 2011; Christou et al., 2006) et le coton (Kurtz et al., 2007). Les plantes transgéniques Vip3 sont saines pour les vertébrés. En effet, il a été démontré que les OGM-Vip3 ne présentent pas de danger pour les rats « *Wistar* », les rongeurs et les poulets « *Broiler* » (Peng et al., 2007; Brake et al., 2005).

## CONCLUSION

La construction de gènes hybrides composés de différents éléments régulateurs d'expression, la conception de protéines chimériques ainsi que l'interaction avec d'autres protéines à activités entomopathogènes ont mené à l'accroissement de l'activité insecticide et l'élargissement du spectre d'action des protéines Vip3, considérées comme de nouvelles candidates très prometteuses dans le contrôle biologique des insectes ravageurs.

## RÉFÉRENCES

- Abdelkefi-Mesrati L, Boukedi H, Chakroun M, Kamoun F, Azzouz H., Tounsi S., Rouis S., Jaoua S. (2011a). Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 107:198-201.
- Abdelkefi-Mesrati L, Boukedi H, Dammak-Karray M, Sellami-Boudawara, T, Jaoua, S, Tounsi, S (2011b). Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 106:250-254.
- Abdelkefi-Mesrati L, Rouis S, Sellami S, Jaoua S (2009). *Prays oleae* Midgut Putative Receptor of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3LB Differs from that of Cry1Ac Toxin. *Mol. Biotechnol.* 43:15-19.
- Adang M.J, Brody M.S, Cardineau G, Eagan N, Roush R.T, Shewmaker C. K, Jones A, Oakes J. V, McBride K.E (1993). The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* 6:1131-1145.
- Agaisse H., Lereclus D (1994). Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIa* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *J. Bacteriol.* 176:4734-4741.
- Arora N, Selvapandiyan A, Agrawal N, Bhatnagar R.K (2003). Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310:158-162.
- Baranek J., Kaznowski A., Konecka E., Naimov S. (2015). Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. *J. Invertebr. Pathol.* 130:72-81.
- Barton K.A, Whiteley H.R, Yang N.S (1987). *Bacillus thuringiensis* section sign- Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. *Plant Physiol.* 85:1103-1109.
- Ben Hamadou-Charfi, D, Boukedi H, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S, Jaoua S (2013). *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 114:139-143.
- Bergamasco V.B, Mendes D.R, Fernandes O. A, Desidério J.A, Lemos M.V (2013). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 112:152-158.
- Bhalla R, Dalal M, Panguluri S.K, Jagadish B, Mandakar A.D, Singh A.K, Kumar P.A (2005). Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243:467-472.
- Boukedi H, Ben Khedher S, Triki N, Kamoun F, Saadaoui I, Chakroun M, Tounsi S, Abdelkefi-Mesrati L (2015). Overproduction of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin and study of its insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. *J. Invertebr. Pathol.* 127:127-129.
- Brake J, Faust M, Stein J (2005). Evaluation of Transgenic Hybrid Corn (VIP3A) in Broiler Chickens. *Poult Sci.* 84: 503-512.

- Chakroun M, Bel Y, Caccia S, Abdelkefi-Mesrati L, Escriche B, Ferré J (2012). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. *J. Invertebr. Pathol.* 110:334-339.
- Chankhamhaengdechaa S.T, Tantichodokb A Watanalai P (2008). Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai SP41 against *Spodoptera exigua*. *J. Biotechnol.* 136:122-128.
- Chen J, Yu J, Tang L, Tang M, Shi Y, Pang Y (2003). Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated *vip3A* gene in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 95:310-306.
- Chen J, Sun y, Shi W.G, Pang Y (2004). Efficient expression of *vip184ΔP* gene under the control of promoters plus Shine-Dalgarno (SD) sequences of cry genes from *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 99:426-434.
- Christou P, Capell T, Kohli A, Gatehouse, J.A, Gatehouse A.M (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant.* 11:302-308.
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean D.H (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/)
- Dervyn E, Poncet S, Klier A, Rapoport G (1995). Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 177:2283-2291.
- Dong F, Shi R, Zhang S, Zhan T, Wu G, Shen J, Liu Z (2012). Fusing the vegetative insecticidal protein Vip3Aa7 and the N terminus of Cry9Ca improves toxicity against *Plutella xylostella* larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:921-929.
- Dong F, Zhang S, Shi R, Yi S, Xu F, Liu Z (2012). Ser-substituted mutations of Cys residues in *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa7 exert a negative effect on its insecticidal activity. *Curr. Microbiol.* 65:583-588.
- Doss V.A, Kumar K.A, Jayakumar R, Sekar V (2002). Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (*vip3V*) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. *Protein Expres. Purif.* 26:82-88.
- Espinasse S, Chaufaux J, Buisson C, Perchat S, Gohar M, Bourguet D, Sanchis V (2003). Occurrence and Linkage Between Secreted Insecticidal Toxins in Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 47:501-507.
- Estruch J.J, Warren G.W, Mullins M.A, Nye G.J, Craig J. A, Koziel M.G (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93:5389-5394.
- Fang J, Xu X, Wang P, Zhao J.Z, Shelton A.M, Cheng J, Feng M.G, Shen Z (2007). Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:956-961.
- Figueiredo C.S, Marucci S.C, Tezz R.I.D, Lemos M.V.F, Desidéro J.A (2013). Characterization of the *vip3A* gene and toxicity of Vip3Aa50 protein to fall armyworm and velvetbean caterpillar. *Pesq. agropec. bras.* 48.
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyojuka J, Shimamoto, K (1993). Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology.* 10:1151-1155.
- Gonzalez J.M.Jr, Brown B.J, 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.
- Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez C.S, Van Rie J, Escriche B, Ferré J (2013). Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. *J. Invertebr. Pathol.* 113:78-81.
- Hernández-Rodríguez C.S, Boets A, Van Rie J, Ferré J (2009). Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Appl. Microbiol.* 107: 219-25.
- James C (2009). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009. ISAAA Brief No. 41. ISAAA, Ithaca, NY.
- Kurtz R.W, McCaffery A, O'Reilly D (2007). Insect resistance management for Syngenta's VipCot<sub>1</sub> transgenic cotton. *J. Invertebr. Pathol.* 95:227-230.
- Lee M.K, Curtiss A, Alcantara E, Dean D.H (1996). Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIaC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 583-586.
- Lee M.K, Walters F.S, Hart H, Palekar N, Chen J.S (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4648-4657.
- Lemes A.R, Davolos C.C, Legori P.C, Fernandes O.A, Ferré J, Lemos M.V, Desiderio J.A (2014). Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One* 9: e107196.
- 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.
- Li C, Xu N, Huang X, Wang W, Cheng J, Wu K, Shen Z (2007). *Bacillus thuringiensis* Vip3 mutant proteins: Insecticidal activity and trypsin sensitivity. *Biocontrol Sci. Tech.* 17:699-708.
- Liu J, Song F, Zhang J, Liu R, He K, Tan J, Huang D (2007). Identification of *vip3A*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:432-438.
- McLean K.M, Whiteley H.R (1987). Expression in *Escherichia coli* of a cloned crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 169:1017-1023.
- Mesrati A.L, Tounsi S, Jaoua S (2005). Characterization of a novel *vip3*-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 244:353-358.
- Palma L, Ruiz D.E. I, Maeztu M, Caballero P, Muñoz D (2013). Screening of *vip* genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests. *Biol. Control.* 66:141-149.

- Peng D, Chen S, Ruan L, Li L, Yu Z, Sun M (2007). Safety assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* with VIP insecticidal protein gene by feeding studies. *Food Chem. Toxicol.* 45:1179-85.
- Qin Y, Ying S.H, Chen Y, Shen Z.C, Feng M.G (2010). Integration of Insecticidal Protein Vip3Aa1 into *Beauveria bassiana* Enhances Fungal Virulence to *Spodoptera litura* Larvae by Cuticle and *Per Os* Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4611-4618.
- Raybould A, Vlachos D (2011). Non-target organism effects tests on Vip3A and their application to the ecological risk assessment for cultivation of MIR162 maize. *Transgenic Res.* 20:599-611.
- Ruiz de Escudero I, Banyuls N, Bel Y, Maeztu M, Escriche B, Muñoz D, Caballero P, Ferré J (2014). A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. *J. Invertebr. Pathol.* 113: 78-81.
- Saraswathy N, Nain V, Sushmita K, Kumar A.P (2008). A fusion gene encoding two different insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Indian J. Biotechnol.* 7:204-209.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler, D.R, Dan D.H (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Sellami S, Cherif M, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S, Jamoussi K (2015). Toxicity, activation process, and histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 on *Tuta absoluta*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175:1992-1999.
- Sellami S, Cherif M, Jamoussi K (2016). Effect of adding amino acids residues in N- and C-terminus of Vip3Aa16 (L121I) toxin. *J. Basic Microbiol.*
- Sellami S, Jamoussi K, Dabbeche E, Jaoua S (2011). Increase of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxicity against lepidopteron larvae by homologous expression of the *vip3LB* gene during sporulation stage. *Curr. Microbiol.* 63:289-294.
- Sellami S, Zghal T, Cherif M, Zalila-Kolsi I, Jaoua S, Jamoussi K (2013). Screening and identification of a *Bacillus thuringiensis* strain S1/4 with large and efficient insecticidal activities. *J. Basic Microbiol.* 52: 1-10.
- Selvapandiyam A, Arora N, Rajagopal R, Jalali S.K, Venkatesan T, Singh S.P, Bhatnagar R.K (2001). Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5855-5858.
- Sena J.A, Hernández-Rodríguez C.S, Ferré J. (2009). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3Aa proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2236-2237.
- Shao Z, Liu Z, Yu Z (2001). Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5362- 5369.
- Shi Y.X, Yuan M.J, Chen J.W, Sun F, Pang Y. (2006). Effects of helper protein P20 from *Bacillus thuringiensis* on Vip3A expression. *Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.* 46: 85-89.
- Singh C.K, Ojha A, Bhatnagar R.K, Devendra K.N (2008). Detection and characterization of recombinant DNA expressing *vip3A*-type insecticidal gene in GMOs-standard single, multiplex and construct-specific PCR assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 390: 377-387.
- Song R, Peng D, Yu Z, Sun M (2008). Carboxy-terminal half of Cry1C can help vegetative insecticidal protein to form inclusion bodies in the mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 647-654.
- Tabashnik B.E, Sisterson M.S, Ellsworth P.C, Dennehy T.J, Antilla L, Liesner L, Whitlow M, Staten R.T, Fabrick J.A, Unnithan G.C, Yelich A.J, Ellers-Kirk C, Harpold V.S, Li X, Carrière Y (2010). Suppressing resistance to *Bt* cotton with sterile insect releases. *Nat. Biotechnol.* 12:1304-1307.
- Wong, H.C, Schnepf H.E, Whiteley H.R (1983). Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 258: 1960-1967.
- Wu J, Zhao F, Bai J, Deng G, Qin S, Bao Q (2007). Evidence for positive Darwinian selection of *vip* gene in *Bacillus thuringiensis*. *J. Genet. Genomics.* 34: 649-60.
- Yoshisue H, Yoshida K, Sen K, Sakai H, Komano T (1992). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 20-kDa protein on production of the Bti 130-kDa crystal protein in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56:1429-1433.
- Yu X, Liu T, Sun Z, Guan P, Zhu J, Wang S, Li S, Deng Q, Wang L, Zheng A, Li P (2012). Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 64:326-331.
- Zhu C, Ruan L, Peng D, Yu Z, Sun M (2006). Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:109-114.