

Effets physiologiques et mutagènes sur les Insectes de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner *

par A. BURGERJON

I.N.R.A. Station de Recherches de Lutte biologique, La Minière, F 78000 Versailles

Résumé

La toxine thermostable produite par un certain nombre de souches de *Bacillus thuringiensis* exerce sur les insectes, par application orale aux stades immatures, des effets originaux aussi bien aux doses léthales qu'aux doses subléthales. La plupart de ces effets sont rappelés en schémas synthétiques, afin de faire ressortir les conditions de mise en évidence de la transmissibilité des caractères tératologiques.

L'effet mutagène de la T.T. a été découvert sur le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say et reste encore limité à cette espèce. Il constitue un phénomène original du fait de sa reproductibilité. Toutefois, les malformations sont transmises avec de légères modifications : les griffes sur des antennes en forme de massue après traitement des larves sont l'objet d'altérations tératologiques au niveau des pattes chez les générations suivantes.

Summary

The mutagenetic effect on insects by the thermostable toxin of Bacillus thuringiensis Berliner.

The most striking specific teratological effects of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* have been observed on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say.

* Travail présenté au colloque « Pesticides » du X^e Congrès international de Microbiologie, Mexico 1970.

A new study shows that these morphogenetic modifications are transmissible to the offspring. A short account is given about the actual knowledge of the effect of the thermostable toxin on insects in order to emphasize the particular conditions in which teratological individuals are obtainable.

Introduction :

La production d'une toxine thermostable (T.T.) dans les milieux de culture par certaines souches de *Bacillus thuringiensis* a été mise en évidence grâce à son action sur les insectes à la fois par injection (MacConnell et Richards, 1959) et par ingestion (Burgerjon et de Barjac, 1960, 1962). L'isolement et la purification de cette toxine de nature nucléotidique à base d'adénine, ribose et phosphate ont été réalisés par de Barjac et Dedonder (1965, 1968). Depuis, la composition chimique de la toxine a été confirmée par différents auteurs (Benz, 1966, Sebesta *et al.*, 1969 ; Farkas *et al.*, 1969 ; Bond, 1969 ; Young et Huang, 1970) et, à côté de l'adénine, du ribose et du phosphate, la présence de glucose et d'acide allomucique a été démontrée.

Parallèlement, des études ont porté sur l'action de cette toxine (purifiée ou non) :

- *in vivo* sur les insectes, dont elle perturbe les mues (Burgerjon *et al.*, 1964) ou d'autres fonctions physiologiques (David et Vago, 1967 ; Van Herrewege, 1969) avec possibilité d'effets tératologiques (Burgerjon et Biache, 1967 *a, b* ; Burgerjon *et al.*, 1969 ; Mayas, 1969) ;
- *in vitro* sur les cultures de cellules de vertébrés en produisant des lésions nucléaires (Riou, 1968) ;
- *in vivo* et *in vitro* sur la synthèse du R.N.A. pour laquelle elle a un rôle inhibiteur (Sebesta *et al.*, 1968 *a, b*).

Quelques auteurs (Krieg et Herfs, 1963 *a* ; Benz, 1966) ont examiné d'une façon préliminaire l'action de la toxine sur Vertébrés, soit par injection, soit par ingestion, tandis que de Barjac et Riou (1969) ont effectué des recherches plus détaillées sur ce sujet.

Dans cette note, nous démontrons l'effet mutagène de la T.T. Pour mieux situer les conditions spéciales dans lesquelles cet effet nouveau se manifeste, il nous paraît opportun de résumer l'ensemble des connaissances actuelles sur l'action *in vivo* de la T.T. chez les insectes.

Action sur les Lépidoptères :

L'action de la T.T. administrée à des doses variables, soit léthales, soit subléthales par libre ingestion au stade immature des Lépidoptères, a été étudiée par Burgerjon et Biache (1967 *a b*), et Mayas (1969). Le schéma de la figure 1 résume l'essentiel de leurs résultats concernant l'effet des doses subléthales en fonction de la période physiologique critique d'intoxication.

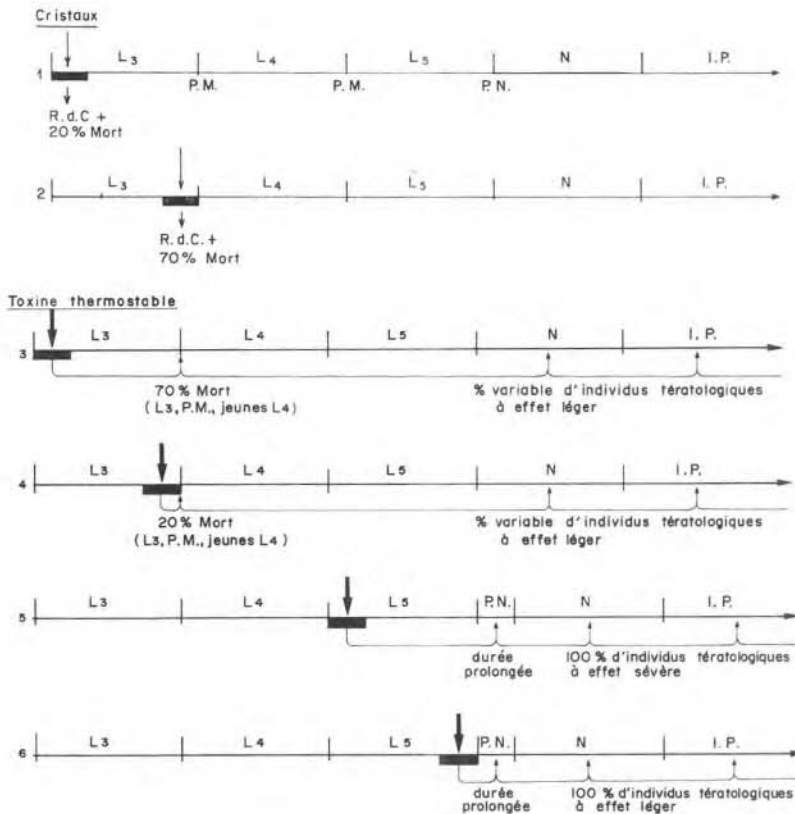


FIG. 1. — Représentation schématique de l'effet des cristaux et de la toxine thermostable à des doses subléthales sur Lépidoptères (*Pieris brassicae* L.; *Laspeyresia pomonella* L.).

L3, L4, L5 = 3, 4 et 5^e stade larvaire.

PM = prémue; PN = Prénympe; N = Nympe; IP = Adulte.

R de C = Réduction de consommation.

1. Intoxication par des cristaux au début du 3^e stade larvaire.
2. Intoxication par des cristaux à la fin du 3^e stade larvaire.
3. Intoxication par la T.T. au début du 3^e stade larvaire.
4. Intoxication par la T.T. à la fin du 3^e stade larvaire.
5. Intoxication par la T.T. au début du dernier stade larvaire.
6. Intoxication par la T.T. à la fin du dernier stade larvaire.

On constate que la T.T. provoque des phénomènes typiques, d'une part, au moment des mues larvaires et nymphales, d'autre part, aux stades de chrysalide et d'imago, alors que l'ingestion a eu lieu bien avant ces stades. En outre, l'effet est d'autant plus prononcé que la période d'ingestion à l'intérieur d'une intermue se trouve plus éloignée de la prochaine mue larvaire ou nymphale. Il est cependant important de souligner que les mues se produisent souvent chez la presque totalité des

insectes traités, même lorsqu'il y a une mortalité importante ou totale. Dans ces cas, celle-ci intervient progressivement après l'accomplissement de la mue ; mais ces chenilles (L4 jeunes sur le schéma) ne s'alimentent pas et ont une activité motrice très réduite.

Par opposition, l'ingestion de cristaux exerce un effet plus classique, comparable à d'autres insecticides d'ingestion (arsenicux, par exemple), puisque l'effet est immédiat et la période des mues est directement vulnérable (l'effet du traitement est plus sévère à proximité de la mue).

Les symptômes tératologiques (voir schéma, fig. 1) provoqués par la T.T. sont très caractéristiques et circonscrits aux appendices céphaliques et buccaux (effet léger du schéma) ; à forte dose, le thorax et les pattes sont également atteints (effet sévère du schéma), mais les ailes et les segments abdominaux ne sont jamais atrophiés (Burgerjon et Biache, 1967 *a, b*).

Action sur les Coléoptères :

L'effet tératologique de la T.T. a été étudié principalement chez le Doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Burgerjon *et al.*, 1969). On peut constater l'atrophie de certains organes d'une manière comparable à ce que l'on observe chez les Lépidoptères, mais, en outre, des anomalies morphogénétiques se sont révélées : les antennes se transforment en une massue et portent souvent, à leurs extrémités, une paire de griffes, morphologiquement identiques à celles des tarsi des pattes. Les pattes restent normales. L'atrophie des palpes entraîne leur transformation en une partie impaire.

Le prolongement de la période prénymphale chez le Doryphore, après traitement au dernier stade larvaire, est très net (fig. 2) (Burgerjon, 1972) et confirme le même phénomène constaté chez un Lépidoptère (*Carpocapsa pomonella*), également à période prénymphale normalement longue (Mayas, 1969).

L'ingestion de la T.T. au troisième stade larvaire, c'est-à-dire à l'avant-dernier stade, engendre également des adultes tératologiques (seulement au niveau des antennes et non pas au niveau des palpes), sans que la durée de la période prénymphale en soit prolongée (fig. 2, n° 2) ; par conséquent, dans le cas d'une application au dernier stade larvaire, le prolongement de la période prénymphale, d'une part (fig. 2, n° 3), et l'apparition d'individus tératologiques, d'autre part, suggèrent l'existence de deux manifestations physiologiques indépendantes.

Action sur les Diptères :

Chez *Musca domestica*, Cantwell *et al.* (1964 *a*) n'ont pas apporté de précisions sur l'action chez les larves de la T.T. Ces auteurs constatent généralement, au moment de la pupaison, des pupes partiellement achevées ou des adultes présentant des malformations alaires. Cependant, des doses faibles en T.T. peuvent donner des adultes apparemment normaux et il faut recourir à la dissection pour constater que le labre épipharynx est atrophié (Burgerjon et Biache, 1967 *a, b*) ; ce qui constitue un équivalent de l'atrophie de la trompe chez les Lépidoptères. Sur le plan physiologique, il

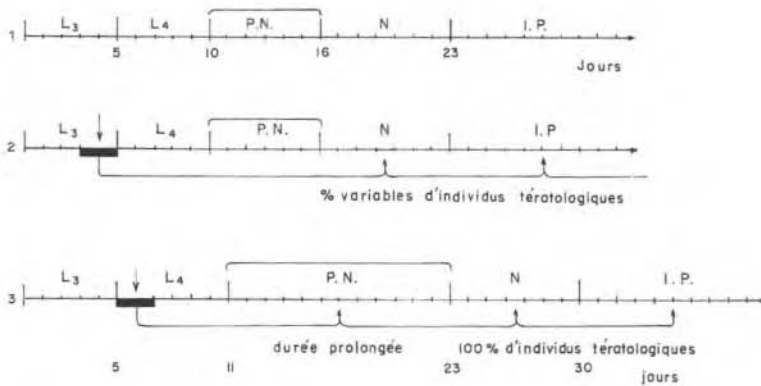


FIG. 2. — Effet de la toxine thermostable à une dose subléthale sur un Coléoptère (*Leptinotarsa decemlineata* Say).

L3, L4 = 3 et 4^e stade larvaire.

PN = Prénympe ; N = Nympe ; IP = Adulte.

1. Evolution normale de l'insecte.

2. Intoxication à la fin du 3^e stade larvaire.

3. Intoxication au début du dernier stade larvaire.

importe de vérifier dans quelle mesure l'atrophie des ailes est une affection indépendante ou bien la conséquence d'une émergence défectueuse.

Chez *Drosophila melanogaster*, Van Herrewege (1969) a montré que l'intoxication provoque un retard de développement larvaire et que la mortalité frappe surtout les femelles. L'auteur n'a pas observé d'effet tératologique chez les adultes. En traitant les imagos, l'auteur constate une réduction de la fécondité et une baisse du pourcentage d'éclosion des œufs, attribuées à des altérations physiologiques chez les mâles.

Action sur les Hyménoptères :

Quelques travaux mentionnent l'effet de la T.T. sur des Tenthredes, comme *Pristiphora pallipes*, *Diprion pini* et *Athalia colibri* (Burgerjon et de Barjac, 1960-1962 ; Burgerjon et Biache, 1964 ; Laurent, 1963 ; Sissoko, 1968), dont *Diprion pini* en traitement expérimental dans la nature. L'effet de la toxine sur le stade larvaire est également caractérisé par sa manifestation reportée à la prochaine mue. Un effet tératologique n'a pas pu être mis en évidence.

De fortes doses de T.T. administrées à l'abeille adulte (*Apis mellifera*) sont léthales (Krieg et Herfs, 1963 b ; Martouret et Euverte, 1964 ; Cantwell *et al.*, 1964 b).

Action sur les Orthoptères :

Peu d'études de l'influence de la T.T. sur les hétérométaboles ont été entreprises. Burgerjon *et al.* (1964) observent chez *Locusta migratoria* que l'effet d'une dose léthale administrée aux jeunes stades larvaires ne se manifeste que tardivement à

l'occasion de la prochaine mue. Celle-ci n'a pas lieu, ou bien est incomplète (l'exuvie s'est partiellement détachée), ou a lieu, mais l'insecte meurt sans s'être réalimenté. Des intoxications subléthales déterminent, d'après Gry (1971), chez *Schistocerca gregaria*, une réduction de croissance, un retard des mues et une diminution de sensibilité à la T.T. avec l'âge des larves. L'auteur n'a pas mis en évidence d'effet tératologique chez ce représentant des hétérométaboles.

Effet mutagène de la toxine thermostable :

Les adultes tératologiques du doryphore sont aptes à la reproduction, puisque les mandibules restent pratiquement intactes et permettent une alimentation satisfaisante. L'élevage de deux générations successives avec une dizaine de couples atrophiés (fig. 3, dessin de gauche) a permis de constater la transmission héréditaire des caractères tératologiques (fig. 3). Cependant, on constate chez les descendants (fig. 3, dessin de droite) que les griffes ont disparu sur les antennes, mais qu'elles sont atrophiées aux tarse des pattes ; ces dernières peuvent également être absentes ou réduites très

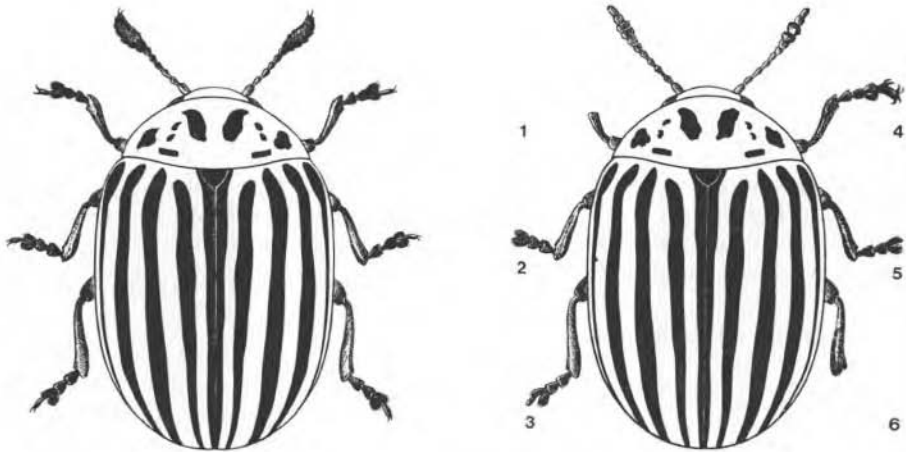


FIG. 3. — Dessin schématique de l'effet mutagène de la toxine thermostable sur le Doryphore : *Lepinotarsa decemlineata* Say (dessin Prechac, I.N.R.A.).

Adulte résultant de l'ingestion de la T.T. au stade larvaire Adulte résultant de l'accouplement d'individus du type d'à côté de la T.T. au stade larvaire

Antennes en forme d'une massue portant une paire de griffes.

Pattes normales.

Antennes ne portant plus que deux articles gonflés sans griffes

- Pattes anormales :
1. Tibia abrégé au milieu.
 2. Distitarse absent.
 3. Paire de griffes absente.

4. Distitarse déformé portant 3 paires de griffes.
5. Distitarse abrégé au milieu.
6. Tous les segments tarsaux absents.

Palpes labiaux atrophiés (non représentés sur le dessin).

7. Patte entière absente. Palpes labiaux atrophiés.

non représenté sur le dessin.

souvent au milieu d'un des articles qui composent les pattes et non pas nécessairement aux articulations. L'atrophie des palpes se transmet sans modification notable.

Les adultes tératologiques issus d'un traitement direct effectué au dernier ou à l'avant-dernier stade larvaire ne présentent donc pas les mêmes déformations morphologiques que ceux issus de l'accouplement de tels individus. Néanmoins, dans les deux cas, il s'agit de perturbations de la morphogenèse des pattes ou, du moins, affectant les griffes des pattes. Réciproquement, le fait que les griffes se trouvent atrophiées à l'extrémité des pattes à la deuxième génération, après le traitement, vient à l'appui des observations morphologiques, indiquant que sur les antennes il s'agit bien de griffes d'origine tarsienne.

Quelques expériences préliminaires, effectuées avec des adultes de Lépidoptères (chez lesquels manquent les palpes et la trompe), appartenant à des espèces n'ayant pas besoin de s'alimenter pour pondre (*Anagasta kuhniella*, *Mamestra brassicae*), ne nous ont pas permis de mettre en évidence, jusqu'à présent, une transmissibilité des caractères tératologiques chez les Lépidoptères.

Conclusion :

L'ensemble des effets décrits dans cette note semble donc indiquer que l'action de la toxine thermostable s'exerce principalement au niveau de certains mécanismes physiologiques bien déterminés et propres aux insectes holométaboles, qui subiraient donc des affections malignes et héréditaires. Chez les insectes à métamorphoses incomplètes (les criquets, par exemple), de faibles conséquences sont enregistrées également, à l'occasion des mues, sans affecter la forme adulte, ce qui traduirait une incidence bénigne de l'ingestion de la T.T. chez ces insectes.

Ces manifestations permettent de penser à une spécificité de la toxine thermostable chez les insectes (bien qu'elle soit moins stricte que celle des cristaux) et, d'autre part, à son innocuité en absorption orale chez les animaux supérieurs. Ce point de vue paraît être confirmé par de nombreux travaux, surtout antérieurs à l'époque où l'existence et l'effet de la T.T. furent reconnus dans les préparations expérimentales ou industrielles (Burgerjon et de Barjac, 1962 ; Burgerjon, 1962 ; Burgerjon et Galichet, 1965), en particulier ceux qui ont eu pour objet de faire ingérer la T.T. à des animaux de ferme, afin de rendre toxiques des fèces pour les larves d'un certain nombre de Diptères coprophages ou parasites du bétail (Dunn, 1960 ; Harvey et Brethour, 1960 ; Burns *et al.*, 1961 ; Borgatti et Guyer, 1963).

Il serait souhaitable que des physiologistes d'insectes et des généticiens poursuivent les recherches sur la toxine thermostable de *B. thuringiensis*, à la fois au point de vue théorique et dans un but pratique.

Bibliographie

- BARJAC (H. DE) et DEDONDER (R.), 1965. — Isolement d'un nucléotide identifiable à la « toxine thermostable » de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. *C.R. Acad. Sc. Série D*, 260 (26), 7050-7052.
- , 1968. — Purification de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* et analyses complémentaires. *Bull. Soc. Chim. Biol. Fr.*, 50 (4), 941-944.
- et RIOU (J. Y.), 1969. — Action de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* administrée à des souris. *Rev. Pathol. Comp. Méd. Exp.*, 6, 19-26.
- BENZ (G.), 1966. — On the chemical nature of the heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Experientia*, 22, 81-82.
- BOND (R. P. M.), 1969. — Some chemical and biological studies on an exotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *Biochem. J.*, 114 (1) : 10. (Proceed. of the Chemical Society, Colloq. on Naturally Occur. materials of potential use for control of plants and animals, 1969).
- BORGATTI (A. L.) et GUYER (G. E.), 1963. — The effectiveness of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner on house-fly larvae. *J. Insect Pathol.*, 5 (3), 377-384.
- BURGERJON (A.) 1962 (1964). — Principes thermostables dans les préparations industrielles à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga*, Mémoire H.S. 2 : 227-236 (Coll. Int. Pathol. Insectes, 1962, Paris).
- , 1972. — Quelques effets physiologiques de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* sur le Doryphore *Leptinotarsa decemlineata*. *Ent. Exp. Appl.*, 15 (2), 112-127.
- et BARJAC (H. de), 1960. — Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. *C.R. Acad. Sc. Série D.*, 251, 911-912.
- et —, 1962. — Essais préliminaires sur le rôle insecticide de la toxine thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Cong. Int. Entom.* XI, 1960, Vienne, 835-839.
- et BIACHE (G.), 1964. — The activity of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner used in nature against the larvae of *Diprion pini* L. *J. Insect. Pathol.*, 6 (4), 538-541.
- , GRISON (P.) et KACHKOULI (A.), 1964. — Activity of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Locusta migratoria* L. (*Locustidae*, Orth.). *J. Insect. Pathol.*, 6 (3), 381-383.
- et GALICHET (P. F.), 1965. — The effectiveness of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on larvae of *Musca domestica* Linnaeus. *J. Invert. Pathol.*, 7 (2), 263-264.
- et BIACHE (G.), 1967 a — Effets tératologiques chez les nymphes et les adultes d'insectes dont les larves ont ingéré des doses subléthales de toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *C.R. Acad. Sc. Série D*, 264, 2423-2425.
- , 1967 b. — Divers effets spéciaux et symptômes tératologiques de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* en fonction de l'âge physiologique des insectes. *Ann. Soc. Entomol. Fr. N.S.*, 3 (4), 929-952.

- BURGERJON (A.), BIACHE (G.) et CALS (Ph.), 1969. — Teratology of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* 14 (2), 274-278.
- BURNS (E. C.), WILSON (B. H.) et TOWER (B. A.), 1961. — Effect of feeding *Bacillus thuringiensis* to caged layers for fly control. *J. Econ. Ent.*, 54 (5), 913-915.
- CANTWELL (G. E.), HEIMPEL (A. M.) et THOMPSON (M. J.), 1964 a. — The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect. Pathol.*, 6 (4), 466-480.
- , KNOX (D. A.) et MICHAEL (A. S.), 1964 b. — Mortality of honey bees *Apis mellifera* L. fed exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect. Pathol.*, 6 (4), 532-536.
- DAVID (J.) et VAGO (C.), 1967. — Influence des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur divers caractères physiologiques de *Drosophiles* adultes. *Entomophaga*, 12 (2), 153-159.
- DUNN (P. H.), 1960. — Control of house flies in bovine feces by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect. Pathol.*, 2 (1), 13-16.
- FARKAS (J.), SEBESTA (K.), HORSKA (K.), SAMEK (Z.), DOLEJS (L.) et SORM (F.), 1969. — The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *Gelechia*. *Collection of Czechoslov. Chem. Commun.*, 34, 118-120.
- GRY (J.), 1971. — Action de la toxine soluble thermostable de *Bacillus thuringiensis* sur la croissance et le développement du criquet migrateur africain *Locusta migratoria migratorioides* (R. et F.) (*Orthoptera acrididae*). *Thèse Paris Sud : Orsay 3^e cycle Biol. anim.*
- HARVEY (T. L.) et BRETHOUR (J. R.), 1960. — Feed additives for control of house fly larvae in livestock feces. *J. Econ. Entomol.*, 53 (5), 774-776.
- KRIEG (A.) et HERFS (W.), 1963 a. — Empfindlichkeit verschiedener Insektenarten gegenüber dem « Exotoxin » von *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Pflanzenkr. Schutz*, 70 (1), 11-21.
- , 1963 b. — Über die Wirkung von *Bacillus thuringiensis* auf Bienen. *Entom. exp. Appl.*, 6 (1), 1-9.
- LAURENT (J.-E.), 1963. — Elevage permanent d'*Athalia colibri* (Christ.) (*Tenthredinidae*), en vue de tester la toxine soluble thermostable de *Bacillus thuringiensis*. *Bull. E.N.S.A. Nancy*, VII (1), 79-91.
- MACCONNEL (E.) et RICHARDS (A. G.), 1959. — The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable substance toxic for insects. *Canadian J. Microb.*, 5 (2), 161-168.
- MARTOURET (D.) et EUVERTE (G.), 1964. — The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner preparations on the honey bee under conditions of forced feeding. *J. Insect. Pathol.*, 6 (2), 198-203.
- MAYAS (I.), 1969. — Contribution à l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner sur *Laspeyresia pomonella* L. (*Lepidoptera. Tortricidae*). *Thèse 3^e cycle Paris Biologie animale : Entomologie.*
- RIOU (J.-Y.), 1968. — Etude *in vitro* de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner sur la souche cellulaire BKH₂₁ C₁₃. *D.E.A. Biologie cellulaire*. Paris.
- SEBESTA (K.) et HORSKA (K.), 1968 a. — Inhibition of DNA dependent RNA polymeras by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *Gelechia*. *Biophysica Biochimica Acta.*, 169, 281.

- et VANKOVA (J.), 1968 b. — Mechanism of action of the insecticide exotoxin of *Bacillus gelechiae* inhibition of de novo RNA synthesis. *Federation European Biochem. Soc. Meeting*, 5, 1968, Prague, 250.
- , 1969. — Isolation and properties of the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *Gelechiae* Auct. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 34, 891-900.
- SISSOKO (A.), 1968. — Capacité trophique d'un milieu végétal à l'égard de deux espèces phytophages concurrentes *Athalia colibri* Christ. Tenthrede et *Plutella maculipennis* Curtis Lépidoptère. *Thèse 3^e cycle, Paris*, Biologie animale : Entomologie.
- VAN HERREWEGE (J.), 1969. — La toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner (Serotype I), effets sur *Drosophila melanogaster* Meigen. *Thèse 3^e cycle, Lyon, Sci. Biol. (Sci., Appl.)*.
- YOUNG TAI KIM et HUANG (H. T.), 1970. — The B-Exotoxins of *Bacillus thuringiensis* I. Isolation and characterization. *J. Invert. Pathol.*, 15 (1), 100-108.
-