

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
PASCAL AUGER

ACTIVITÉ ANTI-CANCÉREUSE D'UNE PARASPORINE DE
BACILLUS THURINGIENSIS 4R2

MAI 2015

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord sincèrement remercier ceux qui m'ont donné la chance de travailler sur ce projet de maîtrise :

- le Pr Marc Sirois, mon directeur de recherche, et
- le Pr Éric Asselin, mon codirecteur de recherche.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes que j'ai côtoyées tout au long de ma maîtrise :

- l'équipe du laboratoire du Pr Marc Sirois : Dimitri Carrabin et Lauriane Giroux,
- l'équipe du laboratoire du Pr Éric Asselin : en particulier, Valérie Leblanc, Sophie Parent et Kevin Brasseur,
- l'équipe du laboratoire du Dr Jean-Charles Côté du Centre de recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada : Dong Xu et Brahim Soufiane.

Merci à vous tous!

RÉSUMÉ

Bacillus thuringiensis est une bactérie utilisée mondialement en tant qu'insecticide biologique et est caractérisée par la formation d'un cristal protéique composé principalement de protéines Cry. Au cours de la dernière décennie, des protéines Cry possédant un pouvoir toxique spécifique contre des cellules cancéreuses humaines ont été découvertes et renommées en tant que parasporines. Leur mode d'action au niveau des cellules cancéreuses a été peu étudié jusqu'à présent. La parasporine-2Aa1 (PS2Aa1), provenant originalement de la souche *Bacillus thuringiensis* A1547 est connue selon la littérature comme étant toxique contre les cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) et les cellules T leucémique (MOLT-4 et Jurkat). Les événements intracellulaires menant à la mort de ces cellules sont décrits comme étant non apoptotiques malgré le manque d'études approfondies. Dans le présent travail, il est question de l'utilisation de plusieurs expérimentations afin de démontrer que la parasporine-2Aa1 provenant de la nouvelle souche *Bacillus thuringiensis* 4R2 est toxique pour plusieurs types de cancers féminins et qu'elle induit l'apoptose chez ces cellules cancéreuses. Pour ce faire, l'identification de la présence de la parasporine-2Aa1 dans la souche *B. thuringiensis* 4R2 a été prouvée avec l'aide de la technique PCR conventionnelle ainsi que le séquençage d'une partie du gène codant pour cette parasporine. Par la suite, nous avons montrés que la PS2Aa1 activée par la protéinase K a démontré une cytotoxicité envers la lignée HepG2 et les nouvelles lignées MCF-7 et PC-3, Hec-1A, KLE, MDA-MB231 et Caco-2 tout en étant inactive contre les lignées normales. Chez les cellules cancéreuses sensibles, un rétrécissement des cellules a été observé, ce qui est un changement morphologique propre à l'apoptose. Les analyses par western blot ont confirmé le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase, de la caspase-9 et de la caspase-3 dans les lignées cancéreuses sensibles, démontrant le déclenchement de l'apoptose. L'analyse de ces lignées cellulaires cancéreuses avec la cytométrie en flux avec un double marquage à l'annexineV et au propidium iodide (PI) a renforcé l'hypothèse du déclenchement de l'apoptose. Des analyses par western blot des voies de signalisation PAR-4, AKT, XIAP et ERK 1/2 ont aussi confirmé l'hypothèse du déclenchement de l'apoptose chez les cellules PC-3. L'ensemble des résultats obtenus lors de ces travaux démontrent que la PS2Aa1 de la souche *B. thuringiensis* 4R2 a non seulement une toxicité sélective, mais qu'elle induit l'apoptose chez les cellules cancéreuses humaines.

Mots clés : *Bacillus thuringiensis*, parasporine-2Aa1, caspase, apoptose, cancer, AKT, XIAP, PAR-4, ERK ½.

IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

Pascal Auger : j'ai réalisé l'ensemble des travaux portant sur la microbiologie et aussi une partie des travaux portant sur la section oncologie mentionnés dans ce document. J'ai également participé à la version préliminaire de l'article scientifique sous la supervision de mon directeur de maîtrise, le Pr Marc Sirois.

Kevin Brasseur : à titre d'étudiant au Ph. D, Kevin Brasseur a participé en grande partie aux travaux portant sur les cellules cancéreuses. Il a aussi participé à la rédaction de l'article scientifique en tant que coauteur.

Le Pr Éric Asselin a été le codirecteur et superviseur des travaux de laboratoires portant sur l'aspect oncologie et il a aussi participé à la rédaction de l'article scientifique.

Le Pr Marc Sirois a été le directeur et superviseur des travaux de laboratoire et il a également participé à la rédaction de l'article scientifique dans le but éventuel de le soumettre à la revue PLOS ONE.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'espèce <i>Bacillus thuringiensis</i>	1
1.2 Historique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
CHAPITRE II	
CARACTÉRISATION DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	4
2.1 Méthodes de caractérisation de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.1.1 Le sérotypage.....	4
2.1.2 Méthodes phénotypiques et biochimiques.....	4
2.1.3 Méthodes moléculaires	5
CHAPITRE III	
LES TOXINES ET MÉTABOLITES DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>.....	7
3.1 Les exotoxines, les exoenzymes et les métabolites	7
3.1.1 Les Bêta-exotoxines.....	7
3.1.2 Les hémolysines, les entérotoxines et les exoenzymes.....	8
3.1.3 Les protéines insecticides végétales (Vips).....	9
3.1.4 Les antibiotiques et les antifongiques produits par <i>B. thuringiensis</i>	10
3.2 Les delta-endotoxines (protéines Cry et Cyt).....	12
3.2.1 Ancienne nomenclature	12
3.2.2 Nouvelle nomenclature	13
3.2.3 Les protéines Cyt.....	13
3.2.4 Les protéines Cry	14
3.2.5 L'expression et la régulation des protéines Cry.....	14

3.2.6 Séquences et structures similaires entre les protéines Cry	16
3.2.7 Mécanismes d'actions des protéines Cry	19
CHAPITRE IV	
EFFETS INDIRECTS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> SUR LES INVERTÉBRÉS ET LES VERTÉBRÉS.....	24
4.1 Effets indirects sur les invertébrés.....	24
4.2 Effets indirects sur les vertébrés.....	25
4.2.1 Poissons et oiseaux	25
4.2.2 Mammifères.....	26
4.2.3 Effets sur les humains.....	26
CHAPITRE V	
LES PARASPORINES ET LEUR ACTION SUR LES CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES.....	28
5.1 Définition d'une parasporine.....	28
5.2 Parasporines découvertes jusqu'à présent	28
5.3 Mécanismes d'action des parasporines sur les cellules cancéreuses humaines..	29
CHAPITRE VI	
MÉCANISMES DE MORT CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES HUMAINES.....	32
6.1 La nécrose.....	32
6.2 L'apoptose	33
6.2.1 La voie extrinsèque.....	34
6.2.2 La voie intrinsèque.....	34
CHAPITRE VII	
PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE..	36
7.1 Problématique.....	36
7.2 Les hypothèses de recherche	37
7.3 Les objectifs de recherche	37
CHAPITRE VIII	
PARASPORIN-2Aa1 FROM A NEW <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> 4R2 STRAIN INDUCES CASPASES ACTIVATION AND APOPTOSIS IN HUMAN CANCER CELLS.....	38
Abstract.....	39
Introduction.....	39

Materials and methods	41
Bacterial strain and culture media	41
Cells and culture conditions	41
Total DNA isolation	43
PCR amplification	43
DNA sequencing.....	43
Preparation of activated parasporal proteins.....	44
Assay of cytotoxicity	44
Light microscopy observation	45
Antibodies and reagents.....	45
Western blot.....	46
Measurement of Annexin V/PI cells	46
Statistical analyses	46
Results	47
Characterization of <i>Bacillus thuringiensis</i> 4R2 cristal protein.....	47
Cytotoxicity of PS2Aa1 in cancer and normal cells.....	47
Morphological changes in cancer cells induced by PS2Aa1	48
PS2Aa1 induces cell death by apoptotic mechanisms.....	48
Regulation of different survival pathway during treatment with PS2Aa1	49
Discussion	50
References	54
Figures.....	60
CHAPITRE IX	
DISCUSSION	66
9.1 L'identification de la PS2Aa1 chez <i>B. thuringiensis</i> 4R2	68
9.2 La toxicité sélective de la PS2Aa1	69
9.3 La PS2Aa1 induit l'apoptose chez les cellules cancéreuses.....	71
9.4 Perspectives de recherche	73
CHAPITRE X	
CONCLUSION.....	76
BIBLIOGRAPHIE	77

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
3.1	Positionnement des blocs de séquences conservées chez les protéines Cry..	17
3.2	Structure en trois dimensions des protéines Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa et Cry4Ba	19
3.3	Représentation des étapes menant à la mort de l'insecte selon le modèle de Bravo	21
3.4	Représentation des étapes menant à la mort de l'insecte selon le modèle de Zhang.....	22
5.1	Dendrogramme illustrant la relation entre les parasporines des familles PS1 à PS4 découvertes jusqu'à présent	29

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
WHO	World Health Organization
ATP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Vip	Protéine insecticide végétative
kDa	Kilo Dalton
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
RAPD-PCR	Random amplification of polymorphic DNA
EPA	Environmental protection agency
σ	Sigma
ARNm	Acide ribonucléique messenger
α	Alpha
β	Bêta
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
APN	Aminopeptidase
AMPc.	Adénosine monophosphate cyclique
Caspase	Cystéine-protéase
PS1Aa1	Parasporine-1Aa1
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PS2Aa1	Parasporine-2Aa1
PI	Propidium Iodide
AKT	Protéine kinase B
XIAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases
PAR-4	Prostate apoptosis response-4

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'espèce *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) est une bactérie aérobie Gram positif en forme de bâtonnet. Elle se caractérise par la production d'un cristal protéique lors de sa sporulation. Durant sa phase végétative (active), *B. thuringiensis* a une longueur de 5 µm et une largeur de 1 µm et est pourvue de flagelles. *B. thuringiensis* est une bactérie ubiquitaire, ce qui signifie que l'on peut la retrouver un peu partout dans la nature; que ce soit dans le sol, sur le feuillage, dans l'eau et même dans l'air. Elle fait partie du groupe *Bacillus cereus* qui comprend six espèces dont *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus weihenstephanensis*. C'est d'ailleurs par son inclusion parasporale sous la forme d'un cristal protéique que l'on distingue formellement *B. thuringiensis* de *Bacillus cereus* (Glare et O'Callaghan 2000). Ce cristal protéique, essentiellement composé de delta-endotoxines, regroupe les protéines Cry et les protéines Cyt. Ces protéines représentent environ 20 % de la composition en protéines de la bactérie lors de la sporulation (Aronson 2002). Ces protéines, notamment les protéines Cry, possèdent une action cytotoxique spécifique contre certains insectes nuisibles, dont les coléoptères (coccinelles), les lépidoptères (papillons) et les diptères (mouches).

On retient trois applications majeures concernant cette bactérie. D'abord, la bactérie sert à contrôler les insectes défoliants en foresterie. Elle est également utilisée pour le contrôle des insectes vecteurs de maladies microbiennes. Finalement, on s'en sert pour fabriquer certaines plantes transgéniques résistantes à plusieurs espèces d'insectes. *B. thuringiensis* est le bio-insecticide le plus utilisé à travers le monde puisqu'il représente un moyen efficace et écologique pour contrer les insectes nuisibles. Le mode d'action des delta-endotoxines est bien connu. Ainsi, lors de l'ingestion des

cristaux protéiques par l'insecte, ceux-ci sont solubilisés par le pH alcalin de son intestin. Par la suite, les protéines Cry se lient aux récepteurs des cellules épithéliales de la membrane de l'intestin et forment des pores dans cette dernière, ce qui conduit à la mort de l'insecte. On retrouve *B. thuringiensis* partout à travers le monde ce qui permet d'isoler un grand nombre de souches et de protéines Cry différentes pouvant avoir un intérêt scientifique et commercial pour ces trois grandes applications.

1.2 Historique de *Bacillus thuringiensis*

L'utilisation des bactéries pour contrer les insectes nuisibles aux cultures ne remonte guère qu'à quelques décennies. Les Égyptiens possédaient plusieurs collections de bactéries servant à tuer les insectes qui s'attaquaient aux plantations (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Quant à *B. thuringiensis*, ce n'est qu'en 1901 qu'un biologiste japonais, Shigetane Ishiwata, observe plus concrètement les effets insecticides de la bactérie sur des vers à soie. Un grand nombre de vers à soie mouraient en raison de la « maladie sotto ». C'est à partir de cet insecte que l'on a isolé pour la première fois une souche de *B. thuringiensis*, surnommé à l'époque *Bacillus sotto*. En 1911, le scientifique allemand Ernst Berliner isole une souche de *B. thuringiensis* à partir d'une larve de mite trouvée dans un sac de farine. Ce fût la première fois que *B. thuringiensis* était isolée et décrite (Glare et O'Callaghan 2000). Cette découverte eut lieu dans la province de Thuringia, d'où le nom de *Bacillus thuringiensis*. C'est en France, en 1938, que *B. thuringiensis* fût utilisée pour la première fois à titre d'insecticide, et ce, sous le nom de Sporéine (Lambert and Peferoen 1992). L'arrivée aux États-Unis d'un insecticide à base de *B. thuringiensis* ne survint que 20 ans plus tard, soit en 1958. Durant les années 1960 jusqu'au milieu des années 1970, le marché était dominé par la sous-espèce *kurstaki* qui avait une activité insecticide sur les lépidoptères. C'est dans cette sous-espèce que l'on retrouve l'isolat HD-1, une souche référence de *B. thuringiensis* connue depuis de nombreuses années et une des pionnières dans le domaine des bio-insecticides (Lambert and Peferoen 1992). Le marché des insecticides de *B. thuringiensis* à cette époque était essentiellement destiné aux lépidoptères ravageurs.

Vers la fin des années 1970 et le début des années 1980, deux découvertes importantes ont permis de démontrer le grand potentiel insecticide de *B. thuringiensis*. Tout d'abord, il y a eu la découverte de la sous-espèce *israelensis*, toxique pour les moustiques et les mouches noires et par la suite, la découverte de la sous-espèce *tenebrionis*, toxique pour les coléoptères (Goldberg and Margalit, 1977; Krieg, Huger *et al.*, 1983). Après avoir constaté tout le potentiel de *B. thuringiensis*, l'intérêt des industries à produire des insecticides bio s'est grandement accru. De ce fait, le marché des biopesticides représente environ 4,2 % du marché des pesticides en 2010 (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Environ 90 % des insecticides bio produits à travers le monde sont composés de *B. thuringiensis*. Les formulations de *B. thuringiensis* peuvent être différentes en fonction de l'environnement dans lequel elles doivent être aspergées. Ces formulations se retrouvent sous différentes formes soit, en granules, en capsules, sous forme d'huiles, en poudres ou simplement en concentrés liquides. L'épandage de formulations de *B. thuringiensis* peut aussi bien se faire en forêt, dans l'eau ou dans les champs. Cette grande polyvalence permet de contrôler un plus grand bassin d'insectes nuisibles.

CHAPITRE II

CARACTÉRISATION DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

2.1 Méthodes de caractérisation de *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Le sérotypage

Avec la découverte de nombreuses nouvelles souches de *B. thuringiensis* servant à la création de nouveaux insecticides, un système de classification vit le jour. Depuis son introduction en 1967, le sérotypage flagellaire de l'antigène H est largement utilisé (de Barjac and Bonnefoi, 1967). Un certain ordre a pu ainsi être établi entre les différentes souches de *B. thuringiensis* basé sur l'agglutination flagellaire (basé sur l'antigène H). Pas moins de 69 sérotypes et 82 variétés sérologiques (sérovars) ont été caractérisés jusqu'à présent (Lecadet, Frachon *et al.*, 1999). Toutefois, cette forme de classification comparative comporte des faiblesses puisque plusieurs souches de *B. thuringiensis* peuvent être associées au même sérotype. Le sérotypage ne permet donc pas la différenciation des espèces de *B. thuringiensis* à l'intérieur d'un même sérotype. De plus, le sérotypage peut réagir avec des souches de *Bacillus cereus* et ainsi fausser les résultats pour l'identification de *B. thuringiensis*. Également, il existe des souches de *B. thuringiensis* n'ayant pas de flagelles, ce qui les rendent non classifiables par sérotypage (Gaviria Rivera and Priest, 2003). Bien que cette méthode de classification comporte certaines lacunes, elle reste tout de même largement utilisée afin de classifier de nouvelles souches de *B. thuringiensis*.

2.1.2 Méthodes phénotypiques et biochimiques

Les méthodes phénotypiques et biochimiques servant à caractériser des souches de *B. thuringiensis* à travers le genre *Bacillus* sont nombreuses et certaines d'entre elles s'avèrent utiles quoique non discriminatoires. Ces méthodes sont généralement le

sérotypage flagellaire de l'antigène H, les réactions biochimiques (tests API et VITEK), l'utilisation de milieux sélectifs et les bioessais (Glare et O'Callaghan, 2000). Malgré ces procédés, l'identification de *B. thuringiensis* à l'intérieur du groupe *Bacillus cereus* est difficile par ces approches étant donné la proximité génétique entre les espèces de ce groupe. Les tests biochimiques API, couramment utilisés dans l'identification bactérienne, sont insuffisants pour identifier les espèces du groupe *Bacillus cereus* (Valero, Hernandez-Herrero *et al.*, 2002). Pour y parvenir, le moyen le plus efficace pour distinguer une souche de *B. thuringiensis* des autres espèces du groupe *Bacillus cereus* est sans contre dit la visualisation du cristal protéique par microscopie puisque ces deux espèces partagent plusieurs caractéristiques biochimiques et phénotypiques (Glare et O'Callaghan 2000). Cependant, l'existence de souches de *B. thuringiensis* sans cristaux protéiques rendent inefficaces la distinction avec *Bacillus cereus* de manière phénotypique et biochimique. C'est pourquoi, au cours des dernières années, la caractérisation de *B. thuringiensis* laisse plutôt la place aux méthodes basées sur la biologie moléculaire.

2.1.3 Méthodes moléculaires

Le groupe *Bacillus cereus* contient six espèces dont *B. thuringiensis* et *Bacillus cereus* qui sont très rapprochés génétiquement (Rasko, Altherr *et al.*, 2005). En raison du caractère pathogénique de *Bacillus cereus*, plusieurs études ont été menées afin de bien différencier les souches de *B. thuringiensis* par des approches moléculaires.

B. thuringiensis se distingue des autres bactéries par la présence de protéines cristallines codées par des gènes *cry* de nature plasmidique. L'identification par PCR de ces gènes est un bon moyen d'identifier *B. thuringiensis*. Toutefois, ces plasmides peuvent être transférables. De ce fait, lorsqu'une souche de *B. thuringiensis* perd ces plasmides, elle devient pratiquement impossible à distinguer de *Bacillus cereus* (Chen and Tsen, 2002). C'est pour cette raison que plusieurs autres approches moléculaires se basent sur les gènes de nature chromosomiques. Il s'agit entre autres du ciblage de gènes conservés, d'hybridation ADN, du polymorphisme de longueur des fragments de

restriction (RFLP), la PCR multiplex, l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD-PCR), la réaction en chaîne de la polymérase avec amorce arbitraire (AP-PCR), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) et le typage par séquençage multilocus (MLST). Certaines de ces méthodes permettent la distinction intra-espèce chez *B. thuringiensis* et *Bacillus cereus* sans toutefois différencier ces deux espèces l'une de l'autre (Ford, Richardson *et al.*, 1989; Brousseau, Saint-Onge *et al.*, 1993; Rai, Meshram *et al.*, 2009). De nombreuses recherches avancent même que ces deux espèces ne peuvent être différenciées sur une base génétique (Ford, Richardson *et al.*, 1989; Tourasse, Helgason *et al.*, 2011). Malgré l'avancé des techniques moléculaires, il demeure difficile de différencier génétiquement *B. thuringiensis* de *Bacillus cereus*, deux espèces dont leur proximité génétique suscite des débats à savoir si elles appartiennent ou non à la même espèce (Chen and Tsen, 2002). Bref, l'identification des espèces au sein du groupe *Bacillus cereus* est ardue au point de vue génomique et la présence de plasmides codant pour des toxines particulières telles les protéines Cry rendent la classification de *B. thuringiensis* moins laborieuse. Ces protéines Cry sont d'ailleurs les toxines qui sont au cœur de l'activité insecticide de *B. thuringiensis*.

CHAPITRE III

LES TOXINES ET MÉTABOLITES DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

3.1 Les exotoxines, les exoenzymes et les métabolites

3.1.1 Les Bêta-exotoxines

B. thuringiensis est une bactérie qui, au cours de son cycle de vie, fabrique un grand nombre de toxines et métabolites de toutes sortes. Durant la phase végétative, elle produit une toxine thermostable appelée Bêta-exotoxine. Cette toxine, grandement résistante à la chaleur, demeure active après 15 minutes d'autoclave à 121° Celsius. Il existe deux variétés de β -exotoxines, soit la β -exotoxine de type 1 et la β -exotoxine de type 2 (Levinson, Kasyan *et al.*, 1990). Les gènes servant à coder les exotoxines sont de nature plasmidique. Ces mêmes plasmides peuvent aussi coder pour les delta-endotoxines (Levinson, Kasyan *et al.*, 1990). Les β -exotoxines sont composées entre autres d'adénine, de glucose et d'acide allarique ce qui leur confèrent une structure similaire à l'adénosine triphosphate (ATP)(Bond, Boyce *et al.*, 1969). Cette similarité est à la base de leur action toxique puisque son résidu adénine se lie de façon compétitive au complexe enzymatique de l'acide désoxyribonucléique (ADN) empêchant ainsi l'ATP de s'y lier (Sebesta and Horska, 1968). Cette réaction d'inhibition est due à une interférence de la réaction de polymérisation catalysée par l'action de l'ARN polymérase (Sebesta and Horska, 1970). La formation d'ARN à partir du brin matrice d'ADN est ainsi inhibée compte tenu que la cellule ne peut présenter d'ATP à l'ARN polymérase (Beebee, Korner *et al.*, 1972). En plus d'être toxique pour une grande variété d'insectes tels les nématodes, les diptères et les lépidoptères, les β -exotoxines sont aussi toxiques pour les mammifères puisqu'elles sont capables de traverser les membranes cellulaires et nucléiques de cellules cibles. De par cette toxicité à large spectre incluant les mammifères, les β -exotoxines doivent être exclues des compositions commerciales (WHO, « Environment Health Criteria 217 », 1999).

3.1.2 Les hémolysines, les entérotoxines et les exoenzymes

Considérant sa proximité génétique avec *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* est susceptible de produire plusieurs molécules communes avec celle-ci. En effet, c'est le cas pour plusieurs hémolysines et entérotoxines pathogènes pour les vertébrés. *Bacillus cereus* est notamment reconnue pour être la cause d'empoisonnement alimentaire due à sa production d'entérotoxines.

Contrairement aux delta-endotoxines, les gènes des entérotoxines semblent être situés dans les chromosomes, ce qui permet de comprendre la production d'entérotoxines de *Bacillus cereus* par des souches de *B. thuringiensis* (Carlson, Caugant *et al.*, 1994). Le nombre de souches de *B. thuringiensis* provenant du sol et produisant des entérotoxines de *Bacillus cereus* peut être assez important (Abdelhameed and Landen, 1994). Outre les entérotoxines, les hémolysines représentent aussi un danger pour les vertébrés puisque celles-ci lysent les érythrocytes et sont, par le fait même, considérées comme un important facteur de virulence. *B. thuringiensis* peut produire différentes hémolysines dont certaines sont analogues à celles produites par *Bacillus cereus*, telles que l'hémolysine II et la céréolysine (Honda, Shiba *et al.*, 1991; Budarina, Sinev *et al.*, 1994). Compte tenu de la grande présence de souches produisant des entérotoxines et des hémolysines, les compositions commerciales doivent être exemptes de ces toxines afin d'éviter des empoisonnements alimentaires et des maladies systémiques reliés à l'aspersion de *B. thuringiensis*.

Les exoenzymes de *B. thuringiensis* ont un rôle à jouer pour la pathogénicité chez l'insecte et non sur les vertébrés contrairement aux entérotoxines et aux hémolysines. Les exoenzymes les plus importantes restent les chitinases et les protéases. La chitinase est une enzyme qui dégrade la chitine qui est une composante de l'exosquelette des insectes ainsi qu'une composante des champignons. Chez l'insecte, la chitinase peut agir en symbiose avec les toxines de *B. thuringiensis* afin de faciliter leur passage à travers la membrane péritrophique de l'intestin de l'insecte (Huber, Cabib *et al.*, 1991; Sampson and Gooday, 1998). La chitinase de *B. thuringiensis* peut aussi avoir une action lytique sur les parois cellulaires de champignons phytopathogènes protégeant ainsi les plantes

contre les maladies (de la Vega, Barboza-Corona *et al.*, 2006). Cette nouvelle application peut être intéressante pour le milieu de l'agriculture tout particulièrement pour la protection des récoltes.

B. thuringiensis est aussi une grande productrice de protéases de toutes sortes qui peuvent être intracellulaires et extracellulaires. L'activité des protéases est augmentée durant la phase post-exponentielle, lors de la lyse des bactéries dans le milieu de culture (Andrews, Bibilos *et al.*, 1985). Les protéases de *B. thuringiensis* ont un rôle à jouer autant dans la croissance et la sporulation que dans la toxicité de la bactérie chez l'insecte (Brar, Verma *et al.*, 2007). Par exemple, les métalloprotéases de *B. thuringiensis* peuvent cliver et activer les protoxines avant même leur arrivée dans l'intestin de l'insecte (Kumar and Venkateswerlu, 1997). Les effets des protéases peuvent aussi être néfastes du fait que les protéases endogènes peuvent hydrolyser les protéines cristallines de *B. thuringiensis* et ainsi réduire son action toxique (Andrews, Bibilos *et al.*, 1985). Les protéases intracellulaires influencent la toxicité de *B. thuringiensis* en activant les protoxines, mais aussi en affectant le système de défense de l'insecte (Brar, Verma *et al.*, 2007). Quant à elles, les protéases extracellulaires de *B. thuringiensis* n'ont pas d'action sur la toxicité de celle-ci, mais plutôt sur la concentration des protéines cristallines. Lors de la production de formulations commerciales de *B. thuringiensis*, il est impératif de connaître l'action des protéases tant sur les insectes que sur *B. thuringiensis* elle-même, particulièrement si les protéases réduisent les effets des protéines cristallines.

3.1.3 Les protéines insecticides végétatives (Vips)

Tout comme les β -exotoxines, les Vips sont produites durant la phase végétative du cycle de vie de *B. thuringiensis*. Il existe présentement environ 100 Vips différentes qui se classent dans trois groupes ainsi que 25 classes (Crickmore *et al.*, 2014, <http://www.btnomenclature.info/>). Les trois groupes des Vips sont communément nommés Vip1, Vip2 et Vip3 (Estruch, Warren *et al.*, 1996; Yu, Mullins *et al.*, 1997). Les Vips1 et Vips2 sont des protéines binaires ce qui implique qu'elles s'associent pour

devenir toxiques (Yu, Mullins *et al.*, 1997). La Vip3 quant à elle, est une protéine d'environ 88 kilo Dalton (kDa) démontrant une toxicité élevée contre les lépidoptères (Estruch, Warren *et al.*, 1996). Les Vips sont codées par de larges plasmides tout comme les delta-endotoxines qui sont aussi codées par ce même plasmide (Mesrati, Tounsi *et al.*, 2005). Outre leur propriété insecticide commune avec les delta-endotoxines, les Vips fonctionnent un peu différemment, notamment au niveau de sa liaison avec les cellules et de son mode d'action. Les Vips ne se lient pas aux mêmes récepteurs cellulaires que les delta-endotoxines (Lee, Walters *et al.*, 2003). Une autre différence vient du fait que les Vips sont produites durant la phase végétative et non pas durant la phase de sporulation. Par la suite, elles sont sécrétées dans le surnageant des cultures bactériennes de *B. thuringiensis* (Estruch, Warren *et al.*, 1996). L'une des Vips la plus étudiée jusqu'à présent est la Vip3A et celle-ci, comme les autres Vips, ne présente pas d'homologie de séquences et de structures avec les delta-endotoxines. Tout comme les delta-endotoxines, les Vips sont actives à l'intérieur de l'intestin des insectes. La Vip3A par exemple, lorsque soluble et digérée par les protéases de l'intestin de l'insecte, se lie aux cellules épithéliales et forme des pores dans celles-ci, entraînant la mort de l'insecte (Yu, Mullins *et al.*, 1997; Lee, Walters *et al.*, 2003). La formation des pores est toutefois différente de celle des protéines Cry puisque les Vips, vu leurs structures différentes, s'organisent différemment lors de la liaison avec les cellules. La Vip3A traitée par une protéase peut aussi former des pores dans la bicouche lipidique malgré l'absence de récepteurs, ce que les delta-endotoxines ne font pas (de la Vega, Barboza-Corona *et al.*, 2006). Avec un mode d'action différent des protéines Cry et l'utilisation de différents récepteurs cellulaires, les Vips, combinées aux delta-endotoxines, pourraient corriger le problème de la résistance chez les insectes et ainsi permettre de produire des insecticides spécifiques de plus en plus efficaces.

3.1.4 Les antibiotiques et les antifongiques produits par *B. thuringiensis*

En plus de synthétiser bon nombre de protéines insecticides, *B. thuringiensis* produit aussi d'autres métabolites tels des antibiotiques et antifongiques. Ces métabolites peuvent notamment servir aux plantes pour les aider à lutter contre certains

champignons ou bactéries néfastes. On compte parmi ces métabolites, la zwittermicine A, les thuricines, la tochicine, la bacthuricine F4 et les entomocines. La zwittermicine A et les thuricines représentent les métabolites d'importance pour la protection des plantes par *B. thuringiensis*.

La zwittermicine A est un antibiotique qui a été isolé pour la première fois à partir de *Bacillus cereus* UW85 pour son effet protecteur de la plante alfalfa (luzerne) et contre l'oomycète *Phytophthora medicaginis* (Silo-Suh, Lethbridge *et al.*, 1994). La zwittermicine A fût par la suite identifiée chez plusieurs *Bacillus* grâce à une nouvelle méthode d'identification qui consiste à établir si la souche inhibe la croissance d'*E. herbicola* et si la souche est sensible au phage P7 (Stabb, Jacobson *et al.*, 1994). La découverte de ce nouvel antibiotique est importante pour la protection des plantes puisqu'il est actif contre les oomycètes, les bactéries Gram négatives et un grand nombre de fungi pathogènes (Silo-Suh, Stabb *et al.*, 1998).

Les thuricines sont quant à elles des bactériocines, c'est-à-dire des peptides avec des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Elles sont par contre actives contre plusieurs *Bacillus* tels *B. thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa* et *Bacillus sphaericus* (Favret and Yousten, 1989). Elles peuvent aussi être actives contre des bactéries plus nuisibles comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* (Chehimi, Delalande *et al.*, 2007). Il existe plusieurs types de thuricines comme la thuricine S, la thuricine CD et la thuricine 7. Grâce à leur action toxique contre ces bactéries nuisibles, les thuricines peuvent notamment procurer une protection pour les plantes. La découverte de souches de *B. thuringiensis* produisant des antibiotiques et des métabolites antifongiques pourrait avoir comme conséquence la création de pesticides biologiques respectueux de l'environnement.

3.2 Les delta-endotoxines (protéines Cry et Cyt)

3.2.1 Ancienne nomenclature

À l'origine, la classification des delta-endotoxines de *B. thuringiensis* était effectuée de façon arbitraire, c'est-à-dire que la personne qui découvrait une delta-endotoxine pouvait lui donner le nom qu'elle souhaitait. La première nomenclature a fait son apparition en 1989 et celle-ci était principalement basée sur l'activité insecticide des toxines de *B. thuringiensis* (Hofte and Whiteley, 1989). Les protéines Cry et Cyt étaient donc classées selon leur spectre d'activité contre certains groupes d'insectes ainsi que selon leurs structures primaires basées sur leurs séquences d'ADN. Les toxines actives contre les lépidoptères représentaient la classe I. Celles actives contre les lépidoptères et les diptères étaient de classe II, contre les coléoptères de classe III et contre les diptères de classe IV. Une nouvelle classe peut être ajoutée pour représenter les toxines qui n'ont pas d'action toxique sur les insectes (Hofte and Whiteley, 1989). Cette forme de nomenclature comporte certaines faiblesses et c'est pourquoi elle a dû être remplacée suite à la découverte de nombreuses nouvelles protéines Cry (Crickmore, Zeigler *et al.*, 1998). D'abord, l'une des grandes faiblesses de la nomenclature était son système de classement basé sur l'activité insecticide des protéines Cry. Par exemple, deux protéines classées CryIA et CryIB en raison de la similarité de leur séquence d'ADN peuvent ne pas avoir la même spécificité contre les lépidoptères. Il se peut par exemple que la protéine CryIB ne démontre aucune activité toxique contre les lépidoptères, mais plutôt contre les diptères qui représentent la classe IV. La découverte de nouvelles protéines Cry ayant un large spectre d'activité insecticide représente aussi un problème de classification. Il se peut qu'une protéine Cry puisse être active contre les lépidoptères, les diptères et les coléoptères. Dans ce cas, cette protéine serait classée dans la classe V puisque l'on ne peut la classer précisément dans l'une des quatre classes nommées précédemment. En raison de ces inconvénients, cette nomenclature fût remplacée par une nomenclature basée sur les séquences d'acides aminés des protéines Cry et des protéines Cyt.

3.2.2 Nouvelle nomenclature

Afin de répondre à la forte croissance de découvertes de protéines Cry et Cyt, l'élaboration d'une nouvelle nomenclature était nécessaire. Celle-ci suggère un classement des protéines Cry et Cyt par rapport à leurs séquences d'acides aminés et abolit également les chiffres romains au profit des chiffres arabes (Crickmore, Zeigler *et al.*, 1998). Grâce à l'utilisation d'arbres phylogéniques, la proximité génétique entre les différentes protéines Cry et Cyt peut être observée et de ce fait, facilite la classification. Ce nouveau procédé permet ainsi de classer de nouvelles protéines sans faire de bioessais, ce qui accélère leur classification. La nouvelle nomenclature élargit aussi la définition d'une protéine Cry. Elle définit celle-ci comme étant une protéine cristalline provenant d'une inclusion parasporale de *B. thuringiensis* et ayant une action toxique vérifiable expérimentalement sur un organisme cible (Crickmore, Zeigler *et al.*, 1998). Une protéine Cry peut également être toute protéine ayant une similarité évidente à une protéine Cry déjà connue (Crickmore, Zeigler *et al.*, 1998). Pour leur part, les protéines Cyt sont considérées comme des protéines parasporales ayant une action hémolytique ou toute autre protéine ayant une similarité avec une autre protéine Cyt connue. En plus de permettre une classification plus rapide et efficace, cette nouvelle nomenclature permet également d'éviter les erreurs de classement provenant de l'ancienne nomenclature.

3.2.3 Les protéines Cyt

Tout comme les protéines Cry, les protéines Cyt se retrouvent dans la famille des delta-endotoxines et sont produites toutes deux dans le même cristal lors de la sporulation. Ces protéines sont codées par des gènes plasmidiques et leur taille oscille autour de 25 kDa. Contrairement aux protéines Cry qui elles, demandent une interaction spécifique avec des récepteurs cellulaires et une activation par des protéases, les protéines Cyt interagissent directement avec les lipides membranaires des cellules et pénètrent dans la membrane pour ainsi former un pore (Sanahuja, Banakar *et al.*, 2011). Ces protéines peuvent notamment agir en synergie avec certaines protéines Cry afin d'augmenter leur toxicité sur les insectes (Soberon, Lopez-Diaz *et al.*, 2013). Il a

également été démontré que les protéines Cyt peuvent aider à contrer la résistance des moustiques envers les protéines Cry (Wirth, Georghiou *et al.*, 1997). Ces caractéristiques tendent à accroître l'intérêt des chercheurs envers ce type de protéines afin de développer des insecticides plus efficaces. Cependant, il est bien connu que les protéines Cyt possèdent un pouvoir hémolytique et non spécifique envers différents types de cellules (Glare et O'Callaghan, 2000). C'est pourquoi la compréhension exacte de leur mode d'action reste à déterminer afin d'en faire un insecticide sécuritaire et efficace. Le manque de spécificité de la toxine semble néanmoins être le principal inconvénient quant à leur utilisation.

3.2.4 Les protéines Cry

Au cours de la sporulation, la plupart des souches de *B. thuringiensis* produisent un cristal protéique composé de delta-endotoxines. Ce cristal protéique représente à lui seul environ 20 à 30 % du nombre total de protéines de la bactérie (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Grâce à leur toxicité sélective envers différents insectes nuisibles, les protéines Cry sont utilisées depuis les années 1930 en tant qu'insecticide biologique. La tendance de la population à employer des insecticides biologiques a poussé les chercheurs à accroître leurs recherches afin de découvrir de nouvelles protéines Cry actives contre des insectes nuisibles. À ce jour, plus de 500 protéines Cry ont été découvertes et classées dans 72 familles (Crickmore *et al.*, 2014, <http://www.btnomenclature.info/>). Depuis le premier clonage et séquençage d'une protéine Cry dans les années 1980, bon nombre d'études ont été réalisées afin de décortiquer leur mode d'action et leur régulation. Ces études ont permis entre autres de mieux comprendre leur mécanisme d'action sur les insectes ainsi que leur fonctionnement à l'intérieur de la bactérie.

3.2.5 L'expression et la régulation des protéines Cry

L'expression et la régulation des protéines Cry impliquent plusieurs étapes et une multitude de facteurs. L'expression des protéines Cry s'effectue durant la phase stationnaire du cycle de vie de la bactérie. Ce n'est cependant que vers le stage 3 de la

sporulation que débute l'accumulation de protéines Cry dans la cellule mère (Bulla, Bechtel *et al.*, 1980). Cette accumulation se poursuit généralement jusqu'au stage 7 de la sporulation. La synthèse des protéines Cry est coordonnée tout au long de la transcription jusqu'à la traduction par plusieurs facteurs. D'abord, la sporulation est initiée par des facteurs de transcription sigma (σ) qui vont lier l'ARN polymérase et ainsi diriger la transcription via des promoteurs bactériens. Les principaux facteurs de transcription de *B. thuringiensis* lors de la sporulation sont σ^E , σ^F , σ^H , σ^G et σ^K . Chacun de ces facteurs est actif à des niveaux différents lors de la sporulation. Le facteur σ^H est actif dans la cellule en pré-division tandis que les facteurs σ^E et σ^K sont actifs dans la cellule mère (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Finalement, les facteurs σ^F et σ^G sont actifs dans la préspore. Plusieurs promoteurs des protéines Cry ont été identifiés jusqu'à présent pour initier la transcription (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Les hauts niveaux de protéines Cry dans les cellules s'expliquent cependant par la stabilité de l'ARN messenger (ARNm).

La durée de vie de l'ARNm dans *B. thuringiensis* est cinq fois supérieure à celle des autres bactéries, ce qui explique la grande accumulation de protéines Cry dans les cellules en sporulation (Nagamatsu, Okamura *et al.*, 2010). Plusieurs mécanismes post transcriptionnels et post traductionnels contribuent à une régulation positive des niveaux de protéines Cry dans la bactérie. Par exemple, le mécanisme de terminaison en boucle d'épingle lors de la transcription protège les protoxines des exonucléases à leur extrémité 3' (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). De plus, la formation spontanée d'un cristal lors de la période post traductionnelle constitue un mécanisme de protection efficace contre la dégradation protéolytique. Cette structure s'explique par une extrémité C-terminale riche en cystéine des protéines Cry favorisant la formation de ponts disulfures nécessaires à la formation du cristal (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Le cristal en question peut être présent sous diverses formes selon les différentes souches de *B. thuringiensis*. Toutefois, la plupart des protéines Cry, mêmes celles présentant des cristaux de conformations différentes, possèdent souvent des séquences et des structures similaires entre elles.

3.2.6 Séquences et structures similaires entre les protéines Cry

L'analyse moléculaire des protéines Cry a permis l'identification de séquences conservées et de structures comparables à travers leurs séquences d'ADN. Lors des premiers alignements des séquences d'acides aminés des protéines Cry, cinq blocs de séquences conservés ont été observés (Hofte and Whiteley, 1989). Ces blocs sont séparés par des régions plus variables, ce qui permet de distinguer les protéines Cry entre elles. Cependant, l'analyse des acides aminés des protéines Cry à partir des protoxines de plus de 1000 acides aminés a permis la découverte de trois nouveaux blocs conservés se situant à l'extérieur du cœur de la toxine (Schnepf, Crickmore *et al.*, 1998). C'est donc dire que les protéines Cry possèdent huit blocs de séquences conservées, cinq étant partie intégrante de la toxine, et trois autres blocs se situant dans la protoxine à l'extrémité C-terminale (Figure 3.1). Contrairement aux cinq premiers blocs, les blocs six, sept et huit qui font partie de la région C-terminale des longues protoxines sont constamment présents. Les cinq blocs qui font parties du cœur de la toxine sont présents de façon variable selon les différentes protéines Cry (Figure 3.1). Malgré que les protéines Cry possèdent une grande diversité au sein de leurs séquences, le fait de retrouver des blocs de séquences conservées à l'intérieur de celles-ci suggère que ces régions jouent un rôle dans la stabilité ou dans certaines fonctions des toxines.

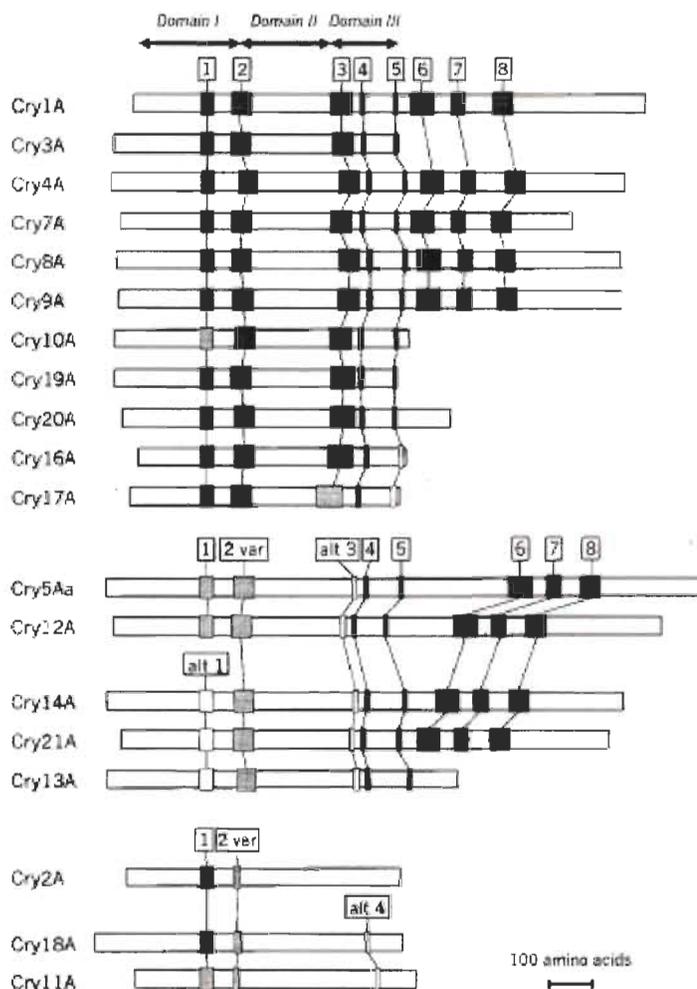


Figure 3.1 Positionnement des blocs de séquences conservées chez les protéines Cry (Schnepf, Crickmore *et al.*, 1998).

Les protéines Cry ont non seulement des similitudes dans leurs séquences d'acides aminés, mais elles possèdent également des ressemblances au niveau de leur structure protéique. La grande famille des protéines Cry se subdivise en trois familles, soit; la famille des protéines Cry à trois domaines, la famille des protéines Cry toxiques pour les moustiques (Mtx) et finalement la famille des protéines Cry binaires. Les protéines Cry à trois domaines représente la famille la plus étendue. Jusqu'à présent, sept protéines Cry ont été cristallisées afin de mettre en évidence leurs structures tridimensionnelles. Ces protéines sont les suivantes; Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba et Cry8Ea (Bravo, Likitvivatanavong *et al.*, 2011). Bien que ces protéines démontrent des structures à trois domaines semblables, certaines de ces protéines n'ont que 20 % de

similarité au niveau de leurs séquences d'acides aminés (Bravo, Gomez *et al.*, 2013). Quatre de ces protéines sont représentées dans la figure ci-dessous (Figure 3.2). Le domaine I des protéines Cry est formé de sept hélices alpha (α) reliées par des boucles qui comprennent six hélices entourant une hélice hydrophobe (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Cette hélice α hydrophobe est très conservée chez les protéines Cry. Le domaine II quant à lui est composé de trois ensembles de feuillets beta (β) antiparallèles qui se terminent par une boucle (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Ces trois ensembles créent par la suite une forme de prisme β ayant un cœur hydrophobe. Ce domaine est le plus variable des trois domaines (Gomez, Sanchez *et al.*, 2002). Finalement, le domaine III, qui est moins conservé que le domaine I, possède une structure en sandwich fait de deux feuillets β antiparallèles (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Les trois domaines présentés ci-haut divergent l'un de l'autre dans les différentes protéines Cry de par leurs arrangements et de par la variabilité de leurs séquences d'acides aminés. Ces deux caractéristiques jouent des rôles prédominants dans le mécanisme d'action et dans la spécificité des protéines Cry.

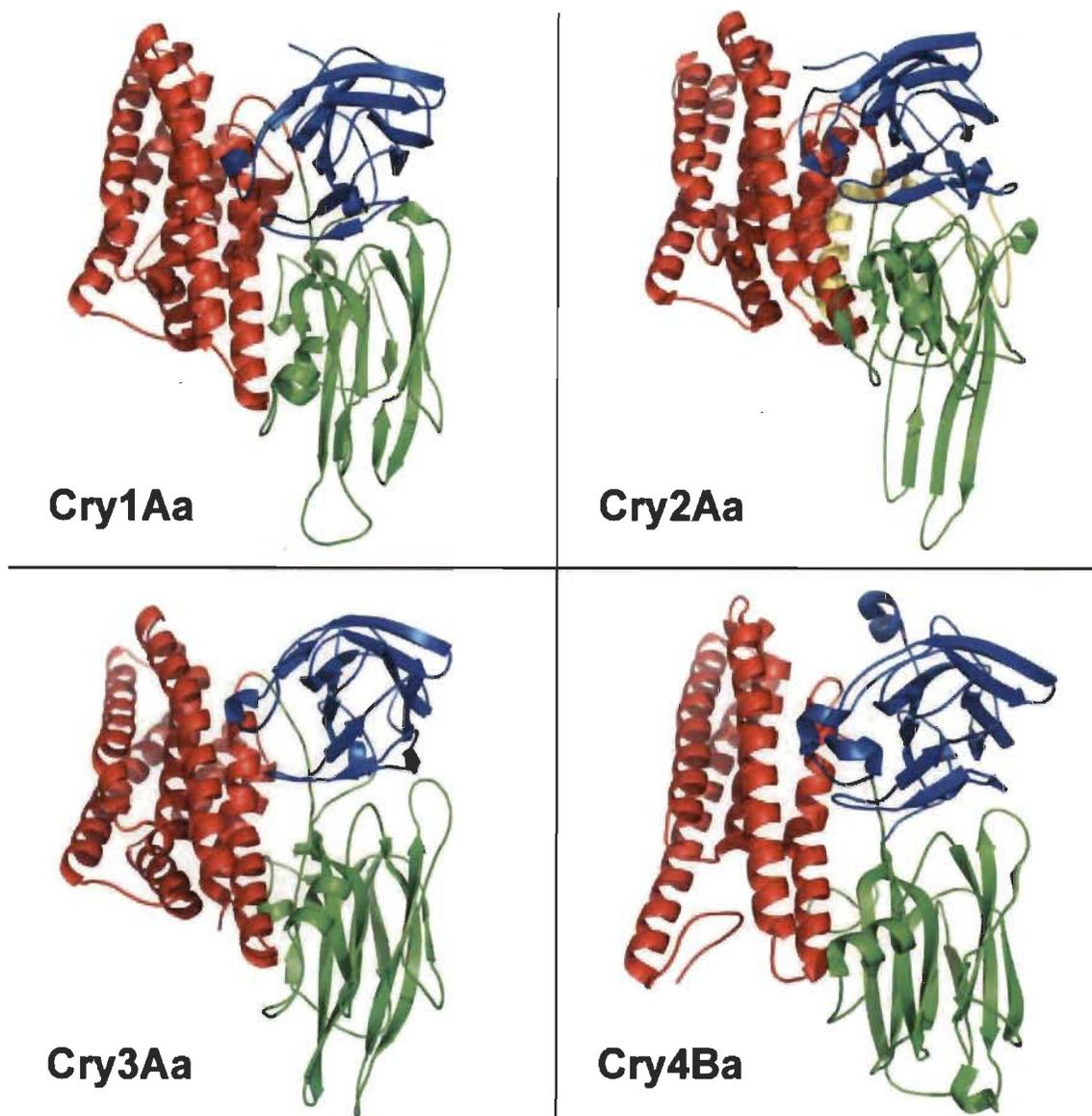


Figure 3.2 Structure en trois dimensions des protéines Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa et Cry4Ba. Le domaine I, le domaine II et le domaine III sont représentés respectivement en rouge, vert et bleu (Pigot et Ellar, 2007).

3.2.7 Mécanismes d'actions des protéines Cry

La structure unique de chacun des domaines des protéines Cry a un rôle dans les fonctions que ces domaines ont à jouer lors de leurs actions toxiques sur différentes cellules. Le domaine I est impliqué dans l'oligomérisation de la toxine, dans l'insertion de la membrane et dans la formation de pores (Bravo, Gomez *et al.*, 2013). Quant aux domaines II et III, les résultats de mutagenèses dirigées et de troncations de leur

structure démontrent qu'ils sont impliqués dans la liaison aux récepteurs cellulaires et dans l'activité insecticide (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Les régions les plus variables des domaines II et III jouent un grand rôle dans la spécificité de leur action insecticide. Ces régions se retrouvent plus particulièrement dans les boucles à l'extrémité des feuillettes β où les séquences d'acides aminés sont les plus exposées. La grande variabilité de ces séquences permet notamment d'obtenir un large éventail de protéines Cry actives contre plusieurs espèces d'insectes puisque chaque séquence différente se fixera sur un récepteur différent. Bien que la structure des protéines Cry soit bien décrite et documentée, leur mécanisme d'action exact au niveau de la cellule n'est pas parfaitement élucidé. Néanmoins, les événements séquentiels menant à la mort de l'insecte après l'ingestion de protéines Cry sont bien acceptés à travers la littérature (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010). Tout d'abord, le cristal, composé de protoxines, est ingéré par l'insecte et il chemine ainsi jusqu'à son intestin. L'environnement alcalin de celui-ci permet la solubilisation du cristal libérant ainsi les protoxines à l'intérieur de l'intestin. Ces protoxines sont ensuite digérées (clivées) par les protéases présentes dans l'intestin pour former une toxine active. Ces toxines activées vont par la suite se lier à des récepteurs spécifiques situés le long de la membrane épithéliale de l'intestin et former des pores, menant ainsi à la mort de l'insecte (Pigott and Ellar, 2007). Le plus grand débat quant au mode d'action des protéines Cry se situe au niveau des étapes suivant la liaison au récepteur jusqu'à l'altération de la membrane cellulaire. Il existe présentement deux grands modèles de pensée quant au mode d'action des protéines Cry à ce niveau.

Le premier modèle décrit est d'un modèle à liaison séquentielle c'est-à-dire que la protéine Cry se lie à plusieurs récepteurs cellulaires dans une séquence d'événements; elle oligomérisse, s'insère dans la membrane et forme un pore dans celle-ci (Bravo, Gomez *et al.*, 2004). Cette séquence d'évènements est illustrée dans la figure ci-dessous (Figure 3.3). Le modèle Bravo se base particulièrement sur la protéine Cry1Ab. En premier lieu, la protéine activée sous forme de monomère se lie initialement à des récepteurs glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) de type aminopeptidase (APN) ancrés dans la membrane. Suite à cette liaison, la protéine Cry1Ab se lie à un récepteur cadhérine (glycoprotéine) facilitant ainsi le dégagement par protéolyse de l'hélice $\alpha 1$ du

domaine I de la protéine. Ce changement de conformation de la protéine induit un oligomérisation, ce qui confère à la protéine une structure pré pore (Bravo, Gomez *et al.*, 2013). Ce changement de conformation mène ultimement à une liaison finale de l'oligomère à un récepteur APN ancré dans la membrane. Cette forte liaison facilite l'insertion de la membrane par l'oligomère résultant en la formation d'un pore et, par la suite, à la mort de la cellule par une lyse osmotique. Ce modèle de mode d'action est cependant contredit par un autre modèle qui favorise un dérèglement des voies de signalisations intracellulaires plutôt que la formation de pores.

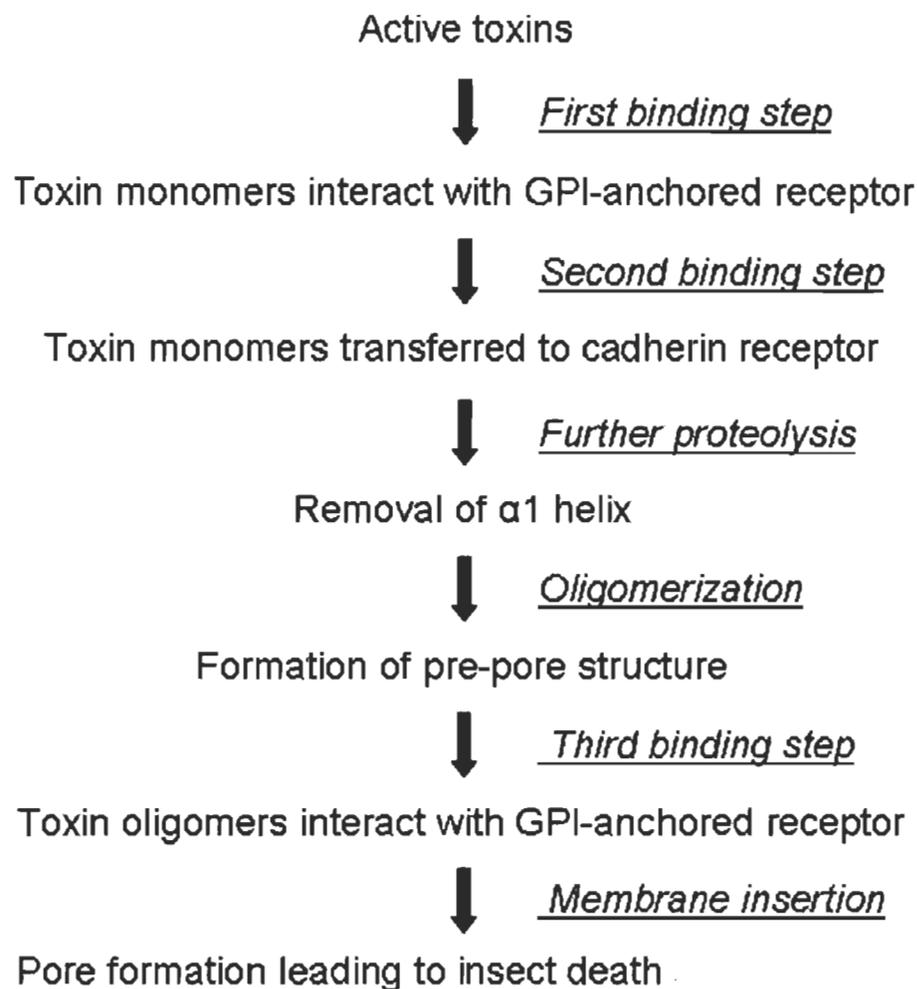


Figure 3.3 Représentation des étapes menant à la mort de l'insecte selon le modèle de Bravo (Vachon, Laprade *et al.*, 2012).

Le second modèle de fonctionnement des protéines Cry propose quant à lui une seule liaison à un récepteur cadhérine qui active une voie de signalisation intracellulaire

menant à la mort de la cellule sans oligomérisation et sans formation de pore dans la membrane (Zhang, Candas *et al.*, 2006). Ce modèle a été encore une fois conçu en se basant sur la protéine Cry1Ab et la séquence d'événements est illustrée ci-dessous (Figure 3.4). Plus précisément, la toxine Cry1Ab activée et sous forme de monomère se lie au récepteur cadhérine BT-R₁. Cette liaison stimule les voies de signalisations Mg²⁺ dépendantes et la voie de la protéine G ancrée adénylate cyclase dépendante. Suite à cette stimulation, le niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) augmente et la protéine kinase A s'active (Pigott and Ellar, 2007). Ces changements intracellulaires ont pour conséquences la déstabilisation du cytosquelette de la cellule et des canaux ioniques provoquant la mort de la cellule par nécrose (Vachon, Laprade *et al.*, 2012). Ce modèle suscite plusieurs interrogations puisqu'il écarte des dizaines d'années de recherches sur la formation de pores par les protéines Cry comme étant leur principal mode d'action.

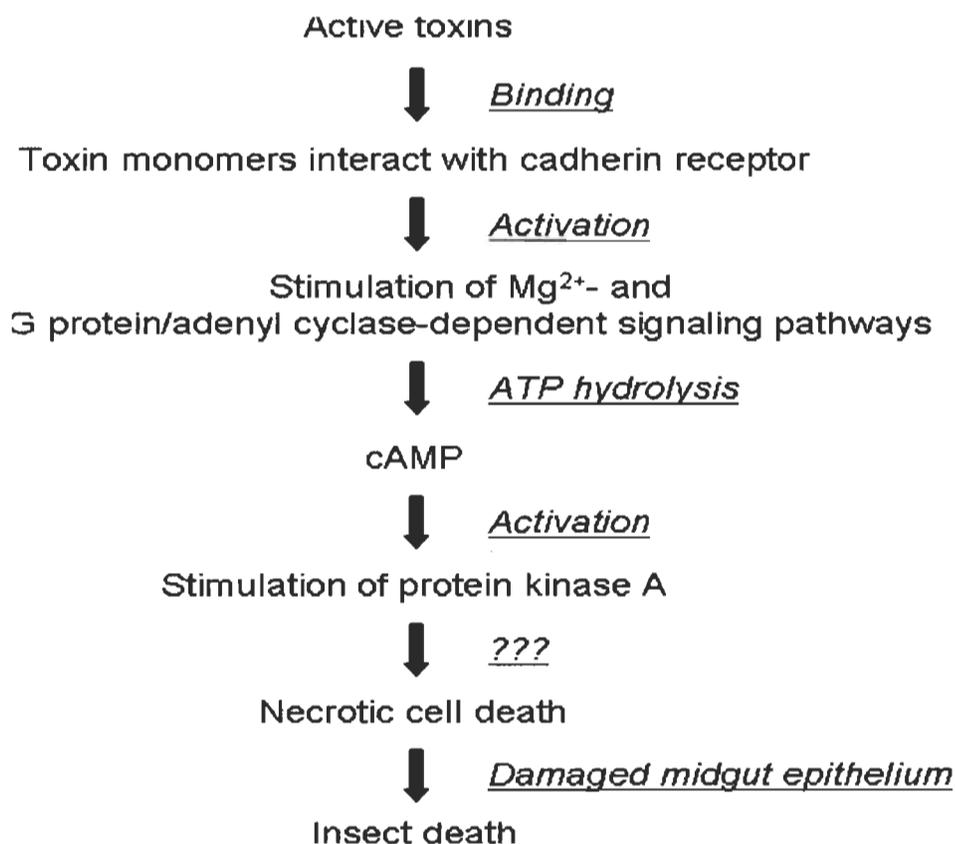


Figure 3.4 Représentation des étapes menant à la mort de l'insecte selon le modèle de Zhang (Vachon, Laprade *et al.*, 2012).

Bien que le mode d'action des protéines Cry ne soit pas totalement bien compris et détaillé, il reste néanmoins que *B. thuringiensis* est un bio insecticide puissant et efficace contre plusieurs insectes ravageurs. L'approfondissement des travaux afin de valider le mode d'action et de mieux comprendre l'interaction de la toxine via les récepteurs cellulaires représente l'avenir pour le développement de nouveaux insecticides. Les modèles de mécanismes d'actions se basent principalement sur la protéine Cry1Ab et il existe jusqu'à maintenant bien peu d'études sur les autres familles de protéines Cry. Avec la multitude de protéines Cry découvertes jusqu'à présent, l'élaboration d'insecticides à base de *B. thuringiensis* plus efficaces et sélectifs est à la portée des industries. Le tournant de la société vers des insecticides biologiques mène à une plus grande utilisation de bio insecticide à base de *B. thuringiensis* à travers le monde. Cette utilisation croissante et à plus grande échelle doit néanmoins prendre en compte les effets indirects sur la faune et la flore en place dans les régions où *B. thuringiensis* est utilisée.

CHAPITRE IV

EFFETS INDIRECTS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SUR LES INVERTÉBRÉS ET LES VERTÉBRÉS

4.1 Effets indirects sur les invertébrés

Depuis quelques années, les pesticides chimiques font l'objet de nombreuses critiques auprès des environmentalistes. L'utilisation de pesticides bio quant à elle est de plus en plus souhaitée. Avec l'utilisation grandissante des insecticides biologiques tels des formulations à base de *B. thuringiensis*, il est impératif de connaître ses effets indirects sur les invertébrés non visés par celles-ci. Dans les diverses formules commerciales de *B. thuringiensis*, il existe des souches dont les propriétés insecticides s'étendent à un large éventail d'insectes. Ceci est principalement dû au fait qu'une seule souche de *B. thuringiensis* peut produire différentes protéines Cry. Les études faites sur le terrain et en laboratoire démontrent que *B. thuringiensis* n'a seulement qu'un impact limité sur les invertébrés non ciblés. Ceci pourrait s'expliquer par la nécessité pour la toxine d'avoir la présence d'un récepteur spécifique qui existerait que chez l'insecte. Le contrôle des doses de *B. thuringiensis* utilisées, les facteurs environnementaux, le ciblage des zones à traiter ainsi que l'étude des espèces d'insectes en présence sont des facteurs qui peuvent réduire l'impact de *B. thuringiensis* sur des insectes non visés. Les facteurs environnementaux ne peuvent tous être recréés dans un laboratoire, c'est donc dire que les résultats obtenus en laboratoire sur les effets indirects de *B. thuringiensis* sur les invertébrés ne sont que partiellement transposables du laboratoire au terrain. Dans l'environnement, *B. thuringiensis* est soumis à plusieurs conditions peu favorables à sa croissance et à la survie de ses toxines tels que les variations de température, la présence de rayons UV, le manque de nutriments ainsi que plusieurs autres facteurs.

Lors d'études de certains écosystèmes, il a été démontré qu'après une année d'application de *B. thuringiensis* en forêt pour contrer les lépidoptères, la population

d'insectes visés diminue durant près de deux ans. Après deux ans sans traitement, un retour à la normal au niveau du nombre des lépidoptères est observé (Glare et O' Callaghan 2000). Dans une étude similaire, après deux semaines de traitements pour contrer le lépidoptère *Ceanothus velutinus*, une différence marquée dans le nombre de lépidoptères a été rapporté, et ce, jusqu'à un an suivant l'aspersion. Par la suite, aucun changement dans la population de cet insecte ne fut observé (Miller, 1992). La perte de toxicité des formulations de *B. thuringiensis* dans l'environnement après un certain temps est un facteur important puisqu'il réduit la probabilité d'avoir des effets indirects sur les invertébrés. Cette perte de toxicité dans le temps, jumelée à une quasi absence d'implantation de *B. thuringiensis* dans l'environnement en font un insecticide plus sécuritaire, possédant un impact insignifiant sur la population d'insectes non visés.

4.2 Effets indirects sur les vertébrés

4.2.1 Poissons et oiseaux

Lors de l'épandage de *B. thuringiensis*, il est important de connaître les effets indirects non seulement sur les invertébrés, mais également sur les vertébrés tels les poissons et les oiseaux. Bon nombre d'études ont été réalisées afin de vérifier la toxicité de *B. thuringiensis* sur différentes espèces de poissons. La WHO a révisé des études faites en laboratoires et sur le terrain. Elle a démontré qu'aucune toxicité n'a été rapportée envers les populations de poissons (WHO « Environment Health Criteria 217 », 1999).

Il en va de même pour les oiseaux, aucune toxicité n'a été rapportée sur différentes espèces. Plusieurs études ont démontré que *B. thuringiensis*, même lorsqu'administré à hautes doses, ne représente aucun danger pour les oiseaux. Les effets de *B. thuringiensis* sur les oiseaux se font plutôt sentir indirectement. Étant donné que les utilisations commerciales de *B. thuringiensis* servent à réduire la population d'insectes nuisibles, la nourriture disponible pour les oiseaux insectivores s'en trouve affectée. La réduction de nourriture due à l'application de *B. thuringiensis* peut aussi mener à une réduction de la nidification chez certains oiseaux (Rodenhuse and Holmes 1992). Outre les poissons et

les oiseaux, les effets sur les mammifères étaient une source de grande préoccupation au sein de la population.

4.2.2 Mammifères

Dû à son utilisation répétée depuis des dizaines d'années et à sa proximité génétique avec *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*, plusieurs études ont été menées à savoir si *B. thuringiensis* représente un danger pour les mammifères. En 1998, l'agence américaine « Environmental Protection Agency » (EPA), basée sur une revue de l'ensemble des études publiées, stipule qu'aucun effet néfaste n'a été observé sur la santé des mammifères (Mcclintock, Schaffer *et al.*, 1995). Ces études ont été menées selon différentes voies d'expositions telles que l'exposition orale, pulmonaire, cutanée, oculaire et intrapéritonéale. Une autre étude indépendante a utilisé *B. thuringiensis subsp. israelensis* sur les mêmes voies d'expositions mentionnées ci-haut en ajoutant les voies intracérébrale et en aérosol. Ils arrivent à la conclusion que seule la voie intrapéritonéale peut être mortelle pour le rat à très haute dose (10^7 bactéries par rat), ce qui ne constitue pas un résultat significatif pour traiter *B. thuringiensis* comme un pathogène des mammifères (Siegel and Shaddock 1990).

4.2.3 Effets sur les humains

Suite à l'utilisation grandissante de bio insecticides à base de *B. thuringiensis*, les effets sur la faune et la flore environnante étaient une des plus grandes préoccupations de l'industrie et de la population. La proximité de la population avec les différentes zones traitées n'a fait qu'accroître cette inquiétude. Entre autres, les conséquences des contacts de *B. thuringiensis* sur les humains étaient au cœur de ces préoccupations. Quelques cas d'intoxications ont été rapportés au cours des années d'utilisations de *B. thuringiensis*, quoique aucune étude ne démontre un réel risque pour la santé des humains (Mcclintock, Schaffer *et al.*, 1995). Dans les formules commerciales de *B. thuringiensis*, les β -exotoxines sont interdites, ce qui réduit grandement les risques d'effets toxiques. Les études épidémiologiques de l'exposition des populations à

B. thuringiensis prouvent également le très faible risque de maladies liées à l'épandage (Green, Heumann *et al.*, 1990; Drobniewski 1994). Chez les travailleurs destinés à l'épandage, lors d'expositions à fortes doses durant une période prolongée, les effets rapportés sont liés à une légère irritation temporaire de la peau, des lèvres, des yeux et des voies respiratoires (Green, Heumann *et al.*, 1990).

Les résultats d'une étude ayant été menée auprès de 18 sujets afin de vérifier les effets de *B. thuringiensis* par inhalation (10^9 spores/jour) et par voie orale (100 mg de Thuricide pendant cinq jours), aucun effet nocif n'a été rapporté (Fisher and Rosner 1959). Dans la littérature médicale, seulement deux cas d'infections ont été attribuables à *B. thuringiensis*. Dans le premier cas, un fermier a reçu des éclaboussures de Dipel (formulation commerciale à base de *B. thuringiensis*) lui causant un ulcère. Des spores de *B. thuringiensis* ont été retirées de l'ulcération, mais celles-ci n'ont pas été formellement identifiées en tant qu'agent causal de l'ulcère (Samples and Buettner, 1983). Dans le second cas, un étudiant s'est accidentellement injecté une suspension contenant du *B. thuringiensis subsp. israelensis* et de l'*Acinetobacter calcoaceticus*, causant ainsi une infection qui fût guérie après un traitement antibiotique (Warren, Rubenstein *et al.*, 1984).

En combinant différentes études menées par les industries et laboratoires indépendants, la conclusion générale émanant de ces recherches est que *B. thuringiensis* constitue un insecticide sans risques pour les humains. Les dizaines d'années d'utilisation de *B. thuringiensis* sans réel épisode infectieux sur les humains sont là pour le démontrer. Lors d'études où il y a eu mortalité de petits mammifères, des doses à très hautes concentrations étaient administrées par voies invasives, ce qui est impossible dans l'environnement (Siegel, 2001). Quant aux humains, les seuls incidents rapportés sont liés à l'exposition prolongée des travailleurs dans des conditions précises ou à une mauvaise manipulation des produits commerciaux de *B. thuringiensis* (WHO « Environment Health Criteria 217 », 1999). En regard des études et des faits exposés dans la littérature, la WHO conclue que l'utilisation commerciale de *B. thuringiensis* est sans risque pour les humains (WHO « Environment Health Criteria 217 », 1999).

CHAPITRE V

LES PARASPORINES ET LEUR ACTION SUR LES CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES

5.1 Définition d'une parasporine

B. thuringiensis est connue depuis des dizaines d'années en tant qu'insecticide biologique grâce à l'action toxique de ses protéines Cry. Cependant, le rôle de *B. thuringiensis* dans la nature est mal connu, d'autant plus que le nombre de souches de *B. thuringiensis* possédant un pouvoir insecticide est inférieur à celles n'en possédant pas. Le ratio des souches non insecticides versus les souches insecticides est d'environ 90 % (Ohba, Mizuki *et al.*, 2009). Ce ratio a motivé plusieurs travaux de recherches afin de trouver un autre ou le vrai rôle biologique de *B. thuringiensis*. Lors d'une étude menée auprès de plus de 1700 souches, il a été découvert que plus de 40 souches non insecticides possédaient une action toxique sur des cellules leucémiques MOLT-4 (Mizuki, Ohba *et al.*, 1999). Ces nouvelles protéines Cry anti cancéreuses seront par la suite désignées parasporines (Mizuki, Park *et al.*, 2000). Les parasporines sont, par définition, des protéines Cry non insecticides et non hémolytiques possédant une activité toxique sur des cellules cancéreuses (Crickmore *et al.*, 2014, <http://www.btnomenclature.info/>).

5.2 Parasporines découvertes jusqu'à présent

Il existe présentement 19 parasporines regroupées en un total de six familles (PS1-PS6) (Crickmore *et al.*, 2014, <http://www.btnomenclature.info/>). Plusieurs de ces parasporines possèdent des séquences d'acides aminés comparables (Figure 5.1).

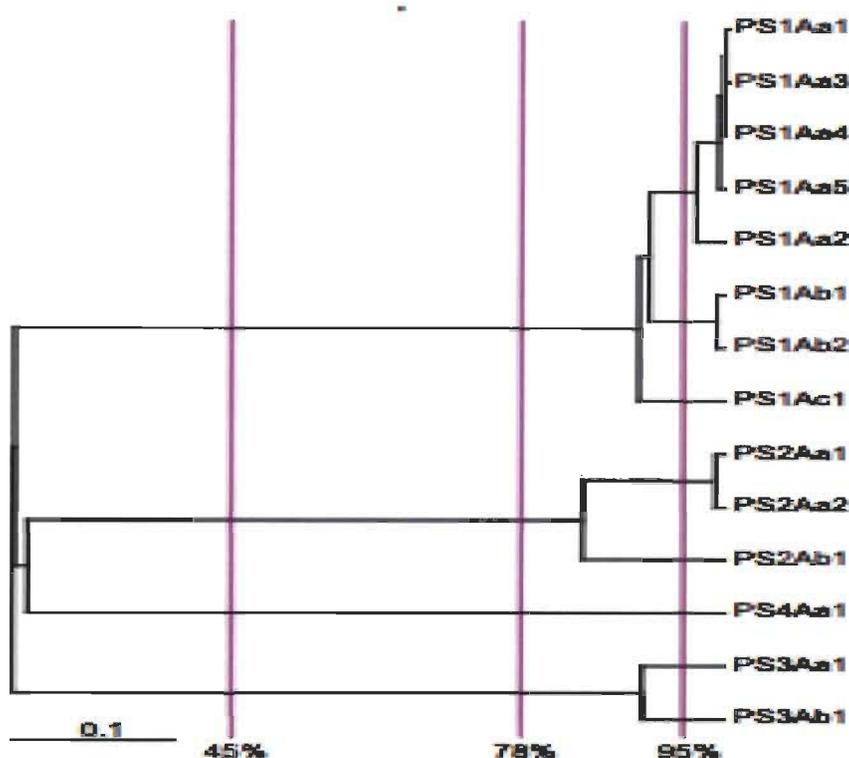


Figure 5.1 Dendrogramme illustrant la relation entre les parasporines des familles PS1 à PS4 découvertes jusqu'à présent (Crickmore *et al.*, 2014, <http://www.btnomenclature.info/>).

Les familles PS1 et PS2 regroupent 14 des 19 parasporines découvertes à ce jour. Celles-ci sont d'ailleurs parmi les plus étudiées quant à leurs effets sur les cellules cancéreuses ainsi que leur mode d'action.

5.3 Mécanismes d'action des parasporines sur les cellules cancéreuses humaines

Le mécanisme d'action des parasporines n'est pas universel. Il diverge entre les parasporines, mais aussi entre les différentes lignées cellulaires cancéreuses (Ohba, Mizuki *et al.*, 2009). C'est donc dire qu'une même parasporine peut avoir un mécanisme d'action différent selon le type de cancer et selon la concentration à laquelle elle se retrouve. L'étape universelle dans le mécanisme d'action des parasporines est leur liaison avec un récepteur situé à la surface des cellules cancéreuses. Chez l'insecte, le mécanisme d'action des protéines Cry implique nécessairement une altération de la membrane de la cellule, menant ainsi à la lyse et à la mort de celui-ci. En contrepartie,

certaines parasporines semblent démontrer des mécanismes d'actions autres que la formation de pores dans la membrane des cellules cancéreuses humaines (Katayama, Kusaka *et al.*, 2007). Les familles PS1 et PS2 ont été les plus étudiées quant à leur mode d'action.

Dans la famille PS1, la parasporine-1Aa1 (PS1Aa1) a été la plus investiguée au niveau des mécanismes de mort cellulaire. Cette protéine de 81 kDa est connue pour former un hétérodimère de 15 kDa et 56 kDa après son activation par la trypsine (Katayama, Yokota *et al.*, 2005). Suite à l'activation de la protoxine, l'hétérodimère se lie à récepteur couplé à une protéine G, ce qui induit une entrée de calcium à l'intérieur de la cellule cancéreuse. Ce débalancement ionique à l'intérieur de la cellule serait à l'origine du déclenchement de l'apoptose. La présence confirmée de protéines clivées étant reliées à l'apoptose comme la caspase-3 ainsi que la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) prouvent que le mécanisme d'action de la PS1Aa1 est apoptotique d'autant plus que l'activité toxique de la PS1Aa1 est inhibée lors de l'ajout d'inhibiteur de caspases (Katayama, Kusaka *et al.*, 2007). Ce mécanisme d'action ne suggère aucune formation de pores dans la membrane des cellules, contrairement à la parasporine-2Aa1 (PS2Aa1).

À l'inverse, la PS2Aa1 appartenant à la famille PS2 est une protéine de 37 kDa formatrice de pores et ayant un mode d'action supposément non apoptotique (Kitada, Abe *et al.*, 2006). Selon la littérature, la protoxine de 37 kDa est activée par la protéinase K pour former une toxine de 30 kDa qui se lie possiblement à des protéines GPI ancrées situées dans les rafts lipidiques de la cellule. Il s'ensuit un oligomérisation des PS2Aa1 au niveau de la membrane menant à la formation de pores et à la perméabilisation de celle-ci, pour ensuite aboutir à la lyse et la mort de la cellule (Ito, Sasaguri *et al.*, 2004; Kitada, Abe *et al.*, 2006). Récemment, il a été démontré que les protéines ancrées GPI seraient impliquées dans la cytotoxicité de PS2Aa1 au niveau des cellules cancéreuses (Kitada, Abe *et al.*, 2009). Le type exact de protéines GPI ancrées impliquées dans la spécificité et la cytotoxicité n'est pas défini et l'existence de co-récepteurs de la toxine et de co-facteurs n'est pas exclue (Kitada, Abe *et al.*, 2009). Ces protéines GPI ancrées semblent aussi impliquées dans l'oligomérisation, contribuant à la

cytotoxicité de la PS2Aa1. Les étapes menant à la mort des cellules sont les suivantes : un gonflement cellulaire, une altération de la structure du cytosquelette, une perméabilisation de la membrane cellulaire et la fragmentation des organelles (Kitada, Abe *et al.*, 2006). Il s'agit d'un mécanisme de mort cellulaire autre que l'apoptose, sans doute nécrotique, qui semble être impliqué.

CHAPITRE VI

MÉCANISMES DE MORT CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES HUMAINES

6.1 La nécrose

Au cours du cycle de vie d'une cellule, plusieurs mécanismes de mort cellulaire peuvent survenir tels l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, la mort cellulaire caspase-indépendante, la nécroptose et la catastrophe mitotique. Parmi ces mécanismes, l'apoptose et la nécrose sont les plus documentés. Contrairement à l'apoptose, qui est une mort cellulaire programmée, la mort cellulaire par nécrose est définie comme étant une mort passive et accidentelle résultant de perturbations de l'environnement cellulaire et menant à un relargage du contenu cellulaire à l'extérieur de la cellule (Fink and Cookson, 2005). Ce relargage du contenu cellulaire est suivi d'une inflammation locale activant ainsi une réponse du système immunitaire (Krysko, Vanden Berghe *et al.*, 2008). Les causes menant à la nécrose peuvent être notamment un déséquilibre en nutriments, des agents physiques (radiations, chocs thermique, mécanique et osmotique), chimiques (médicaments) ou même infectieux (virus, champignons et parasites). Lorsqu'une cellule est sujette à l'un de ces événements, il s'en suit un gonflement de la cellule et des organelles, une rupture de la membrane plasmique, une désagrégation des ribosomes, une distension du réticulum endoplasmique et une condensation modérée de la chromatine (Elmore 2007; Krysko, Vanden Berghe *et al.*, 2008; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009). La nécrose induit des dommages cellulaires par deux mécanismes, soit en endommageant la membrane cellulaire ou en interférant avec l'alimentation en énergie de la cellule (Elmore, 2007). Lors d'un traitement anticancéreux, la voie de mort cellulaire par nécrose est à proscrire compte tenu de sa nature inflammatoire et de son action non-spécifique pouvant s'étendre à toutes les cellules présentes. De ce fait, les traitements utilisant la voie de mort cellulaire par apoptose sont privilégiés puisque cette voie de mort cellulaire est contrôlée et non-inflammatoire.

6.2 L'apoptose

Le terme apoptose a été proposé pour la première fois en 1972 afin de décrire des motifs morphologiques spécifiques à la mort cellulaire dans les tissus (Kerr, Wyllie *et al.*, 1972). Les principaux changements morphologiques d'une cellule en apoptose sont : le rétrécissement de la cellule, une réduction du noyau (pycnose), une fragmentation du noyau (karyorrhexis), le maintien de l'intégrité des organelles, une rétraction des pseudopodes, la formation de bulles dans la membrane plasmique ainsi que la séparation des fragments cellulaires en corps apoptotiques (Fink and Cookson, 2005; Elmore, 2007; Kroemer, Galluzzi *et al.*, 2009). Les corps apoptotiques sont par la suite phagocytés par les macrophages et dégradés via les phagosomes. Du point de vue biochimique, les changements lors de l'apoptose sont l'activation des cystéine-protéases (caspases), l'exposition de phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane plasmique, la fragmentation de l'ADN, une dégradation du cytosquelette, l'activation de protéines pro-apoptotiques (exemple : famille Bcl-2) et l'expression de ligand pour la phagocytose (Elmore 2007; Wong 2011).

L'apoptose est bien connue en tant que mort cellulaire programmée servant notamment à conserver l'homéostasie cellulaire des tissus en accord avec la prolifération cellulaire. Le déséquilibre dans une cellule entre l'apoptose et la prolifération cellulaire peut mener à plusieurs maladies, notamment le cancer. À l'inverse de la nécrose, l'apoptose peut aider le système immunitaire en éliminant les cellules endommagées ou infectées sans provoquer de réponse inflammatoire. C'est pourquoi plusieurs médicaments anticancéreux ciblent des mécanismes visant à déclencher l'apoptose puisque cette mort programmée est moins dommageable pour les tissus environnants. L'absence de réponse inflammatoire est due au fait qu'il n'y a pas de relargage de matériel intracellulaire hors de la cellule et que celle-ci est rapidement phagocytée (Elmore, 2007). L'apoptose peut être déclenchée en réponse à une multitude de stimuli et les caspases jouent un rôle fondamental dans l'initiation et l'exécution de cette mort programmée.

Il existe deux voies principales pour l'activation des caspases soit; la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

6.2.1 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est caractérisée par l'implication de récepteurs de mort transmembranaire. Les récepteurs de mort les plus connus sont le récepteur Fas et le récepteur TNFR (Kasibhatla and Tseng 2003). La séquence d'événements menant à l'activation des caspases débute nécessairement par la liaison d'un ligand à ses récepteurs, soit les ligands FasL et TNF. Suite à cette liaison, les domaines de mort situés dans la région cytoplasmique des récepteurs vont recruter des protéines adaptatrices nommées TNF Receptor Associated Death Domain (TRADD) ou Fas Associated Death Domain (FADD). Ces protéines adaptatrices possèdent des domaines d'interactions nommés Death Effector Domain (DED) qui vont recruter les caspases-8 sous leur forme zymogène (Wong, 2011). Cette suite successive de liaison est à l'origine de la formation du complexe « Death Inducing Signaling Complex » (DISC) qui concentre les caspases-8 et mène à leurs autos clivages et à leurs activations. Les caspases-8 clivées vont par la suite activer les caspases excécutrices et mener à l'apoptose de la cellule. La voie extrinsèque peut aussi activer la voie intrinsèque par le clivage de la protéine Bid par la caspase-8. Les deux voies vont ainsi travailler de concert au déclenchement de l'apoptose.

6.2.2 La voie intrinsèque

Contrairement au déclenchement de l'apoptose par la voie extrinsèque, la voie intrinsèque n'implique pas de liaison à un récepteur de mort cellulaire et la mitochondrie joue un rôle crucial. Les stimuli menant à la voie mitochondriale peuvent être induits par des radiations UV, des altérations dans l'ADN de la cellule, un manque de facteurs de survie, des oncoprotéines, des agents chimiothérapeutiques et plusieurs autres. L'étape cruciale de la voie mitochondriale est le relargage du cytochrome c dans le cytosol de la cellule après la perméabilisation de la membrane mitochondriale par l'un de ces stimuli

(Kasibhatla and Tseng 2003). Suite à ce relargage, le cytochrome c va se lier à la protéine Apaf-1 et ainsi oligomériser en sept unités Apaf-1/cytochrome c et ainsi recruter la caspase-9 sous sa forme zymogène. L'apoptosome est formée et les caspases-9 vont s'autoclivier et par la suite activer les caspases effectrices pour ainsi mener à l'apoptose de la cellule (Elmore 2007).

CHAPITRE VII

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

7.1 Problématique

Au cours des dernières décennies, *B. thuringiensis* a démontré son utilité en tant que bio-insecticide. La capacité des protéines Cry à former des pores à travers la membrane de l'intestin chez les insectes cibles est au cœur de cette activité insecticide. La recherche grandissante pour l'identification de nouvelles protéines Cry insecticides a mené à la découverte d'une nouvelle fonction biologique pour ces protéines. Depuis les années 2000, certaines des protéines Cry de *B. thuringiensis* sont aussi connues pour leurs capacités anticancéreuses spécifiques. Ces nouvelles protéines Cry nommées parasporines qui, grâce à leur action spécifique sur les cellules cancéreuses, constituent un espoir vers des traitements anti-cancéreux moins invasifs et moins chimiques avec des molécules d'origine naturelle. Une nouvelle souche nommée *B. thuringiensis* 4R2 semble posséder le gène codant pour la protéine Cry46Aa1, correspondant à la parasporine 2Aa1 (PS2Aa1). Cette protéine est l'une des parasporines les plus connues selon la littérature et provient originalement de la souche *B. thuringiensis* A1547. Malgré son efficacité démontrée à tuer des cellules cancéreuses, le mode d'action de cette parasporine à l'intérieur des cellules est méconnu et hypothétique. Il n'existe pratiquement aucune donnée disponible sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la mort de la cellule cancéreuse. C'est pourquoi l'approfondissement des recherches en ce sens est essentiel afin de bien comprendre la séquence d'événements menant à la mort de la cellule. Ces nouvelles connaissances pourront sans contredit orienter la recherche afin de démontrer l'efficacité de cette protéine dans le but ultime de l'utiliser dans un traitement anti-cancer potentiellement moins invasif que les traitements classiques ou offrir une alternative complémentaire aux autres molécules.

7.2 Les hypothèses de recherche

Les éléments de ce document se concentrent d'abord sur l'hypothèse que la parasporine présente dans la nouvelle souche *B. thuringiensis* 4R2 est bel et bien la PS2Aa1 (Cry46Aa1). Comme c'est le cas pour plusieurs parasporines, le mode d'action de la parasporine-2Aa1 a peu été étudié au niveau des mécanismes de mort cellulaire. Ces études démontrent que le mode d'action de cette parasporine chez les cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) est non apoptotique (Ito, Sasaguri *et al.*, 2004; Kitada, Abe *et al.*, 2006). Compte tenu du manque d'analyses des mécanismes intracellulaires impliqués dans la mort cellulaire, ce mode d'action est hypothétique. Les éléments présentés dans ce document viseront à prouver que le mécanisme de mort cellulaire pourrait être apoptotique, non seulement chez les cellules HepG2, mais aussi chez d'autres types de cellules cancéreuses. De ce fait, une hypothèse de recherche est que la PS2Aa1 pourrait être toxique pour plusieurs autres types de cancers. Pour ce faire, la recherche sera orientée vers les cancers féminins, peu documentés jusqu'à présent.

7.3 Les objectifs de recherche

Les objectifs de ce projet à court terme seront de démontrer que la souche *B. thuringiensis* 4R2 obtenue via le *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC) contient la protéine PS2Aa1 (Cry46Aa1) et que cette protéine est toxique pour plusieurs types de cancers et non toxique pour des cellules normales. Ce travail de recherche visera aussi à démontrer le mode d'action de la protéine PS2Aa1, en investiguant le déclenchement de l'apoptose via l'activation de mécanismes intracellulaires propre à celle-ci chez plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines. Le but sera ainsi de valider ou contredire les résultats obtenus dans les études précédentes qui décrivent un mode d'action non apoptotique dans les cellules cancéreuses HepG2 (Ito, Sasaguri *et al.*, 2004; Kitada, Abe *et al.*, 2006). Les objectifs de cette étude seront aussi de démontrer que la PS2Aa1 est aussi toxique pour d'autres lignées cancéreuses (particulièrement les cancers féminins) et qu'elle induit l'apoptose dans chacune de ces lignées. La compréhension du fonctionnement de cette protéine pourrait avoir un impact quant à son utilisation possible en tant que traitement anti-cancéreux.

CHAPITRE VIII

PARASPORIN-2Aa1 FROM A NEW *BACILLUS THURINGIENSIS* 4R2 STRAIN INDUCES CASPASES ACTIVATION AND APOPTOSIS IN HUMAN CANCER CELLS

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais.

Authors: K Brasseur^{1,3}, P Auger^{1,3}, E Asselin¹, J C Côté² and M Sirois¹

¹ Research Group in Molecular Oncology and Endocrinology, Department of Medical Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, Boul. Des Forges, CP 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

² Agriculture and Agri-Food Canada, Research Centre, 430, Boul. Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada J3B 3E6

³ These authors contributed equally to this work.

(Correspondence should be addressed to Dr Marc Sirois; Email: marc.sirois@uqtr.ca)

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, parasporin, caspases, apoptosis, PAR-4, AKT, XIAP, PS2Aa1, ERK, MAPK, cancer cells

Grants: Canada Research Chair in Molecular Gyneco-Oncology to E.A.

Disclosure: There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Parasporin-2Aa1 from a new *Bacillus thuringiensis* 4R2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells

Abstract

In previous studies, parasporin-2Aa1, originally isolated from *Bacillus thuringiensis* strain A1547, was shown to be cytotoxic against specific human cancer cells but the mechanisms of action were not studied. In the present study, we found that proteinase K activated parasporin-2Aa1 protein isolated from a novel *B. thuringiensis* strain, 4R2, was specifically cytotoxic to endometrial, colon, liver, cervix, breast and prostate cancer. It showed no toxicity against normal cells. Upon treatment with proteinase K-activated parasporin-2Aa1, morphological changes were observed and western blot analysis revealed the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase, caspase-3 and caspase-9 in cancer cell lines exclusively, indicative of programmed cell death, apoptosis. Flow cytometry analyses using propidium iodide and annexin V confirmed apoptosis induction. Further analyses were performed to study survival pathways including AKT, XIAP, ERK1/2 and PAR-4, a known inducer of apoptosis. These results indicate that parasporin-2Aa1 is a selective cytotoxic protein that induces apoptosis in various human cancer cells lines from diverse tissues.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, parasporin-2Aa1, apoptosis, caspase, propidium iodide, PAR-4, AKT, XIAP, ERK1/2.

Introduction

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium that produces crystalline parasporal inclusions during sporulation. These inclusions are made of proteins, the δ -endotoxins. They are classified in two families, the crystal (Cry) and the cytolytic (Cyt) proteins encoded by the cry and cyt genes, respectively [1,2]. The Cry proteins have been extensively studied since 1970's owing to their specific insecticidal activities against lepidoptera, dipteran and coleopteran [3]. Upon ingestion by a susceptible insect, the

parasporal inclusions are solubilized in the alkaline insect midgut, the Cry protoxins are released and then processed by midgut proteases to yield activated toxin proteins. These bind to specific receptors located on the membrane of epithelial gut cells, leading to pore formation and ultimately to insect death [1,4].

The successful development and use of *B. thuringiensis*-based formulations for the control of insect pests has led to the isolation of thousands of novel strains and hundreds of Cry proteins have now been characterized to various extents [5]. Several studies have shown that non insecticidal Cry proteins are more widely distributed than the insecticidal Cry proteins [6]. This led to the research of potentially novel biological activities from the non-insecticidal Cry proteins. Following a large screening, some non-insecticidal and non-hemolytic Cry proteins showed cytotoxic activity against human cancer cells and these new *B. thuringiensis* toxins were called parasporins [7,8]. So far, six families of parasporins, PS1 – PS6, have been identified [9]. Each parasporin family exhibits specific spectrum and mechanism of action against human cancer cells.

Parasporin-2Aa1 (PS2Aa1, also classified Cry46Aa1) produced by *B. thuringiensis* serovar *dakota* strain A1547 has been intensively investigated for its toxic action in cancer cells [10]. When activated by proteinase K, PS2Aa1 is at least 400- fold more toxic for the human cancer cell line HepG2 (human hepatocyte cancer) than for the normal human cell line HC (human normal hepatocyte) and human cancer cell line HeLa (human uterine cervical cancer) [11]. In HepG2 cells, the monomeric toxin appears to bind to an unknown receptor protein located in the lipid raft [12]. Once linked to the receptor, PS2Aa1 oligomerizes to permeabilize the membrane leading to pore formation [11,13]. A Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein appears to be involved for the efficient cytotoxic action of PS2Aa1 [12]. Pore formation results in alterations of the cytoskeletal structures, fragmentation of organelles, alterations of cell morphology such as cell swelling and finally cell lysis [13]. The mode of cell death appears to be non-apoptotic but this hypothesis was not confirmed [11-13]. Thus, additional characterisation of the intracellular events involved during induced- PS2Aa1 cell death was mandatory to confirm whether or not apoptosis was involved.

In this present study, an additional *B. thuringiensis* strain called *Bt* 4R2 which contain the gene encoding the Cry46Aa1 protein (PS2Aa1) has been studied to identify the mechanisms involved in cytotoxic-dependent cell death induction. We found that PS2Aa1 was very cytotoxic to many cancer cells *in vitro*. To further explore the mechanism using selected cancer cells from different tissue (HepG2-hepatocyte cancer, PC-3-prostate cancer and MCF-7-breast cancer) we found that apoptosis cell death was occurring via caspases and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. We also found that PS2Aa1 shows very low toxicity to normal cell lines (IOSE-144, HIESC and HIEEC).

We further support the hypothesis of apoptosis induction with identification of various survival pathway inhibition including AKT, XIAP, ERK1/2 and induction of the tumor suppressor PAR-4 following treatment with PS2Aa1. Thus, PS2Aa1 appears to be a cell-killing discriminating toxin regulating apoptosis in different human cancer cells.

Materials and methods

Bacterial strain and culture media

B. thuringiensis serovar *dakota* strain 4R2 was used in this study. It was obtained from the *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University, Columbus, OH, USA). Bacterial cells were grown at 30°C on nutrient agar from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) at pH 7.1.

Cells and culture conditions

Human hepatocyte cancer cell line HepG2 (HB-8065), human prostate cancer cell line PC-3 (CRL-1435), human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 (HTB-37), human epithelial cervix adenocarcinoma cell line HeLa (CCL-2), human uterus endometrium adenocarcinoma cell line Hec-1A (HTB-112), human uterus endometrium adenocarcinoma cell line KLE (CRL-1622), human breast adenocarcinoma

cell line MDA-MB231(HTB-26), human breast cancer cell line MCF-7 (HTB-22), human epithelial ovary adenocarcinoma cell line OVCAR-3 (HTB-161) and human epithelial ovary adenocarcinoma cell line SKOV-3 (HTB-77) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Human immortal non-tumorigenic ovarian surface epithelial cell line IOSE-144 was kindly provided by Dr. David Hunstman (British Columbia Cancer Research Center, Vancouver, BC, Canada). Human immortal endometrial stromal cells HIESC and Human immortal endometrial epithelial cells HIEEC were a kind gift from Dr. Michel Fortier (Centre Hospitalier de l'Université Laval, Quebec City, QC, Canada). Human ovarian carcinoma cells A2780 were kindly provided by Dr. G. Peter Raaphorst (Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, ON, Canada). Human endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa was kindly provided by Dr. Samuel Chogran (Université de Montréal, Montreal, QC, Canada). HepG2, PC-3, HIEEC and HIESC cells lines were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% foetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. MCF-7 and OVCAR-3 cell lines were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. MDA-MB-231 cell line was maintained in RPMI 1640 medium containing 5% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. Hec-1A cell line was maintained in McCoy's medium containing 5% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. SKOV-3 cell line was maintained in McCoy's medium containing 10% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. HeLa, Ishikawa and A2780 cell lines were maintained in DMEM-F12 medium containing 2% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. KLE cell line was maintained in DMEM-F12 medium without HEPES containing 10% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. Caco-2 cell line was maintained in DMEM-F12 medium containing 10% foetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. IOSE-144 cell line was maintained in MCDB105 medium containing 10% foetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. All cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Total DNA isolation

Total DNA from *B. thuringiensis* 4R2 was isolated from a 5mL overnight culture using QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions for bacterial DNA extraction.

PCR amplification

The primers used in this study were designed in our laboratory from the *cry46Aa1* gene nucleotide sequence. Primers for PCR amplification were as follows: *Bt4R2-2F*: 5'- TAACCGGAGGGCTTCAAG -3' (sense) and *Bt4R2-1R*: 5'- TAATTCCCCCATTTTGGG -3' (antisense). PCR were conducted in an Applied Biosystems 2720 thermal cycler (Life Technologies, Ottawa, ON, Canada). The PCR reactions were performed in a 50 μ L volume containing 200 μ M each of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1X PCR buffer, 0.5 μ M of each primers, 100 ng of DNA and 1,25 units of Taq DNA polymerase. All PCR reagents were from New England Biolabs (Ottawa, ON, Canada). PCR was performed by an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 30 s, 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were size separated on a 1% agarose gel and visualized using SYBR-Safe (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) staining upon UV transillumination.

DNA sequencing

Amplicons were purified using the Mini Elute PCR Purification Kit from Qiagen. The purified PCR reactions were resolved on a 3130XL Genetics Analyser (Applied Biosystems) at IBIS Plate-forme d'Analyses Génomiques (PAG) de l'Université Laval (Quebec City, QC, Canada). Both strands of the DNA sequence were sequenced: The 940pb sequence was compared using the Blast-N tool (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Preparation of activated parasporal proteins

Bacillus thuringiensis strain 4R2 was cultivated on nutrient agar plates, incubated for 4 days at 30°C until cell lysis. The cells were harvested from the plates and washed twice with sterile distilled water. The pellet containing the spores -crystal proteins- was solubilized in 500 µL of solubilisation buffer containing 56 mM Na₂CO₃ (pH:11,3) and 11 mM dithiothreitol (DTT) for 1 h at 37°C. Insoluble material was pelleted by centrifugation at 13 200 rpm for 2 minutes and the supernatant was passed through a 0.22 µm membrane filter. 250 µL of the filtrate was transferred to a sterile 1.5 mL centrifuge tube and the pH adjusted to 8 with 1 M Tris-HCl (pH 4,98).

The solubilised proteins were digested with either proteinase K (final concentration at 100 µg/mL) or trypsin (final concentration at 30 mg/mL) for 1 h at 37°C. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) was added (final concentration 1 mM) to stop proteolytic processing. To confirm the presence of the parasporal proteins, SDS-PAGE analysis was performed as described elsewhere [14] using 4% stacking gel and 12% separating gel. After electrophoresis, the gel was stained with 0.1% Coomassie blue R-250 (Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

Assay of cytotoxicity

The antiproliferative activity of *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins was assessed using the MTT assay [15,16]. Briefly, plates were seeded with 180 µL of normal and cancer cells in suspension (for HIESC, 14 000; IOSE-144, 12 000; HIEEC, 15 000; Ishikawa, 16 000; HeLa, 16 000; KLE, 14 000; Hec-1A, 12 000; Caco-2, 20 000; PC-3, 16 000; HepG2, 20 000; A2780, 16 000; OVCAR-3, 20 000; SKOV-3, 14 000; MCF-7, 16 000 and MDA-MB231, 12 000) in medium. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. Freshly solubilized and activated *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins (with proteinase K or trypsin) in solubilisation buffer were diluted in fresh medium, and 100 µL aliquots containing escalating concentrations of the toxin proteins (0 µg/mL to 20 µg/mL) were added and the plates were incubated for another 24 h. The final concentration of

the solubilisation buffer (56 mM Na₂CO₃, 11 mM DTT, 100 µg/mL proteinase K (or 30 mg/mL trypsin) and 1 mM PMSF) in the culture media was 8% and was kept constant in all experiment. After 24 h, 10 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/mL in PBS) were added to the wells. Four hours later, 100 µL of the solubilisation solution (10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.01 M HCl) were added and the plates incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The optical density was read using a Fluostar optima BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA) at 565 nm. Readings obtained from treated cells were compared with measurements from control cell plates fixed on the treatment day; and the percentage of cell growth inhibition was calculated for each toxin protein (proteinase K activated or trypsin activated). The experiments were performed in triplicate. The assays were considered valid when the coefficient of variation for a given set of conditions and within the same experiment was < 10%.

Light microscopy observation

For observation of the morphological changes, normal (HIESC) and cancer cells (PC-3, MCF-7 and HepG2) were observed after 24 h treatment with proteinase K activated toxin proteins at 1 µg/mL (MCF-7) or 2 µg/mL (HIESC, PC-3 and HepG2). 10X and 20X magnifications were used with an Olympus (model BX60) light microscope (Carsen Group, Markham, ON, Canada).

Antibodies and reagents

The Na₂CO₃, DTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, HCl, SDS, PMSF, Tris-HCl and proteinase K were all obtained from Sigma-Aldrich. All primary antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) except for β-actin (Sigma-Aldrich). Secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-rabbit were purchase from Bio-Rad Laboratories. Annexin V/PI apoptosis kit was purchased from Invitrogen.

Western blot

PS2Aa1 treated cells were washed with PBS and submitted to lysis in cold RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete™ from Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) and phosphatase inhibitor (PhosSTOP™ from Roche Applied Science) followed by three freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates, determined using Bio-Rad DC protein assay, were separated on polyacrylamide gels (10-14%) and transferred on nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in 5% milk, PBS 1X, 0.06% Tween 20 for 1 h at room temperature, probed with primary antibody, washed in PBS 1X, 0.06% Tween 20, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad). Detection was performed using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada), as described by the manufacturer using UVP bioimaging systems.

Measurement of Annexin V/PI cells

FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the treated cells were collected, washed with PBS and diluted in 1X Annexin Binding buffer (100 µl). For each sample, 5 µL of Annexin V and 2 µl of Propidium Iodide (PI) were added to the cell suspension and incubated for 15 min at room temperature. An additional 100 µl volume of Annexin binding buffer was added to each sample for a total of 200 µl. Samples were analyzed (10 000 events) using a Beckman Coulter flow cytometer Cytomics FC500. Analyses were performed using CXP Analysis software (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada).

Statistical analyses

The data were subjected to one-way analysis of variance (PRISM software version 5.00; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

Results

Characterization of Bacillus thuringiensis 4R2 crystal protein

SDS-PAGE analysis of the solubilized crystal proteins revealed a major band estimated at 37 kDa, corresponding to the native form of the Cry46Aa1 protein (Figure 1). In PCR experiments with Cry46Aa1 specific primers, a 940 bp amplification product was obtained. Analyses of the nucleotide sequence using BLAST tools revealed that the nucleotide sequence was 100% homologous with the proteinase K activated Cry46Aa1 nucleotide sequence (NCBI accession number AB099515.1). Owing to this nucleotide sequence identity, the 37 kDa crystal proteins from *B. thuringiensis* 4R2 was named PS2Aa1.

Cytotoxicity of PS2Aa1 in cancer and normal cells

Trypsin (used as control treatment) and proteinase K activated crystal proteins from *B. thuringiensis* 4R2 (PS2Aa1) were examined for cytotoxicity against normal and cancer human cells using MTT Assay for a 24 h treatment (Figure 2). No cytotoxic activity was observed after trypsin treatment of solubilized crystal proteins for any of the cells lines. Among the cells tested, proteinase K activated crystal proteins were highly cytotoxic to HepG2, MCF-7, KLE, Hec-1A, MDA-MB231 and PC-3 cells while being moderately cytotoxic to Caco-2 cells. No significant cytotoxic activity was observed in A2780, OVCAR-3, SKOV-3 and HeLa cancer cell lines. None of the normal cell lines (IOSE-144, HIEEC and HIESC) showed cytotoxic effects. The cytotoxicity of the crystal proteins was dose-dependent and was examined using serial proteins dilutions. Based on their high sensitivity to PS2Aa1, HepG2, PC-3 and MCF-7 cancer cell lines were selected for further experimentations. HIESC cells were used as a normal cell line model to further explore the effects of PS2Aa1 on non-cancer cells.

Morphological changes in cancer cells induced by PS2Aa1

To further study the effect of PS2Aa1, concentrations from 1 $\mu\text{g/mL}$ to 2 $\mu\text{g/mL}$ were used based on the previous cell viability experiment. Following treatment by PS2Aa1 proteinase K activated proteins in HepG2 (2 $\mu\text{g/mL}$), PC-3 (2 $\mu\text{g/mL}$) and MCF-7 (1 $\mu\text{g/mL}$) cells, morphological characteristics of the treated cells were observed under light microscopy (Figure 3). Cell shrinkage, characteristic of apoptotic cell death [17], was observed only in HepG2, MCF-7 and PC-3 cancer cells. However, no morphological changes were observed on HIESC; confirming the non-cytotoxicity of PS2Aa1 on normal cells as previously observed with the MTT experiment. No necrosis morphological changes like cell swelling or blebbing were observed [17].

PS2Aa1 induces cell death by apoptotic mechanisms

To confirm our previous observations concerning the morphological changes related to apoptosis occurring in cancer cells, we performed annexin V/ propidium iodide (PI) staining analysis on the treated cells. Annexin V has the ability to stain phosphatidyl serine on the outer leaflet of the plasma membrane and its presence on the outer leaflet instead of the inner leaflet is a unique characteristic of apoptosis [18]. Results showed that 6 h and 24 h after treatment, PS2Aa1 induced high level of apoptosis in all three cancer cell lines (Figure 4A-C) and very little in the normal endometrial cancer cell line HIESC (Figure 4D) This is in direct correlation with the MTT assay results (Figure 2). Most cancer cells showed high level of apoptosis after 6 h of treatment indicating the high efficiency of PS2Aa1 in inducing apoptosis.

To further investigate apoptosis induction, we also measured different apoptosis markers by western blot analysis such as cleaved caspase-3,-8, -9 and cleaved PARP. Our results showed that, as early as 6h of treatment with PS2Aa1, caspase-3 cleavage/activation was observed in both PC-3 and HEPG2 cancer cells (Figure 5A&C; MCF-7 being caspase-3 negative). Once activated, caspase-3 is an effector caspase and can do proteolytic cleavage on various proteins, such as the repair protein PARP, then leading to apoptotic cell death. However, caspase-3 requires initiator caspases from either the intrinsic or

extrinsic pathway to be cleaved/activated [19,20]. By western blot analysis, we measured cleaved-caspase-8 (extrinsic pathway) and cleaved-caspase-9 (intrinsic pathway) and found out that only caspase-9 cleavage/activation was present in all three cancer cell lines (Figure 5A-C) while caspase-8 cleavage/activation was not observed (Data not shown). In correlation with caspases cleavage, PS2Aa1 also induced PARP cleavage/degradation in all three cancer cell lines (Figure 5A-C). None of these markers of apoptosis were observed in the normal cell line HIESC (Figure 5D) indicating that no apoptosis was occurring using the maximum dose of PS2Aa1 (2 µg/ml) used on cancer cell lines. Basal level of the different markers was observable only after high exposition to reveal the appropriate protein bands (Figure 5D).

Regulation of different survival pathway during treatment with PS2Aa1

All the previous experiments demonstrate that PS2Aa1 toxin can induce cell death in cancer cells through apoptosis induction. In order to investigate the possible involvement of other survival/death pathways, we performed additional experiments on PC3 prostate cancer cells using western blot analysis. We first investigated the AKT survival pathway known for being an important survival mechanism for cancer cells. Proteins from the AKT pathway are often altered in cancer and the high survival signal from these mutations are often responsible for the resistance of cancer cells to therapeutics treatments and the impossibility to induce apoptosis [21-25]. Our results showed a high decrease of phosphorylated (the active form) AKT at serine 473. Total AKT level was also decreased suggesting that it is also in part responsible for the decrease of p-AKT level. XIAP, an inhibitor of caspase and a ubiquitin ligase for PTEN (a negative regulator of AKT phosphorylation) was also decreased (Figure 6A) [26]. ERK1/2, proteins of the MAPK pathway, requires activation/phosphorylation to induce apoptosis in cancer cells following treatment with cisplatin or other apoptosis stimuli [27,28]. As observed in cisplatin treatments, PS2Aa1 induced an increase of ERK1/2 phosphorylation at 24 h following treatment while total ERK level was staying stable (Figure 6B). This suggests that ERK activation is required for the induction of apoptosis. Finally, we recently discovered a new mechanism related to the tumour suppressor

PAR-4 which is cleaved by caspase-3 upon apoptosis stimuli and is able to induce apoptosis once cleaved [29,30]. Because of PS2Aa1 capacity to activate apoptosis mechanisms, we questioned whether PAR-4 cleavage could be involved in apoptosis induction upon treatment with the toxin. Interestingly, a cleaved fragment of approximately 25 kDa appeared as soon as 6h after treatment with PS2Aa1 in full correlation with our hypothesis (Figure 6C). The presence of the cleaved PAR-4 fragment, normally present only in cancer cells undergoing apoptosis, reinforce the idea that PS2Aa1 is an inducer of apoptosis in cancer cells.

Discussion

Parasporin-2Aa1 is a 37kDa crystal protein, originally isolated from *B. thuringiensis* A1547, known to be a pore forming toxin active against human cancer cells [31]. The previous studies suggest that this toxin protein mode of action is non-apoptotic but these studies lack in-depth molecular analysis of cancer cell death pathways [11,13]. In the present study, a new *B. thuringiensis* strain, 4R2, was shown to produce the PS2Aa1 (Cry46Aa1) crystal protein. We first observed that the proteinase K treated PS2Aa1 crystal proteins caused morphological changes in the highly sensitive HepG2, MCF-7 and PC-3 cancer cell lines while, on the other hand, the normal cell line HIESC morphology was unchanged. In previous studies, cell lysis, swelling and blebbing were observed in sensitive cell lines including HepG2 [11,13]. In this study, none of these morphological changes were observed; instead, cells shrinkage was observed in the sensitive cells lines, supporting the hypothesis that PS2Aa1 could induce apoptosis in cancer cells line [17].

The *B. thuringiensis cry* genes encoding the Cry proteins are located on plasmids. These can be transferred between *B. thuringiensis* strains [2]. Such plasmid transfers may explain why the gene encoding the protein PS2Aa1 (Cry46Aa1) can be found in two different *B. Thuringiensis* strains. As shown in a previous study, *cry* genes coding for the same parasporin protein can be geographically dispersed [32]. This supports the fact that the *B. thuringiensis* 4R2 strain contains the same parasporin gene as *B. thuringiensis*

A1547. The 1017 nucleotide sequence (338 amino acids) of *cry46Aa1* from *B. thuringiensis* A1547 strain (Genbank accession number: AB099515.1) encodes the full length Cry46Aa1 protoxin, the precursor of the activated toxin. When activated by proteinase K, the protoxin is cleaved at residues 52 and 306 of the amino acids sequence to yield an active form [13]. The nucleotide sequence from *B. thuringiensis* 4R2 obtained with our primers by PCR amplification is 100% homologous with the sequence of proteinase K activated protein described above (amino acids residues 52 to 306). The Cry46Aa1 protein expression was confirmed by SDS-PAGE analysis and the 37kDa major band observed indicates that the crystal proteins solubilisation was efficient.

Dose-response studies of proteinase K and trypsin activated PS2Aa1 crystal protein were conducted using the MTT assay. When activated by proteinase K, PS2Aa1 had high cytotoxicity against HepG2 cells as previously reported [11]. The normal cell lines HIESC, IOSE-144 and HIEEC were not sensitive to the proteinase K activated proteins PS2Aa1. Moreover, several new cancer cells lines were screened and new sensitive cancer cell lines, MCF-7, MDA-MB231, KLE, Hec-1A and PC-3, were found. In susceptible insect models, activated Cry proteins bind to specific receptors at the surface of the epithelial membrane midgut cells [33]. In many case, Cry proteins bind to multiple receptors sequentially leading to pore formation in the midgut cells [34]. The selective cytotoxicity of PS2Aa1 toward cancer cells and the absence of cytotoxicity in the normal cells suggest that either different receptors are present on the surface of cancer and normal cell membranes or only absent on the normal cells. Alternatively, normal cells may not express GPI anchor protein to enhance cytotoxicity of PS2Aa1.

When activated by trypsin, the PS2Aa1 crystal protein did not show cytotoxicity against the different cell lines. PS2Aa1 protoxin had to be cleaved by proteinase K to be cytotoxic against human cancer cells [11]. Presumably, the trypsin and proteinase K cleavage sites are different. Toxin protein without protease activation were tested at high concentration (20 µg/mL) against all cells lines and no toxicity was observed in all the cells treated (data not shown). In insect models, specific protease activation is essential and can determine the toxin specificity [35]. Digestion of Cry proteins with some

proteases can also generate inactive products and contribute to insect resistance [36]. It is reasonable to hypothesize that without proper protease activation, the PS2Aa1 protoxin could not be recognized by the normal cells receptors. Conversely, when cleaved with proteinase K, specific regions of the activated PS2Aa1 can bind to a receptor. When cleaved by trypsin, these specific regions can only be partially exposed or not at all, preventing binding.

The parasporins are not the only bacterial toxins able to induce apoptosis in host cells [37]. Mitochondria pathway apoptosis can also be activated by bacterial pathogens [38]. PS2Aa1 shows structural homology with the *Aeromonas hydrophila* aerolysin and *Clostridium perfringens* alpha-toxin [31]. These pore forming toxins require GPI-anchored proteins for efficient cytolysis and binding [39]. These structural similarities strengthen the indications that PS2Aa1 is a pore forming protein [31]. In the PS2Aa1, the GPI-anchored proteins seem to be implicated in toxin cytotoxicity but not in binding specificity as opposed to aerolysin and alpha-toxin [12]. The lack of information on the binding events is a hurdle in getting a better understanding of the molecular pathways involved at this level. One hypothesis is that PS2Aa1 forms small pores in the plasma membrane enabling the passage of ion molecules in cells and thus inducing apoptosis. This is the mode of action displayed by the *Staphylococcus aureus* alpha toxin which also induces apoptosis in host cells [40].

So far, some other parasporins have been shown to induce apoptosis in mammalian cancer cells [41,42]. However, we are the first to demonstrate the apoptotic effects of parasporin-2Aa1 (PS2Aa1). The parasporin-1Aa1 is cytotoxic against HeLa and MOLT-4 cells and cause an increase of intracellular level of calcium via heterotrimeric G-protein or G-protein-coupled receptors [42]. This parasporin, however, is not considered a pore forming toxin, contrary to PS2Aa1. Another 29 kDa parasporin from the *B. thuringiensis* A1519 strain induces mitochondrial apoptosis pathway in the Jurkat cells via caspase-3 and -9 cleavage and the release of cytochrome c from the mitochondria [41]. In a previous study, it was reported that HepG2 cells, treated with PS2Aa1, have shown a leakage of cytochrome C from mitochondria who was not

consider at that time as an apoptotic event [13]. The cytochrome C leakage from the fragmented mitochondria is hallmark of apoptosis induction through the mitochondria pathway [43]. In our current study, caspase-9 cleavage is observed in the three PS2Aa1 selected sensitive cells lines (HepG2, MCF-7 and PC-3) supporting the hypothesis of the mitochondria pathway activation. Identification of the receptor implicated in PS2Aa1 binding will contribute to a better understanding of the exact molecular events involved in apoptosis induced cell death.

The regulation of the various survival pathway observed supports the hypothesis of the induction of apoptosis by PS2Aa1 (Figure 6). AKT pathway is well known for its survival and proliferative functions [21,44]. Survival aspect of the AKT pathway involves the inactivation of proapoptotic factors such as Bad and caspase-9 but also the promotion of the cell cycle via the activation of mTor/p70S6k cascade [21,26]. XIAP is a protein responsible for being an inhibitor of caspase-3, -7 and -9 by directly binding these proteins and then inhibiting their functions [45]. By inhibiting caspase-9, XIAP can also interfere with cytochrome C pathway. It has been shown that XIAP anti-apoptotic functions are mediated in part by the regulation of the AKT pathway [26]. Upon apoptosis stimuli, AKT, its active form p-AKT and XIAP are very often downregulated to block proliferation and enhance apoptotic mechanisms as observed upon treatment with PS2Aa1 on various cancer cells [25,46]. This is supported by the cleavage/activation of caspase-3 and -9.

ERK1/2 are proteins from the MAPK pathway and known for various regulation such as proliferation, cell migration, differentiation and cell death depending on the condition exposed [28]. Cell death has been frequently associated with p-ERK1/2 upon diverse apoptotic stimuli [27,28]. Similar results obtained upon treatment with PS2Aa1 (Figure 6) with the increase of the active form of ERK1/2 (p-ERK1/2) support the implication of the MAPK pathway in enhancing apoptosis activity as observed with cisplatin and other apoptotic inducers [27,28].

Prostate apoptosis response-4 (PAR-4) is a tumour suppressor known for inducing selectively apoptosis in cancer cells using a unique domain (SAC) [47]. PAR-4 can induce apoptosis by both the intrinsic and extrinsic pathways involving various regulation of these different pathways. However, the selectivity of PAR-4 to induce apoptosis only in cancer cells is attributed to the PKA level required to activate PAR-4 which is not sufficient in normal cells compared to most cancer cells [48,49]. More recently, we discovered that PAR-4 is cleaved by caspase-3 upon apoptotic stimuli and that its cleaved fragment plays a role in the apoptotic mechanism of PAR-4 in cancer cells [29]. Upon treatment with PS2Aa1, a cleaved fragment of PAR-4 was observed in the PC-3 cancer cell line further supporting the hypothesis of the induction of apoptosis by the toxin and its selectivity for cancer cells.

In conclusion, the results obtained in this study clearly indicate that PS2Aa1, synthesized by *B. thuringiensis* 4R2, induces apoptosis in human cancer cells but not in normal cells. Caspase activation and the regulation of the tested survival/death pathways involved in apoptosis confirm that the PS2Aa1 induces cell death by apoptosis and can now better explain PS2Aa1 mechanism of action. The PS2Aa1 toxin is a very promising molecule for future studies on its selectivity on cancer cells. However, further experiments on the mechanism implicated in cell specificity and the mechanism related to the induction of apoptosis will be needed in order to clarify its mode of action.

References

1. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR 62: 775-806.
2. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in genetics: TIG 17: 193-199.
3. Hofte H, Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological reviews 53: 242-255.

4. Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 49: 423-435.
5. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, *et al.* (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 62: 807-813.
6. Ohba M (1996) *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: A possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 56-64.
7. Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, *et al.* (1999) Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal of applied microbiology* 86: 477-486.
8. Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, *et al.* (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7: 625-634.
9. Okumura S, Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. and Shin, T. (2010) Parasporin nomenclature. Available: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/> Accessed: 16th march 2015.
10. Crickmore N, Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R (2014) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available: <http://www.btnomenclature.info/> Accessed: 27th may 2014.
11. Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, *et al.* (2004) A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *The Journal of biological chemistry* 279: 21282-21286.
12. Kitada S, Abe Y, Maeda T, Shimada H (2009) Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicology* 264: 80-88.
13. Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, *et al.* (2006) Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of biological chemistry* 281: 26350-26360.
14. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

15. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer research* 47: 943-946.
16. Ford CH, Richardson VJ, Tsaltas G (1989) Comparison of tetrazolium colorimetric and [3H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 24: 295-301.
17. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35: 495-516.
18. Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, *et al.* (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.
19. Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
20. Yang Y, Zhao S, Song J (2004) Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor β 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 223-234.
21. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, *et al.* (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* 30: 193-204.
22. Girouard J, Lafleur M-J, Parent S, Leblanc V, Asselin E (2013) Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 128: 335-343.
23. Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V, Asselin E (2012) Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *International Journal of Cancer* 130: 1755-1767.
24. Chaudhry P, Asselin E (2009) Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 16: 363-380.
25. Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E (2008) Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 13: 259-271.
26. Asselin E, Mills GB, Tsang BK (2001) XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research* 61: 1862-1868.

27. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ (2000) Requirement for ERK Activation in Cisplatin-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 275: 39435-39443.
28. Cagnol S, Chambard J-C (2010) ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* 277: 2-21.
29. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E (2012) Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Molecular and Cellular Biology* 32: 826-839.
30. Chaudhry P, Fabi F, Singh M, Parent S, Leblanc V, *et al.* (2014) Prostate apoptosis response-4 mediates TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 5: e1044.
31. Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, *et al.* (2009) Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *Journal of molecular biology* 386: 121-133.
32. Gonzalez E, Granados JC, Short JD, Ammons DR, Rampersad J (2011) Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. *Current microbiology* 62: 1643-1648.
33. Van Rie J, Jansens S, Hofte H, Degheele D, Van Mellaert H (1990) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and environmental microbiology* 56: 1378-1385.
34. Gomez I, Pardo-Lopez L, Munoz-Garay C, Fernandez LE, Perez C, *et al.* (2007) Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28: 169-173.
35. Haider MZ, Knowles BH, Ellar DJ (1986) Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. colmeri insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European journal of biochemistry / FEBS* 156: 531-540.
36. Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *The Journal of biological chemistry* 272: 23473-23476.
37. Gao L, Abu Kwaik Y (2000) Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2: 1705-1719.

38. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, *et al.* (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular microbiology* 7: 1127-1138.
39. Diep DB, Nelson KL, Raja SM, Pleshak EN, Buckley JT (1998) Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2355-2360.
40. Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, *et al.* (1994) Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infection and immunity* 62: 1304-1312.
41. Amano H, Yamagiwa M, Akao T, Mizuki E, Ohba M, *et al.* (2005) A novel 29-kDa crystal protein from *Bacillus thuringiensis* induces caspase activation and cell death of jurkat T cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69: 2063-2072.
42. Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, *et al.* (2007) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *The Journal of biological chemistry* 282: 7742-7752.
43. Jiang X, Wang X (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual review of biochemistry* 73: 87-106.
44. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905-2927.
45. Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-252.
46. Tong Q-S, Zheng L-D, Wang L, Zeng F-Q, Chen F-M, *et al.* (2005) Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 12: 509-514.
47. El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM (2003) Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 23: 5516-5525.

48. Hebbar N, Wang C, Rangnekar VM (2012) Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4. *Journal of Cellular Physiology* 227: 3715-3721.
49. Irby RB, Kline CL (2013) Par-4 as a potential target for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17: 77-87.

Figures

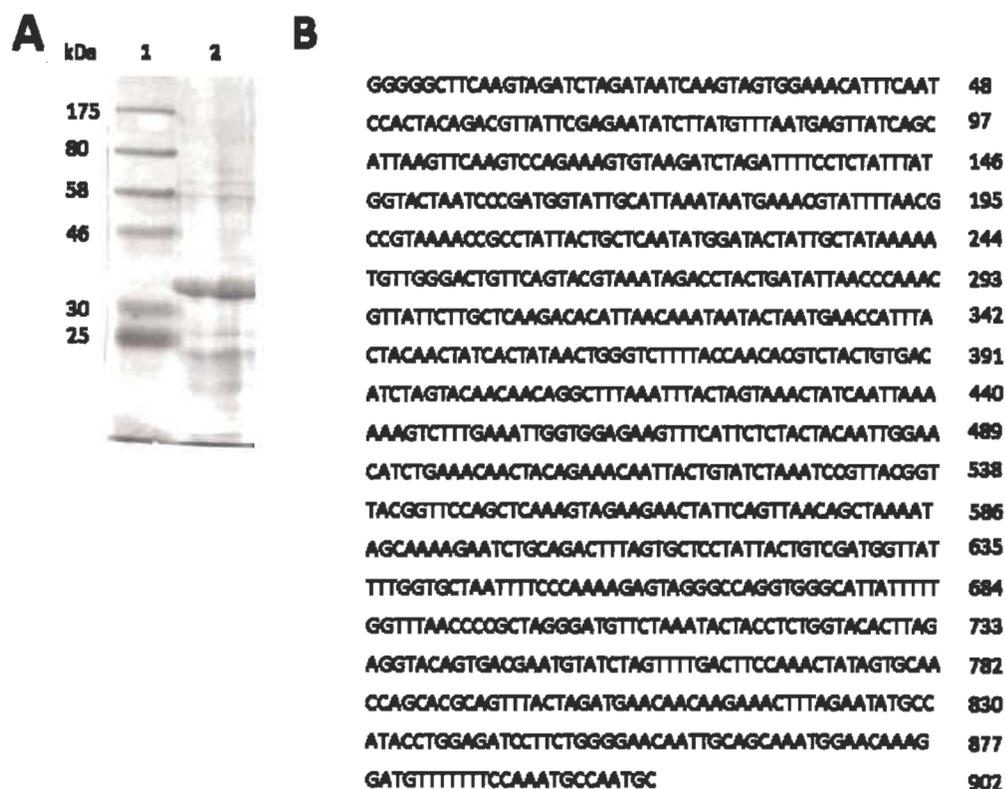


Figure 1 SDS-PAGE analysis of the 37 kDa crystal protein of *Bacillus thuringiensis* 4R2 after Coomassie blue staining. Lane 1 represent the molecular marker and lane 2 the solubilized pro-parasporin-2Aa1. (B) Nucleotides sequence of the PS2Aa1 obtained with Bt4R2-2F and Bt4R2-1R primers.

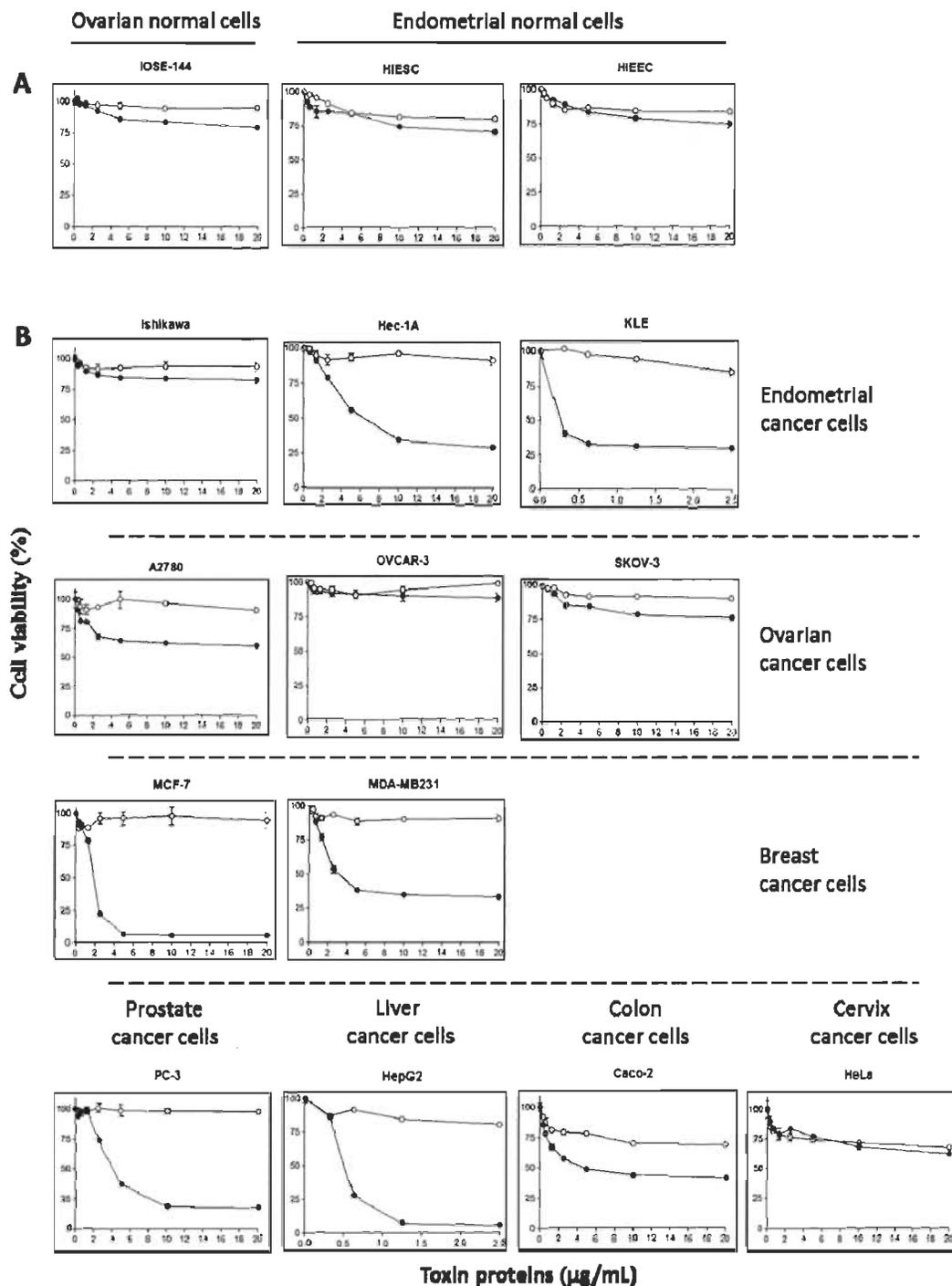


Figure 2 Cytocidal activities of *Bt* 4R2 toxin proteins. Normal cultured human cells (A) and cancer cultured human cells (B) (2×10^4 cells) were preincubated at 37°C for 20 h, then the toxin treated with trypsin (\circ) and proteinase K (\bullet) was added (final concentrations, $0.3 \mu\text{g/mL}$ to $20 \mu\text{g/mL}$) further incubated for 24 h. Cell proliferation was assayed using MTT.

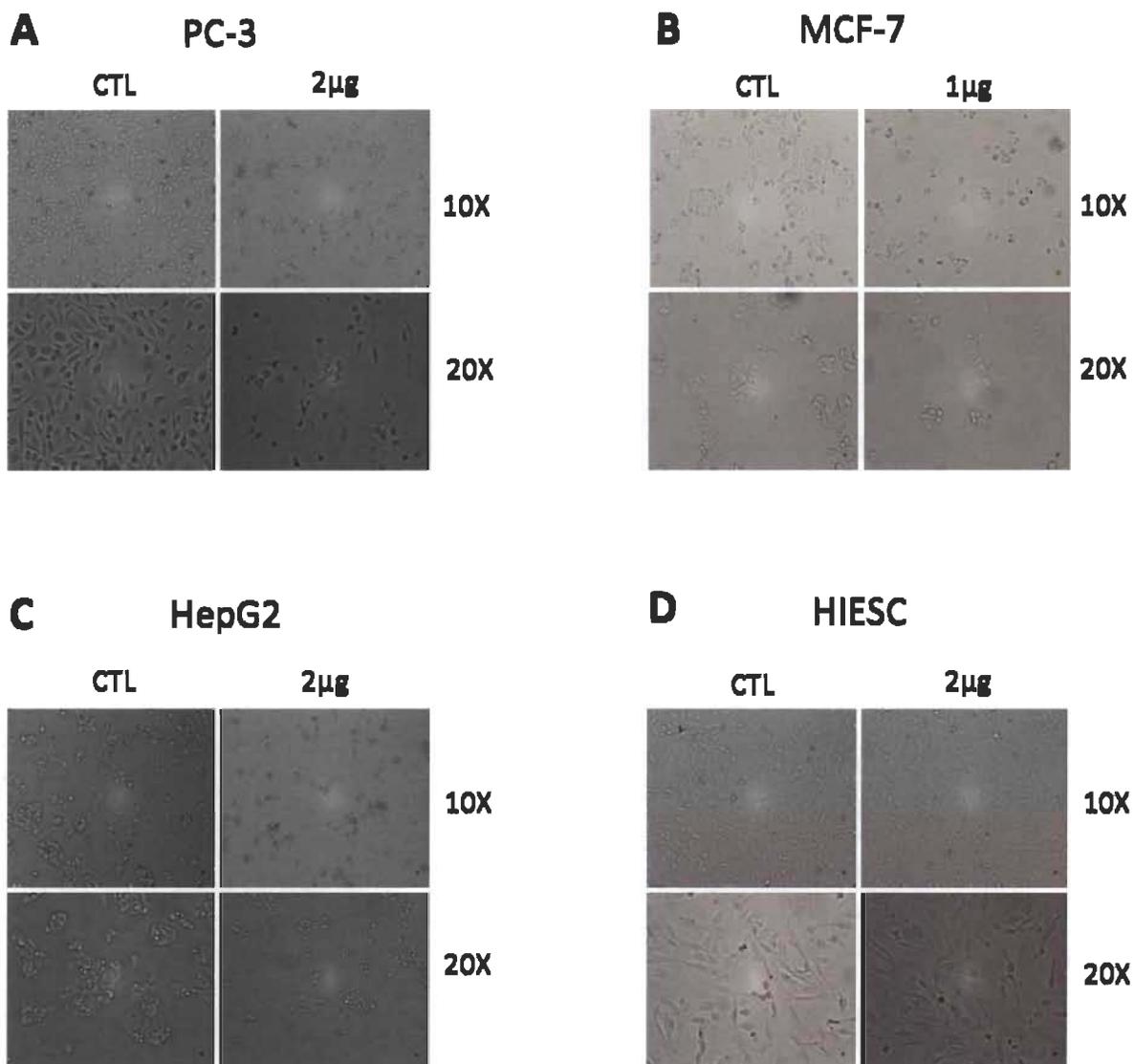


Figure 3 Morphological characteristics of cells following *Bt* 4R2 toxin proteins treatment. PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with 1 μ g/mL or 2 μ g/mL *Bt* 4R2 toxin proteins for 24 h. After 24 hours treatment, the cells were observed with a light microscope at a magnification of 10X and 20X. Results shown are representative of three independent experiments.

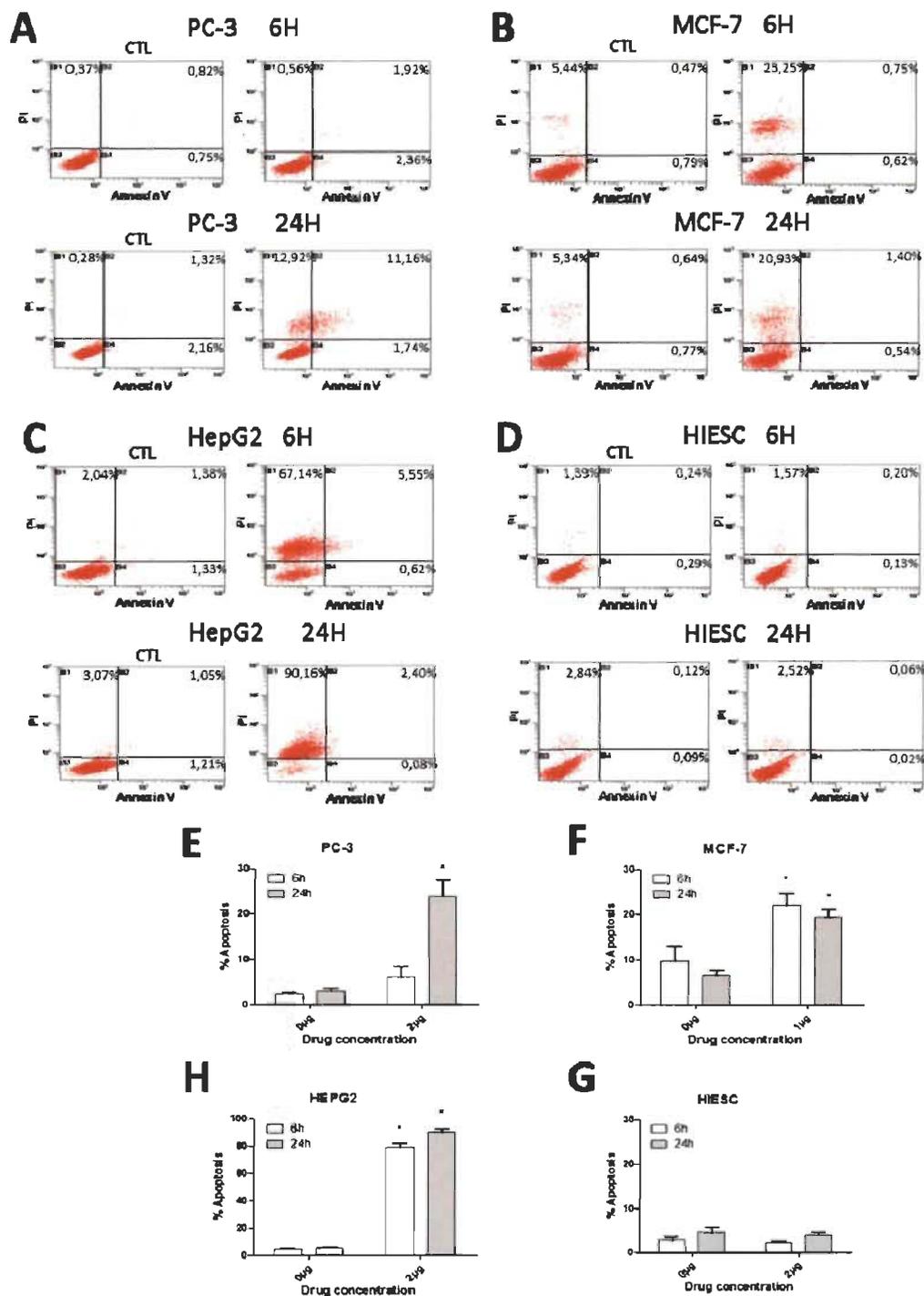


Figure 4 *Bt* 4R2 toxin proteins induce apoptosis in human cancer cells. PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with *Bt* 4R2 toxin proteins (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) or 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A,C,D)) for 24 h. Annexin V and PI staining was detected by FACS analysis. Results are mean \pm S.E.M. of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with corresponding mock-treated cells.

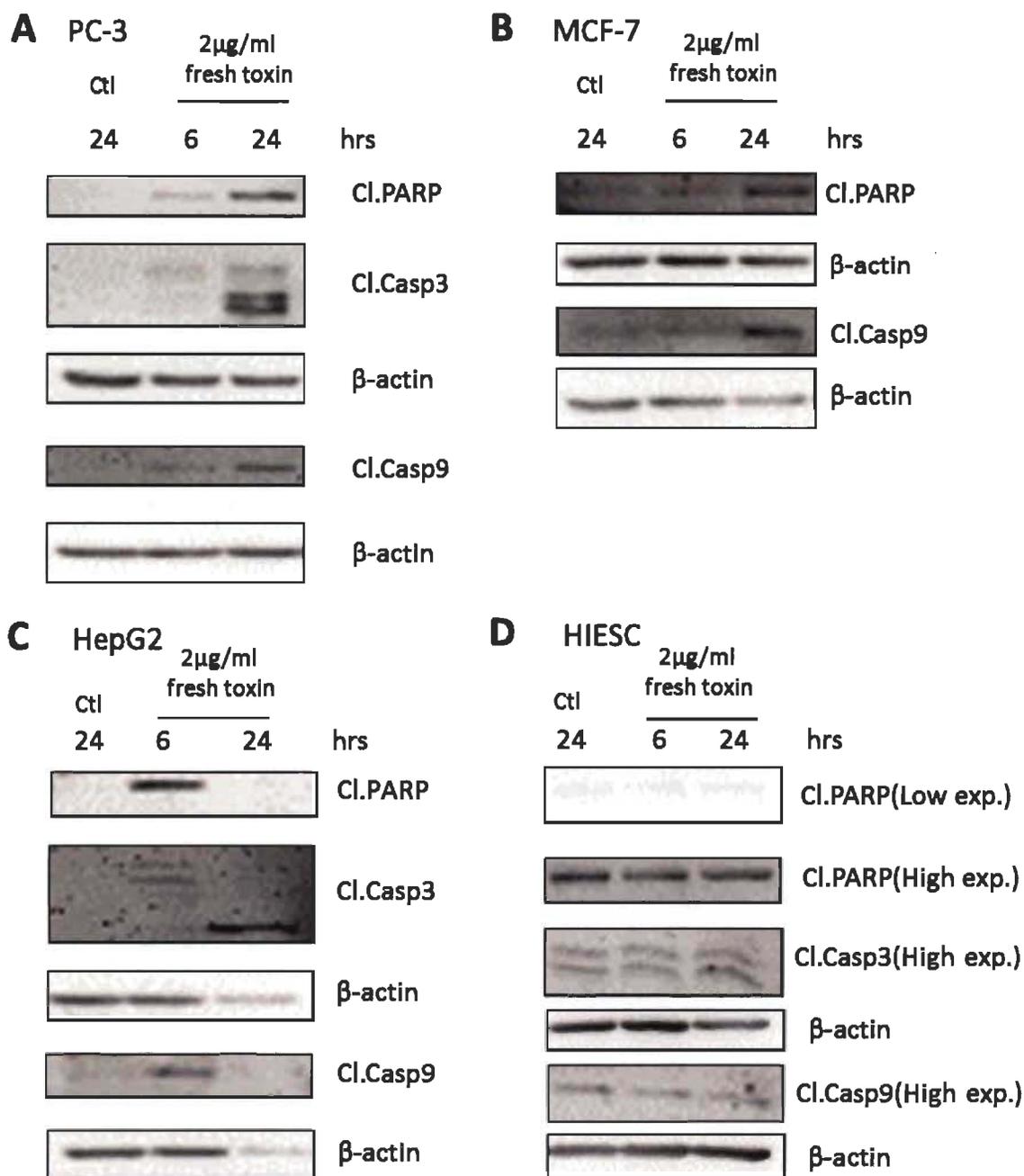


Figure 5 *Bt* 4R2 toxin proteins activates apoptosis mechanisms in human cancer cells. PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with *Bt* 4R2 toxin proteins (1-2 μ g/mL) for 6 h and 24 h. The levels of apoptosis-specific cleaved proteins Caspase-3, Caspase-9 and PARP were determined in treated cells using western blot analysis. The MCF-7 (B) cells are Caspase-3 deficient. β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

PC-3 cancer cells

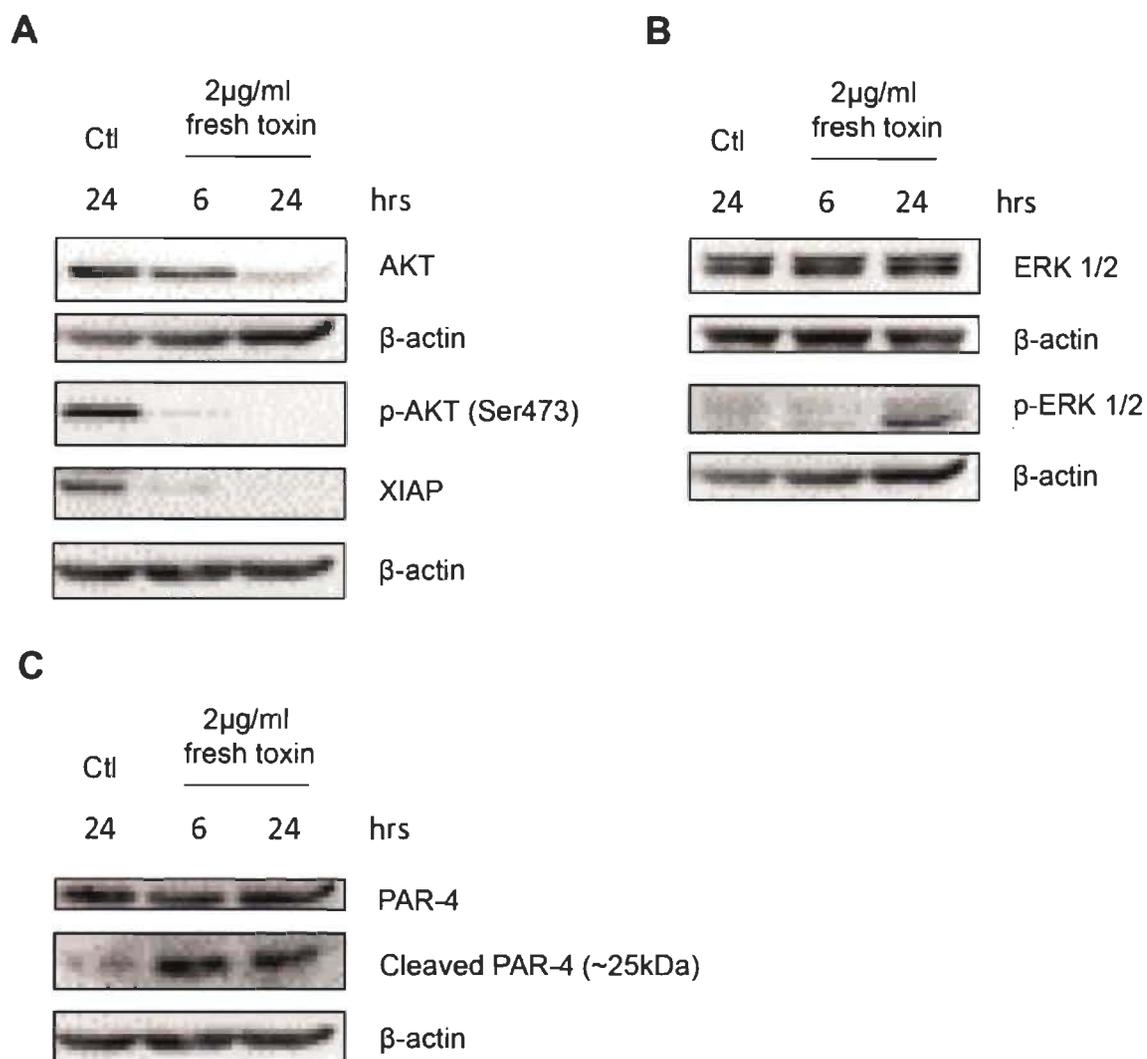


Figure 6 *Bt* 4R2 toxin proteins regulates various survival pathways in PC-3 cancer cells. PC-3 cancer cells were treated with *Bt* 4R2 toxin proteins (2 μ g/mL) for 6 h and 24 h. (A) p13K/AKT pathway protein (B) ERK and (C) PAR-4 protein levels were determined in treated cells using western blot analysis. B-actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

CHAPITRE IX

DISCUSSION

La recherche croissante de nouvelles protéines Cry au cours des dernières décennies a permis l'identification d'un grand nombre de ces protéines et ces dernières sont connues pour leur action insecticide sélective. La découverte récente d'une nouvelle propriété biologique aux protéines Cry non insecticides et non hémolytiques a permis la création d'un nouveau groupe de toxine, les parasporines (Mizuki, Ohba *et al.*, 1999; Mizuki, Park *et al.*, 2000). Celles-ci ne possèdent pas d'action insecticide, mais plutôt un pouvoir toxique sélectif contre des cellules cancéreuses humaines.

Lors du début du projet de recherche, la souche *B. thuringiensis* M15 contenant la parasporine-1Aa2 (Cry31Aa2) a été utilisée dans le même but que la souche *B. thuringiensis* 4R2 (Jung, Mizuki *et al.*, 2007). L'objectif de départ consistait à démontrer la toxicité de la parasporine de *B. thuringiensis* M15 envers de nouvelles lignées cellulaires cancéreuses (tout particulièrement les cancers féminins) et de démontrer que cette parasporine peut induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses. Cependant, au cours de l'étude de cette parasporine, plusieurs obstacles ont été rencontrés tant au niveau de la solubilisation du cristal protéique qu'au niveau du traitement des cellules cancéreuses. Après plusieurs mois de recherche infructueuse afin de démontrer la toxicité de cette parasporine, le projet de maîtrise a dû être réorienté vers une nouvelle souche de *B. thuringiensis*. Dans cette optique, une revue de littérature exhaustive a permis la sélection de 15 souches susceptibles de contenir une parasporine de petite taille (principalement les sérotypes *shandongiensis* et *dakota*). Après un criblage de ces souches sur des cellules servant à vérifier leur toxicité (HepG2, Caco-2 et HeLa), la nouvelle souche *B. thuringiensis* 4R2 a démontré une toxicité marquée envers les cellules cancéreuses hépatiques (HepG2). Suite à l'obtention de résultats préliminaires prometteurs, la souche *B. thuringiensis* 4R2 contenant une parasporine alors inconnue fût sélectionnée pour la suite du projet en remplacement de la souche

B. thuringiensis M15. Les causes probables de l'échec avec la souche *B. thuringiensis* M15 pourraient venir d'une solubilisation ou d'une activation inadéquate de la parasporine. En bref, les résultats obtenus dans la littérature n'ont pu être reproduits dans notre laboratoire. Quant à elle, la parasporine de la nouvelle souche *B. thuringiensis* 4R2 a démontré une toxicité très similaire à la PS2Aa1, qui est une parasporine bien connue dans la littérature.

Comme mentionné précédemment, la parasporine-2Aa1 provenant initialement de la souche *B. thuringiensis* A1547 est l'une des parasporines les plus étudiées à travers la littérature (Ito, Sasaguri *et al.*, 2004). Malgré son efficacité démontrée à tuer sélectivement des cellules cancéreuses hépatiques (HepG2) et des cellules leucémiques T (MOLT-4 et Jurkat), les mécanismes d'actions de cette protéine au niveau cellulaire ne sont pas bien connus. Le mécanisme d'action hypothétique décrit jusqu'à maintenant relève d'un type de mort cellulaire ressemblant à de la nécrose. Ce mode d'action invoque la formation de pores dans la membrane ainsi qu'un gonflement des cellules résultant à la lyse et à la mort de la celle-ci (Kitada, Abe *et al.*, 2006). Notre étude a permis la découverte de *B. thuringiensis* 4R2, une nouvelle souche que nous avons identifiée comme porteuse de la parasporine-2Aa1. Les travaux de recherche avec cette nouvelle souche ont donc été amorcés dans l'optique principale de démontrer que la PS2Aa1 est capable d'induire l'apoptose chez plusieurs types de cellules cancéreuses jamais testées jusqu'à présent (tout particulièrement les cancers féminins) tout en étant inactive contre des cellules humaines normales. Lors du criblage de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, la PS2Aa1 s'est montré toxique pour plusieurs types de cancers, notamment le cancer du foie, de la prostate, du sein, du colon et de l'utérus. Au cours de l'étude, la PS2Aa1 a aussi confirmé sa capacité à induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses HepG2, MCF-7 et PC-3 tout en étant incapable d'induire l'apoptose chez les cellules normales utérines HIESC. Le but ultime de la démarche était de bien comprendre le mécanisme d'action de cette protéine afin d'éventuellement permettre un traitement anticancéreux moins évasif que les traitements actuels. Dans ce chapitre, il sera question d'un retour sur les résultats obtenus en lien avec ce qu'ils ont permis de réaliser.

9.1 L'identification de la PS2Aa1 chez *B. thuringiensis* 4R2

Les gènes codant pour les protéines Cry de *B. thuringiensis* sont connus pour résider sur des plasmides (de Maagd, Bravo *et al.*, 2001). Ces plasmides peuvent être transférés parmi les espèces de *B. thuringiensis* lors de transferts horizontaux par conjugaison (Glare et O'Callaghan 2000). Puisque les parasporines sont codées par des gènes *cry*, la présence de transferts de parasporines peut survenir. De ce fait, la présence de mêmes parasporines dans diverses régions du globe a déjà été observée, démontrant l'existence de transfert de gènes chez *B. thuringiensis* (Gonzalez, Granados *et al.*, 2011). Pour la PS2Aa1, aucun transfert de gènes n'a été démontré jusqu'à présent. Cependant, les résultats obtenus lors de la présente recherche tendent à conclure à un transfert de plasmides contenant le gène codant pour la PS2Aa1 au cours de l'évolution. L'analyse BLAST de la séquence nucléotidique de la parasporine de *B. thuringiensis* 4R2 (905pb) a démontré une homologie de 100 % avec la séquence nucléotidique de la protéine Cry46Aa1 (PS2Aa1). La séquence obtenue en laboratoire de 905pb couvre entièrement la séquence nucléotidique de la PS2Aa1 sous sa forme active, c'est-à-dire clivée par la protéinase K. Toutefois, la séquence nucléotidique de la protéine complète (1017pb) n'a pu être obtenue avec la technique utilisée. Une analyse sur gel SDS-PAGE de parasporine de *B. thuringiensis* 4R2 solubilisée a permis la visualisation d'une protéine de 37kDa. Cette protéine correspond au poids moléculaire de la PS2Aa1 provenant de la souche *B. thuringiensis* A1547. L'homologie de la séquence obtenue, jumelée à la présence de la protéine solubilisée sur gel SDS-PAGE tendent à démontrer que la souche *B. thuringiensis* 4R2 possède bel et bien la PS2Aa1 et qu'il y a eu un transfert de gènes entre ces deux souches au cours de l'évolution. Le fait que ces deux souches présentent des morphologies différentes sur gélose tendent aussi à démontrer que ces souches sont différentes mais qu'elles partagent la même parasporine. L'obtention de la séquence nucléotidique complète du gène de la PS2Aa1 de *B. thuringiensis* 4R2 pourrait s'avérer utile afin de conclure avec certitude à cette hypothèse.

9.2 La toxicité sélective de la PS2Aa1

Comme il a été mentionné précédemment, la PS2Aa1, originalement de la souche *B. thuringiensis* A1547, est connue pour être toxique pour les cellules cancéreuses lorsqu'activée par la protéinase K (Ito, Sasaguri *et al.*, 2004). Au cours de nos travaux de recherche, il a d'abord été démontré que la PS2Aa1 nécessite une activation par la protéinase K pour être toxique pour les cellules cancéreuses. Pour ce faire, l'activité toxique de la PS2Aa1 a été testée chez les cellules cancéreuses et normales suite à un clivage avec la protéinase K. Ces mêmes expériences ont également été réalisées avec un clivage par la trypsine. Les résultats ont démontrés que la PS2Aa1 possède une toxicité pour les cellules cancéreuses lorsque clivée par la protéinase K, mais demeure inactive lorsque clivée par la trypsine. C'est donc dire que la PS2Aa1 nécessite un clivage spécifique dans sa séquence d'acides aminés afin de devenir toxique pour les cellules cancéreuses. Chez les insectes, les protéines Cry nécessitent eux aussi d'être digérées par une protéase spécifique afin de devenir toxique pour l'hôte (Haider, Knowles *et al.*, 1986). Le clivage aléatoire d'une protéine Cry dans des endroits spécifiques de ses trois domaines peut notamment influencer sa capacité à former des pores dans la membrane et sa capacité de liaison aux cellules (Oppert, Kramer *et al.*, 1997; Miranda, Zamudio *et al.*, 2001). À la lumière de ces études, il est raisonnable de penser que dans le cas de la PS2Aa1, la trypsine doit cliver la protéine dans des endroits clés indispensables à sa liaison ou à son activité toxique tandis que la protéinase K aide à la formation d'une toxine stable et efficace. Une analyse des sites de coupures de la trypsine dans la protéine avec un spectromètre de masse (MALDI-TOF) pourrait s'avérer utile afin de déterminer les domaines qui sont clivés par cette protéase.

La parasporine de la souche *B. thuringiensis* 4R2 s'est montrée toxique pour les cellules HepG2 et d'autres lignées cellulaires cancéreuses PC-3 (cancer de la prostate), MCF-7 (cancer du sein), MDA-MB231 (cancer du sein), KLE (cancer de l'utérus), Hec-1A (cancer de l'utérus) et du colon (Caco-2). Toutefois, la parasporine n'a montré aucune toxicité envers les cellules normales ovariennes (IOSE-144) et utérines (HIESC et HIEEC). Les protéines Cry de *B. thuringiensis* sont connues comme étant des protéines nécessitant une liaison à un récepteur afin d'entraîner une toxicité sélective

chez les insectes (Van Rie, Jansens *et al.*, 1990). En se basant sur ce modèle et sur la spécificité de la PS2Aa1, ce même mécanisme semblerait être impliqué chez les cellules cancéreuses. En effet, la PS2Aa1 serait vraisemblablement capable de se lier aux cellules cancéreuses via un ou des récepteurs spécifiques et ces récepteurs pourraient ne pas être présents chez les cellules normales. À ce jour, aucun récepteur de parasporine n'a été identifié chez les cellules cancéreuses. Par contre, chez les insectes, les récepteurs de la famille des cadhérines sont souvent responsables de la liaison entre la cellule et la protéine Cry (Pigott and Ellar 2007). La possibilité qu'un ou des récepteurs cadhérines soient impliqués dans la liaison de la PS2Aa1 avec les cellules cancéreuses n'est pas exclue. Les protéines ancrées GPI ont souvent elles aussi été rapportées en tant qu'acteur important dans la liaison et dans la toxicité des protéines Cry (Ibrahim, Griko *et al.*, 2010).

Une étude antérieure a démontré que la PS2Aa1 nécessite les protéines ancrées GPI afin de démontrer une toxicité chez l'hôte, mais encore une fois, aucune de ces protéines GPI ancrées n'a été identifiée (Kitada, Abe *et al.*, 2009). Ces protéines ont aussi été citées dans plusieurs études comme étant partie intégrante du mécanisme d'action des protéines Cry en aidant la formation de pores dans les cellules ou en déclenchant une cascade de signaux intracellulaires (Zhang, Candas *et al.*, 2006; Pigott and Ellar, 2007; Bravo, Gomez *et al.*, 2013). Dans les modèles d'études basés sur les insectes, la famille des aminopeptidases représente les protéines ancrées GPI les plus souvent retrouvées dans l'interaction cellules et protéines Cry. La confirmation de la présence de ces aminopeptidases chez les cellules cancéreuses pourrait être une voie d'étude intéressante afin de déterminer laquelle des protéines ancrées GPI est responsable de cette interaction. Somme toute, une analyse approfondie non seulement des protéines GPI impliquées dans la toxicité, mais aussi du récepteur engagé dans la spécificité de la PS2Aa1 permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de cette parasporine. Il serait intéressant de savoir si seule la liaison au récepteur ou seule la liaison à une protéine ancrée GPI est suffisante afin d'obtenir une toxicité. De par sa conformation, la PS2Aa1 possède des similitudes avec l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophilia* et de l'alpha toxine de *Clostridium perfringens*, deux protéines formant des

pores et qui requiert les protéines GPI ancrées pour être toxiques (Diep, Nelson *et al.*, 1998; Akiba, Abe *et al.*, 2009). Ces comparaisons permettent de croire que la PS2Aa1 peut former des pores dans la membrane des cellules cancéreuses. C'est d'ailleurs ce mode d'action qui a été privilégié dans les études antérieures, c'est-à-dire la formation de pores menant à la perméabilisation de la membrane, au gonflement de la cellule et ultimement à sa lyse (Kitada, Abe *et al.*, 2006). Dans cette étude, aucun gonflement de cellule n'a été observé, mais plutôt un rétrécissement des cellules, ce qui porte à croire que la PS2Aa1 peut induire l'apoptose via la formation de petits pores permettant seulement le passage d'ions dans la cellule. L'entrée d'ions, comme par exemple le calcium, peut induire l'apoptose de plusieurs façons (Giorgi, Romagnoli *et al.*, 2008). Ce mode d'action est d'ailleurs utilisé par l'alpha toxine de *Staphylococcus aureus* (Jonas, Walev *et al.*, 1994). Le manque d'information au niveau de la liaison PS2Aa1 et de son récepteur au niveau de la cellule afin de découvrir comment l'apoptose est induite nous a poussés vers l'investigation des mécanismes d'apoptose.

9.3 La PS2Aa1 induit l'apoptose chez les cellules cancéreuses

Les protéines Cry de *B. thuringiensis* ne sont pas reconnues comme étant des protéines pouvant induire l'apoptose chez l'insecte (Schnepf, Crickmore *et al.*, 1998). Par contre, chez les parasporines, il existe deux protéines pouvant induire l'apoptose. La première est la parasporine-1Aa1 qui peut induire l'apoptose via une entrée de calcium dans la cellule découlant d'une liaison de la parasporine avec un récepteur couplé à une protéine G (Katayama, Kusaka *et al.*, 2007). Dans le second cas, une parasporine de taille similaire à la PS2Aa1 provenant de la souche *B. thuringiensis* A1519 induit l'apoptose par l'activation de la caspase-3 et de la caspase-9 via le relargage du cytochrome c par la mitochondrie (Amano, Yamagiwa *et al.*, 2005). Dans l'optique de démontrer de l'apoptose chez les trois lignées cellulaires cancéreuses, un décompte des cellules en apoptose par cytométrie en flux avec marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium a été fait. L'annexine V est une protéine utilisée en cytométrie en flux pour sa forte affinité pour les phosphatidylsérines qui sont externalisées hors de la membrane plasmique lors de l'apoptose (Koopman, Reutelingsperger *et al.*, 1994; Kroemer,

Galluzzi *et al.*, 2009). Les résultats ont démontrés une augmentation significative de cellules en apoptose après un traitement avec la PS2Aa1, signifiant que cette parasporine est capable d'induire l'apoptose.

La présence dans la cellule de la caspase-9 clivée est une caractéristique de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (Elmore 2007). De plus, dans une étude antérieure, il a été démontré que lorsque les cellules sont traitées avec la PS2Aa1, il y a la présence d'un relargage du cytochrome c par la mitochondrie (Kitada, Abe *et al.*, 2006). Dans le cas des trois lignées sensibles (HepG2, MCF-7 et PC-3), il est raisonnable de penser qu'il y a un relargage du cytochrome c dans chacune d'elles puisqu'il permet la formation de l'apoptosome (Wong, 2011). Dans ces trois lignées, la présence de la caspase-8 clivée n'a pas été détectée, ce qui renforce l'hypothèse de la voie intrinsèque puisque cette caspase est reliée à la voie extrinsèque (Wong, 2011). La voie intrinsèque peut aussi être activée par le clivage de la protéine Bid par la caspase-8 active (Tang, Lahti *et al.*, 2000). Dans le cas présent, compte tenu que la caspase-8 n'est pas clivée, cette voie d'activation peut être exclue, ce qui oriente encore une fois les résultats vers l'implication de la voie intrinsèque chez les cellules cancéreuses. Cette voie peut aussi être activée par d'autres bactéries pathogènes et non seulement par les parasporines (Choi, Lee *et al.*, 2005). Malgré la confirmation de l'implication de la voie intrinsèque, le mécanisme exact par lequel est déclenchée cette voie demeure inconnue. La formation de petits pores laissant passer les ions et la présence d'un récepteur couplé à une protéine G menant à une augmentation de calcium à l'intérieur de la cellule sont les hypothèses les plus plausibles. La liaison d'une parasporine avec un récepteur couplé à une protéine G a déjà été démontrée chez la PS1Aa1 et ce mode d'action a aussi été décrit dans la littérature pour les protéines Cry (Katayama, Kusaka *et al.*, 2007; Zhang, Candas *et al.*, 2006). Afin de confirmer hors de tout doute l'induction de l'apoptose, plusieurs voies de signalisations cellulaires ont aussi été testées sur les cellules cancéreuses PC-3.

Parmi les voies de signalisation qui ont été testées, on retrouve la protéine kinase B (AKT), la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP), les « extracellular signal-regulated kinases » (ERK 1/2) et la « prostate apoptosis response-4 » (PAR-4). Tout d'abord, AKT est surtout connue pour son implication dans la survie cellulaire, la prolifération cellulaire, mais aussi dans l'inactivation de l'apoptose via le blocage des protéines Bad et de la caspase-9 (Vara, Casado *et al.*, 2004). Quant à elles, les protéines XIAP sont connues pour inhiber les caspases-3, -7 et -9 pour ainsi bloquer l'apoptose (Deveraux and Reed 1999). Lors des traitements avec la PS2Aa1, la forme active de ces deux protéines diminuait en fonction du temps, ce qui suggère une induction d'apoptose par la toxine. La présence vérifiée de la caspase-3 et de la caspase-9 permet de conclure à cette hypothèse. Pour ce qui est de la protéine ERK1/2, celle-ci peut être stimulée lors de l'induction de l'apoptose par des stimuli extérieurs (Cagnol et Chambard, 2010). Lors du traitement des cellules PC-3 avec la PS2Aa1, nous avons observé une augmentation du niveau de la protéine active ERK1/2, ce qui laisse entrevoir l'induction d'apoptose par la toxine. PAR-4, quant à elle, est une protéine suppresseur de tumeur qui est clivée par la caspase-3 lors de l'apoptose (Chaudhry, Singh *et al.*, 2012). Les résultats obtenus ont permis de constater la présence de PAR-4 clivée après un traitement avec la PS2Aa1, confirmant ainsi l'apoptose dans les cellules cancéreuses PC-3.

Somme toute, la visualisation des changements morphologiques des cellules, le décompte des cellules en apoptose avec la cytométrie en flux, l'analyse par western blot des caspases et de la PARP et l'analyse par western blot de la régulation des voies de signalisation ont permis de confirmer que l'apoptose est bel et bien déclenchée chez les cellules cancéreuses et non chez les cellules normales lorsqu'elles sont mises en contact avec la PS2Aa1.

9.4 Perspectives de recherche

Dans un premier temps, l'échec vécu avec la souche initiale *B. thuringiensis* M15 a permis d'observer les limites de la purification et de la solubilisation des cristaux

protéiques. La méthode utilisée dans l'article scientifique présente une faille puisqu'elle ne permet pas d'obtenir des cristaux protéiques purs lors de la solubilisation. Afin d'améliorer cet aspect, il serait intéressant de se tourner vers des méthodes comme la séparation par gradient de sucrose ou par le clonage de la parasporine dans un vecteur d'expression (Goodman, Gottfried *et al.*, 1967; Ito, Sasaguri *et al.*, 2004). Ces deux méthodes sont couramment utilisées dans la littérature afin d'obtenir une purification efficace des cristaux protéiques. La mise au point de telles techniques permettrait de résoudre le problème rencontré dans la présente étude et aussi d'obtenir des parasporines plus efficaces.

La séquence de la PS2Aa1 obtenue en laboratoire couvre 905 nucléotides sur 1017 de la séquence codante du gène. Afin de confirmer hors de tout doute une homologie de 100 % avec la séquence complète du gène de la souche A1547, les portions de séquences manquantes au début et à la fin du gène devront être obtenues. Pour ce faire, nous pourrions inverser les amorces citées dans l'article scientifique et faire séquencer les nucléotides compris entre ces deux amorces.

Les résultats obtenus au cours du projet démontrent que la PS2Aa1 possède une activité apoptotique sélective envers les cellules cancéreuses. Afin de bien comprendre les événements entre l'interaction de la PS2Aa1 et la cellule cancéreuse, il serait primordial d'identifier le récepteur responsable de cette liaison. Pour ce faire, les recherches pourraient s'orienter d'abord sur les récepteurs souvent utilisés par les protéines Cry comme les aminopeptidases et les cadhérines. Des banques de cellules cancéreuses mutantes pourront ainsi être développées en inactivant les gènes codant pour ces récepteurs par ARN silencieux. L'identification du récepteur de la PS2Aa1 permettrait de mieux comprendre par quel chemin la voie intrinsèque est déclenchée lors de l'apoptose et la raison de sa spécificité.

Pour compléter l'information sur l'interaction de la PS2Aa1 avec la cellule, des expériences pourraient être effectuées afin de savoir où se situe la parasporine lors du traitement des cellules cancéreuses. Le but de ces expériences consiste à vérifier si la

PS2Aa1 entre dans les cellules après l'interaction avec le récepteur ou si la PS2Aa1 reste ancrée dans la membrane tout au long des traitements. Pour ce faire, un anticorps monoclonal pourra être sélectionné et la localisation de la PS2Aa1 pourra se faire par microscopie par immunofluorescence. Des expériences similaires ont déjà été conduites pour la PS2Aa1, mais seulement sur un nombre très limité de lignées cellulaires (Kitada, Abe *et al.*, 2006; Kitada, Abe *et al.*, 2009). L'observation de la localisation de la PS2Aa1 chez les nouvelles lignées cellulaires sensibles à la toxine procurerait de l'information à savoir si la PS2Aa1 se comporte différemment selon le type de cellules.

L'ensemble des travaux supplémentaires décrits ci-haut ont pour but ultime de décortiquer le mécanisme d'action exacte de la PS2Aa1. Les avancées scientifiques présentes dans ce document jumelées à ces travaux pourront aider à cheminer vers des essais *in vivo* chez des modèles murins. Ce genre d'analyse n'a jamais été effectué avec des parasporines, ce qui constituerait une étape majeure dans l'optique de développer ces protéines en tant que molécules anti-cancéreuses.

CHAPITRE X

CONCLUSION

Les travaux de recherche initialement destinés à la parasporine de la souche *B. thuringiensis* M15 n'ont pas donné les résultats escomptés. Cet échec a permis la découverte de la nouvelle souche *B. thuringiensis* 4R2, laquelle a été identifiée comme étant porteuse de la PS2Aa1. Les travaux portant sur le criblage de différentes lignées cellulaires cancéreuses et normales ont permis de constater que cette parasporine possède une toxicité sélective pour les lignées cellulaires cancéreuses du foie, de la prostate, du colon, du sein et de l'utérus.

L'ensemble des expériences réalisées en lien avec l'apoptose sont en contradiction avec les études précédentes et nous permettent de confirmer que la PS2Aa1 induit l'apoptose chez les cellules cancéreuses et non chez les cellules normales. Parmi ces expériences se retrouve l'observation d'un rétrécissement des cellules cancéreuses, une caractéristique propre à l'apoptose. L'analyse de protéines indicatrices de la présence d'apoptose tels que les caspases (3 et 9) et la PARP, jumelé à l'étude de la régulation des voies de signalisation AKT, XIAP, PAR-4 et ERK ½ ont confirmé l'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses par la PS2Aa1. Ces caractéristiques n'ont pas été retrouvées chez les cellules normales.

Finalement, cette étude a permis de mettre en évidence une nouvelle protéine anticancéreuse prometteuse (provenant de la nouvelle souche *B. thuringiensis* 4R2) qui est capable d'induire l'apoptose de façon sélective chez les cellules cancéreuses. Cette voie de mort cellulaire est aussi empruntée par plusieurs médicaments anticancéreux. De prochaines études ayant pour but de bien comprendre le fonctionnement de cette parasporine au niveau des récepteurs de la membrane et de la voie exacte par laquelle elle déclenche l'apoptose permettrait de cheminer dans le but ultime de développer un traitement anti cancer plus sélectif et moins invasif.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelhameed, A. and R. Landen (1994). "Studies on *Bacillus-Thuringiensis* Strains Isolated from Swedish Soils - Insect Toxicity and Production of *Bacillus-Cereus* Diarrheal-Type Enterotoxin." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10(4): 406-409.
- Akiba, T., Y. Abe, *et al.* (2009). "Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells." *Journal of molecular biology* 386(1): 121-133.
- Amano, H., M. Yamagiwa, *et al.* (2005). "A novel 29-kDa crystal protein from *Bacillus thuringiensis* induces caspase activation and cell death of jurkat T cells." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69(11): 2063-2072.
- Andrews, R. E., Jr., M. M. Bibilos, *et al.* (1985). "Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*." *Applied and environmental microbiology* 50(4): 737-742.
- Aronson, A. (2002). "Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59(3): 417-425.
- Beebee, T., A. Korner, *et al.* (1972). "Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei." *The Biochemical journal* 127(4): 619-634.
- Bond, R. P., C. B. Boyce, *et al.* (1969). "A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner." *The Biochemical journal* 114(3): 477-488.
- Brar, S. K., M. Verma, *et al.* (2007). "*Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism." *Process Biochemistry* 42(5): 773-790.
- Bravo, A., I. Gomez, *et al.* (2004). "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1667(1): 38-46.
- Bravo, A., I. Gomez, *et al.* (2013). "Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity." *Microbial biotechnology* 6(1): 17-26.

- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, *et al.* (2011). "*Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide." *Insect biochemistry and molecular biology* 41(7): 423-431.
- Brousseau, R., A. Saint-Onge, *et al.* (1993). "Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains." *Applied and environmental microbiology* 59(1): 114-119.
- Budarina, Z. I., M. A. Sinev, *et al.* (1994). "Hemolysin II is more characteristic of *Bacillus thuringiensis* than *Bacillus cereus*." *Archives of microbiology* 161(3): 252-257.
- Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, *et al.* (1980). "Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*." *Critical reviews in microbiology* 8(2): 147-204.
- Cagnol, S. and J. C. Chambard (2010). "ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence." *The FEBS journal* 277(1): 2-21.
- Carlson, C. R., D. A. Caugant, *et al.* (1994). "Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains." *Applied and environmental microbiology* 60(6): 1719-1725.
- Chaudhry, P., M. Singh, *et al.* (2012). "Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation." *Molecular and cellular biology* 32(4): 826-839.
- Chehimi, S., F. Delalande, *et al.* (2007). "Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*." *Canadian journal of microbiology* 53(2): 284-290.
- Chen, M. L. and H. Y. Tsen (2002). "Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites." *Journal of applied microbiology* 92(5): 912-919.
- Choi, C. H., E. Y. Lee, *et al.* (2005). "Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells." *Cellular microbiology* 7(8): 1127-1138.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" (2014) <http://www.btnomenclature.info/>

- Crickmore, N., D. R. Zeigler, *et al.* (1998). "Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins." *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR 62(3): 807-813.
- de Barjac, H. and A. Bonnefoi (1967). "[Classification of strains of *Bacillus thuringiensis*]." *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 264(14): 1811-1813.
- de la Vega, L. M., J. E. Barboza-Corona, *et al.* (2006). "Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi." *Canadian journal of microbiology* 52(7): 651-657.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, *et al.* (2001). "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world." *Trends in genetics*: TIG 17(4): 193-199.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins-suppressors of apoptosis." *Genes & development* 13(3): 239-252.
- Diep, D. B., K. L. Nelson, *et al.* (1998). "Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin." *Journal of Biological Chemistry* 273(4): 2355-2360.
- Drobniewski, F. A. (1994). "The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents." *The Journal of applied bacteriology* 76(2): 101-109.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology* 35(4): 495-516.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, *et al.* (1996). "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(11): 5389-5394.
- Favret, M. E. and A. A. Yousten (1989). "Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*." *Journal of Invertebrate Pathology* 53(2): 206-216.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infection and immunity* 73(4): 1907-1916.
- Fisher, R. and L. Rosner (1959). "Insecticide Safety - Toxicology of the Microbial Insecticide, Thuricide." *Journal of agricultural and food chemistry* 7(10): 686-688.

- Ford, C. H., V. J. Richardson, *et al.* (1989). "Comparison of tetrazolium colorimetric and [3H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 24(5): 295-301.
- Gaviria Rivera, A. M. and F. G. Priest (2003). "Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR." *Systematic and applied microbiology* 26(2): 254-261.
- Giorgi, C., A. Romagnoli, *et al.* (2008). "Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death." *Current molecular medicine* 8(2): 119-130.
- Glare, T. R., O'Callaghan, M. (2000) "*Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety" Chichester ; New York : John Wiley, U.S.A., pp. 2-80
- Goldberg, L. J. and J. Margalit (1977). "Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles-Sergentii*, *Uranotaenia-Unguiculata*, *Culex-Univitattus*, *Aedes-Aegypti* and *Culex-Pipiens*." *Mosquito News* 37(3): 355-361.
- Gomez, I., J. Sanchez, *et al.* (2002). "Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin." *FEBS letters* 513(2-3): 242-246.
- Gonzalez, E., J. C. Granados, *et al.* (2011). "Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain." *Current microbiology* 62(5): 1643-1648.
- Goodman, N. S., Gottfried, R. J., *et al.* (1967). "Biphasic System for Separation of Spores and Crystals of *Bacillus Thuringiensis*." *Journal of Bacteriology* 94(2): 485-&.
- Green, M., M. Heumann, *et al.* (1990). "Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985-86." *American journal of public health* 80(7): 848-852.
- Haider, M. Z., B. H. Knowles, *et al.* (1986). "Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases." *European journal of biochemistry / FEBS* 156(3): 531-540.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley (1989). "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*." *Microbiological reviews* 53(2): 242-255.
- Honda, T., A. Shiba, *et al.* (1991). "Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*." *Fems Microbiology Letters* 63(2-3): 205-209.

- Huber, M., E. Cabib, *et al.* (1991). "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(7): 2807-2810.
- Ibrahim, M. A., N. Griko, *et al.* (2010). "*Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective." *Bioengineered bugs* 1(1): 31-50.
- Ito, A., Y. Sasaguri, *et al.* (2004). "A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells." *The Journal of biological chemistry* 279(20): 21282-21286.
- Jonas, D., I. Walev, *et al.* (1994). "Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation." *Infection and immunity* 62(4): 1304-1312.
- Jung, Y. C., E. Mizuki, *et al.* (2007). "Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells." *Journal of applied microbiology* 103(1): 65-79.
- Kasibhatla, S. and B. Tseng (2003). "Why target apoptosis in cancer treatment?" *Molecular cancer therapeutics* 2(6): 573-580.
- Katayama, H., Y. Kusaka, *et al.* (2007). "Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells." *The Journal of biological chemistry* 282(10): 7742-7752.
- Katayama, H., H. Yokota, *et al.* (2005). "Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*." *Journal of biochemistry* 137(1): 17-25.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, *et al.* (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer* 26(4): 239-257.
- Kitada, S., Y. Abe, *et al.* (2009). "Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells." *Toxicology* 264(1-2): 80-88.
- Kitada, S., Y. Abe, *et al.* (2006). "Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*." *The Journal of biological chemistry* 281(36): 26350-26360.

- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, *et al.* (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* 84(5): 1415-1420.
- Krieg, A., A. M. Huger, *et al.* (1983). "*Bacillus-Thuringiensis* Var Tenebrionis, a New Pathotype Effective against Larvae of Coleoptera." *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie-Journal of Applied Entomology* 96(5): 500-508.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, *et al.* (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell death and differentiation* 16(1): 3-11.
- Krysko, D. V., T. Vanden Berghe, *et al.* (2008). "Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis." *Methods* 44(3): 205-221.
- Kumar, N. S. and G. Venkateswerlu (1997). "Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki." *Biochemistry and molecular biology international* 42(5): 901-908.
- Lambert, B. and M. Peferoen (1992). "Insecticidal Promise of *Bacillus-Thuringiensis*." *Bioscience* 42(2): 112-122.
- Lecadet, M. M., E. Frachon, *et al.* (1999). "Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*." *Journal of applied microbiology* 86(4): 660-672.
- Lee, M. K., F. S. Walters, *et al.* (2003). "The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin." *Applied and environmental microbiology* 69(8): 4648-4657.
- Levinson, B. L., K. J. Kasyan, *et al.* (1990). "Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography." *Journal of Bacteriology* 172(6): 3172-3179.
- Mcclintock, J. T., C. R. Schaffer, *et al.* (1995). "A Comparative Review of the Mammalian Toxicity of *Bacillus Thuringiensis*-Based Pesticides." *Pesticide Science* 45(2): 95-105.
- Mesrati, L. A., S. Tounsi, *et al.* (2005). "Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid." *Fems Microbiology Letters* 244(2): 353-358.
- Miller, S. (1992). "20th-Century Insect Control." *Agricultural Research* 40(7): 4-9.

- Miranda, R., F. Z. Zamudio, *et al.* (2001). "Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation." *Insect biochemistry and molecular biology* 31(12): 1155-1163.
- Mizuki, E., M. Ohba, *et al.* (1999). "Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells." *Journal of applied microbiology* 86(3): 477-486.
- Mizuki, E., Y. S. Park, *et al.* (2000). "Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7(4): 625-634.
- Nagamatsu, Y., S. Okamura, *et al.* (2010). "Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74(3): 494-498.
- Ohba, M., E. Mizuki, *et al.* (2009). "Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*." *Anticancer research* 29(1): 427-433.
- Oppert, B., K. J. Kramer, *et al.* (1997). "Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins." *The Journal of biological chemistry* 272(38): 23473-23476.
- Pigott, C. R. and D. J. Ellar (2007). "Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity." *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 71(2): 255-281.
- Rai, A. R., S. U. Meshram, *et al.* (2009). "Optimization of RAPD-PCR for discrimination of different strains of *Bacillus thuringiensis*." *Romanian Biotechnological Letters* 14(2): 4308-4313.
- Rasko, D. A., M. R. Altherr, *et al.* (2005). "Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms." *FEMS microbiology reviews* 29(2): 303-329.
- Rodenhouse, N. L. and R. T. Holmes (1992). "Results of Experimental and Natural Food Reductions for Breeding Black-Throated Blue Warblers." *Ecology* 73(1): 357-372.
- Samples, J. R. and H. Buettner (1983). "Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*)." *American journal of ophthalmology* 95(2): 258-260.
- Sampson, M. N. and G. W. Gooday (1998). "Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects." *Microbiology* 144 (Pt 8): 2189-2194.

- Sanahuja, G., R. Banakar, *et al.* (2011). "*Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications." *Plant biotechnology journal* 9(3): 283-300.
- Schnepf, E., N. Crickmore, *et al.* (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 62(3): 775-806.
- Sebesta, K. and K. Horska (1968). "Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*." *Biochimica et biophysica acta* 169(1): 281-282.
- Sebesta, K. and K. Horska (1970). "Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*." *Biochimica et biophysica acta* 209(2): 357-376.
- Siegel, J. P. (2001). "The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides." *Journal of Invertebrate Pathology* 77(1): 13-21.
- Siegel, J. P. and J. A. Shaddock (1990). "Clearance of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* from mammals." *Journal of Economic Entomology* 83(2): 347-355.
- Silo-Suh, L. A., B. J. Lethbridge, *et al.* (1994). "Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85." *Applied and environmental microbiology* 60(6): 2023-2030.
- Silo-Suh, L. A., E. V. Stabb, *et al.* (1998). "Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*." *Current microbiology* 37(1): 6-11.
- Soberon, M., J. A. Lopez-Diaz, *et al.* (2013). "Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms." *Peptides* 41: 87-93.
- Stabb, E. V., L. M. Jacobson, *et al.* (1994). "Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils." *Applied and environmental microbiology* 60(12): 4404-4412.
- Tang, D., J. M. Lahti, *et al.* (2000). "Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis." *The Journal of biological chemistry* 275(13): 9303-9307.
- Tourasse, N. J., E. Helgason, *et al.* (2011). "Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data." *Food microbiology* 28(2): 236-244.

- Vachon, V., R. Laprade, *et al.* (2012). "Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review." *Journal of Invertebrate Pathology* 111(1): 1-12.
- Valero, M., L. A. Hernandez-Herrero, *et al.* (2002). "Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests." *Food microbiology* 19(5): 491-499.
- Van Rie, J., S. Jansens, *et al.* (1990). "Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins." *Applied and environmental microbiology* 56(5): 1378-1385.
- Vara, J. A. F., E. Casado, *et al.* (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." *Cancer Treatment Reviews* 30(2): 193-204.
- Warren, R. E., D. Rubenstein, *et al.* (1984). "*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*: protoxin activation and safety." *Lancet* 1(8378): 678-679.
- Wirth, M. C., G. P. Georghiou, *et al.* (1997). "CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(20): 10536-10540.
- World Health Organization (1999) "Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*" Geneva, Environment health criteria 217, pp. 6-69.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 30: 87.
- Yu, C. G., M. A. Mullins, *et al.* (1997). "The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects." *Applied and environmental microbiology* 63(2): 532-536.
- Zhang, X. B., M. Candas, *et al.* (2006). "A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(26): 9897-9902.