



HAL
open science

Effet des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la *Drosophile*

Rouba Jneid

► **To cite this version:**

Rouba Jneid. Effet des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la *Drosophile*. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6003 . tel-03331644

HAL Id: tel-03331644

<https://theses.hal.science/tel-03331644>

Submitted on 2 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile

Rouba JNEID

Institut Sophia Agrobiotech
UMR INRAe 1355/CNRS 7254/Université Côte d'Azur
Equipe Bioinsecticides, Environnement et Santé (BES)

Présentée en vue de l'obtention du grade de
docteur en Sciences de la vie et de la santé
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Armel GALLET et Dani OSMAN

Soutenue le : 21 Janvier 2021

Devant le jury, composé de :

Dr. Pierre FRENDO, Président du jury,
Université Côte d'Azur

Dr. Julien COLOMBANI, Rapporteur,
Université de Copenhague

Dr. Léopold KURZ, Rapporteur, Université
Aix-Marseille

Dr. Renald DELANOUE, Examineur, IBV,
Nice

Dr. Armel GALLET, Directeur de thèse, ISA

Dr. Dani OSMAN, Codirecteur de thèse, Liban

Résumé

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie sporulante Gram-positif. Elle synthétise des toxines (Cry) entomopathogènes qui sont enfermées dans un cristal au sein de la spore. Les produits *Bt* sont les bioinsecticides les plus efficaces contre les lépidoptères ravageurs de cultures et prédominent en agriculture biologique, occupant 70 % des parts de marché des bioinsecticides. La surface mondiale en agriculture biologique a doublé en 10 ans induisant *de facto* une augmentation de 4% par an de l'utilisation des bioinsecticides. Cette tendance va s'accroître dans les années à venir suite aux incitations nationales et internationales visant à réduire l'utilisation des produits chimiques. Avec cette forte croissance, les populations sont de plus en plus exposées aux bioinsecticides via l'alimentation, ce qui soulève la question de leurs effets potentiels à long terme sur la santé. Le premier organe en contact avec de la nourriture contaminée par les bioinsecticides *Bt* est donc le tube digestif.

Mon projet de thèse s'intéresse aux **conséquences physiopathologiques intestinales liées à l'ingestion chronique de *Bt*** aux doses retrouvées sur les légumes "bio" après traitement en utilisant la drosophile comme modèle. **La drosophile** permet d'identifier les mécanismes physiologiques, cellulaires et génétiques impliqués dans les effets observés. La conservation de ces mécanismes entre la drosophile et les vertébrés permet ensuite de rapidement aborder les problèmes chez les mammifères. J'ai ainsi montré que l'ingestion de bioinsecticides *Btk kurstaki* (*Btk*) aux doses environnementales par des drosophiles adultes induisait sous 24h une apoptose modérée des entérocytes. J'ai montré que cette apoptose est causée par les toxines Cry de *Btk*. Qui dit apoptose d'entérocytes, dit mise en route du processus de remplacement cellulaire via la différenciation des progéniteurs en entéroblastes puis en entérocytes. Étonnamment, j'ai observé une forte augmentation du nombre de cellules entéroendocrines à partir du premier jour suivant l'ingestion. Par lignage cellulaire, j'ai démontré que peu de nouveaux entérocytes apparaissent, en tous cas pas suffisamment pour remplacer tous ceux mourant. De fait, le nombre total d'entérocytes dans l'intestin diminue alors que le nombre de cellules entéroendocrines augmente. Ensuite j'ai démontré que les cristaux de toxines de *Btk* détournent les progéniteurs de leur destin initial d'entérocytes vers un destin de cellules entéroendocrines, à cause d'un affaiblissement de l'interaction cellule-cellule entre les cellules souches intestinales mères et les cellules filles progénitrices. J'ai pu sauver l'excès de cellules entéroendocrines dépendant du bioinsecticide *Btk* en augmentant la force des jonctions adhérentes entre les cellules souches et les progéniteurs. La souche *Btk* composant les produits commerciaux produit 5 toxines Cry différentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, et Cry2Ab) ciblant les larves de lépidoptères. J'ai montré que les toxines de type Cry1A sont capables, seules, d'induire l'augmentation du nombre de cellules entéroendocrines.

En conclusion, une partie de mes travaux participe aux connaissances sur les mécanismes physiologiques, génétiques et cellulaires fondamentaux nécessaires au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal après une agression modérée. D'autre part, mes travaux montrent que l'ingestion de bioinsecticides *Btk* aux doses utilisées en agriculture induit une perturbation de l'équilibre physiologique de l'intestin d'un organisme non-cible. La poursuite de ce type de travaux est essentielle pour arriver à évaluer minutieusement les risques consécutifs à une exposition aux biopesticides *Btk* par les organismes non-cibles. Il est important d'obtenir des données précises pour mettre en place des mesures préventives et/ou curatives pour la santé humaine et l'environnement.

Mots Clés: Bioinsecticides, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Drosophila melanogaster*, Homéostasie cellulaire intestinale, Toxines Cry, Jonctions adhérentes

Abstract

Microbes, toxins and chemicals such as pesticides are harmful agents that could attack the gastrointestinal tract throughout organismal life. This triggers a rapid renewing of damaged intestinal cells to sustain a functional barrier to limit the risk of developing pathologies. The repair process involves a transient proliferation of intestinal stem cells (ISCs) and the differentiation of their progeny into enterocytes to replace the damaged ones. Among pesticides, the broadly used bioinsecticides composed of spores and crystalline (Cry) toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* (*Btk*) are expected to supplant synthetic chemical pesticides to specifically fight lepidopteran pests. We have investigated here the effects of spores and toxins of *Btk* ingested along with the food on intestinal cellular homeostasis of the non-target dipteran *Drosophila melanogaster*. We showed that *Btk* Cry toxins induce enterocyte death and ISC proliferation. Surprisingly, a high proportion of ISC's daughter cells differentiate into enteroendocrine cells instead of their initial enterocyte destiny. This imbalanced intestinal cell composition is due to Cry toxins which weakened cell adhesion between the ISC mother cell and its immediate daughter progenitor leading the latter to adopt an enteroendocrine cell fate. Our results further showed that Cry1A family of toxins is implicated in this intestinal cell fate diversion, suggesting that *Btk* bioinsecticides induce non-negligible deleterious effects on gut physiology.

Keywords: Bioinsecticides, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Drosophila melanogaster*, intestinal homeostasis, Cry toxins, Adherens junctions.

Remerciements

Le bon déroulement et l'achèvement de ce travail mené sur plusieurs années ont été possibles grâce à l'aide de plusieurs personnes qui ont contribué par leurs directives, leur collaboration, leurs conseils mais surtout leur soutien. Il est l'occasion de se remémorer les différentes embûches qu'il a fallu surmonter mais surtout les personnes qui m'ont permis d'en arriver là.

Je remercie dans un premier temps vivement les deux personnes qui ont vraiment une place importante dans mon cœur Armel GALLET et Dani OSMAN car c'est grâce à leur aide que j'ai pu mener mon travail à son terme. Je leur suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de leur grande compétence, de leur rigueur intellectuelle, de leur dynamisme, de leurs observations qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce mémoire et de leur efficacité certaine que je n'oublierai jamais.

Je tiens également à remercier Monsieur Armel GALLET, mon directeur de thèse qui m'a accueilli dans son équipe de recherche et pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre à son appui scientifique il était toujours là pour me soutenir tantôt par des mots durs qui m'incitaient à travailler et tantôt par de beaux commentaires qui allumaient la bougie de courage dans mon âme stressée. Tu m'as aidée à acquérir une maturité scientifique et surtout à croire en mes capacités. Merci mon cher pour toutes les réunions et les discussions que nous avons pu avoir qui ont été très enrichissantes et j'espère pouvoir mettre en pratique tout ce que tu as pu m'apprendre dans ma carrière future. Je suis également fascinée par ta façon de tout gérer et je vais prendre exemple sur toi pour la suite de ma carrière ! C'était juste agréable et très enrichissant de partager le bureau avec toi ! Tu vas me manquer...

Je voudrais également remercier tout particulièrement Monsieur Dani OSMAN, mon codirecteur de thèse. Chaque jour je remercie la vie qui m'a donné la chance de te rencontrer. Ton sourire, tes mots, ton âme plein d'amour et d'espoir étaient toujours les motifs qui me poussèrent à redoubler mes efforts pour devenir exactement comme toi. Merci pour ton encadrement, tu m'as permis d'acquérir une rigueur scientifique solide, de développer un esprit critique envers mon travail. Au début de mon doctorat, tu t'es engagé à défendre mes intérêts et respecter les échéances de mon doctorat et tu l'as fait. J'ai passé avec succès mon travail grâce à toi et tu as continué pendant ma thèse à m'apprendre à rester attentive au moindre détail. Ton encadrement fut un subtil mélange d'exigence, de fermeté et de justesse.

Je te remercie chaleureusement car tu as parsemé mes instants par tes conseils fraternels et tes intuitions scientifiques.

Je suis heureuse d'avoir pu partager ces quatre années avec vous deux, pour votre disponibilité de tous les instants, votre accessibilité et votre sympathie.

Je suis très honoré de leur présence dans mon jury de thèse et je tiens à remercier :

Pierre FRENDO, Julien COLOMBANI, Renald DELANOUE, et Léopold KURZ.

La réussite de cette thèse repose aussi sur le soutien constant de tous les membres de l'équipe.

Bien qu'extérieurs à mon projet de thèse, ils ont été constamment disponibles et toujours de bon conseil. Leur dynamisme insuffle une excellente ambiance de travail au sein de l'équipe.

Je vous remercie bien. Vous m'avez conseillé et épaulé à un moment ou un autre.

Je remercie infiniment Marcel qui me traite exactement comme sa fille, je n'oublie jamais que chaque fois que le temps de mon voyage au Liban s'approche, il propose toujours de m'emmener à l'aéroport et pendant les grèves des bus il me ramène à la maison. Il est toujours présent pour m'aider et précisément dans le domaine informatique et chaque fois que j'ai des questions il ouvre avec moi une discussion scientifique qui enrichit mes connaissances. Merci pour ta grande disponibilité, ta gentillesse, ton exigence qui me fait râler...et ta bonne humeur qui rend le travail avec toi de plus en plus agréable. Merci d'avoir supporté mes questions brutales que je pose sans réfléchir alors que tu es en train de bosser et que ça peut te gêner...

De même je remercie de tout mon cœur Raphael. Il est toujours prêt pour répondre à toutes mes questions. Avant mes présentations il s'enthousiasme pour m'écouter plusieurs fois afin de me donner les remarques qui améliorent mon travail et il est toujours la source d'inspiration de mon sujet. Enfin je n'oublierai jamais que pendant ma présence au Liban durant le confinement, il me contactait toujours pour avoir de mes nouvelles.

A Alexandra j'envoie tous mes remerciements chaleureux. Elle est notre maman. A côté d'elle nous oublions que nous sommes à l'étranger. Toujours elle s'occupe et pense à moi, elle me demande si j'ai besoin de n'importe quelle aide, elle m'englobe par son amour maternel.

Je tiens à remercier Marie-Paule, elle nous aide à préparer tout ce qui est nécessaire pour nos expériences afin de gagner du temps ! Merci pour ta participation à mes travaux de thèse, pour ton soutien moral continu et ta gentillesse. Merci pour tout le temps que tu m'as accordé, qui parfois, retardait tes expérimentations...J'étais bien chouchoutée et je suis très reconnaissante !!!

Je remercie vivement Nathalie pour sa gentillesse, elle a travaillé avec nous la partie biochimie avec amour. A mon arrivée au laboratoire, j'étais seule, il n'y a pas d'étudiants avec qui je pouvais discuter. Alors Nathalie a essayé de créer une amitié avec moi, pour m'aider à surmonter la solitude dans laquelle j'étais enfermée. Elle n'oublie jamais mon anniversaire, elle était toujours la première à me contacter pour me souhaiter une année pleine de joie et de réussite.

Je n'oublie pas de remercier David, au début il me faisait peur avec ses sourcils toujours serrés. J'ai cru qu'il était un homme très dur et sérieux mais avec le temps j'ai découvert sa grande intelligence et sa bonté. Tu m'as appris que le chercheur doit accepter les critiques pour qu'il puisse avancer et tu m'as appris comment défendre mon travail ! Merci !

Je remercie Pierre Barbero. C'est vrai que nos rencontres sont rares mais chaque fois que tu viens au laboratoire tu me questionnes sur le déroulement de mon travail et toujours tu as voulu que mon niveau en français s'améliore et tu me motives de façon continue. Saches que je pense toujours à toi.

Enfin merci aux autres membres de mon équipe Julie, Aurélia et Fatima.

Et maintenant, A mes chères copines. J'ai vraiment de la chance de rencontrer des personnes agréables comme vous. Merci pour toutes les aventures qu'on a pu vivre ensemble, pour toutes les discussions de filles qui enrichissaient nos rencontres et pour votre soutien continu. D'abord Mayssam « ma grande sœur », elle était toujours à côté de moi et je me souviens de notre première rencontre dans le bus qui était vraiment étrange, sans se parler toutes les deux nous avions soupçonné que nous étions de la même nationalité. Après notre deuxième rencontre une amitié intime voyait le jour. Merci pour tous les beaux moments qu'on a pu partager. Quelques mois étaient suffisants pour que je m'attache beaucoup à toi...

Je tiens à remercier Salma. J'ai fait sa connaissance dans mon équipe. J'étais au comble de joie car j'ai une amie comme Salma, tendre, compréhensive et toujours prête à aider les autres. Mon adorable amie, j'ai vécu des périodes si pénibles que plus d'une fois j'ai cru que jamais je ne verrai le bout du tunnel. A chacun de ces instants, tu étais là pour me consoler et me rappeler que je suis forte et que je peux y arriver ! Sache que tu m'as aidé beaucoup plus que tu ne le penses et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi ! Je t'aime beaucoup !!!

Et maintenant c'est le temps de Yara, le papillon de notre bande, la source de joie, elle plaisante toujours, elle aime la vie. Merci pour les balades, merci infiniment d'avoir été là

pour le choix de mes habits, tu es la meilleure personne avec qui on peut faire un shopping parfait ! Merci ma Yara d'amour pour ta tendresse et ta précieuse amitié !!! Je t'aime beaucoup la petite Yara !!

Et Rima qui partage avec moi le même foyer. Grâce à sa présence je sens que je suis au sein d'une famille. Pendant le mois de ' ramadan, j'ai senti vraiment que ne suis plus loin de mon pays. Elle est ma boîte à secrets, ma confidente, tes pensées réalistes m'ont aidé à résoudre mes problèmes d'une façon rationnelle. Je n'oublierai pas le goût de tes plats libanais exactement comme ceux préparés par ma mère. Mes remerciements ne pourront jamais être à la hauteur de ton grand cœur qui m'a apporté beaucoup de soutien au moment où j'en avais besoin ! Merci d'être présente à mes côtés !

Je tiens également à remercier Mohamad Saïd et Ahmad Karakala qui sont vraiment mes frères à l'étranger. Toujours ils étaient prêts pour m'aider n'importe quand et dans n'importe quel domaine. Notre première rencontre est mémorable, car en écoutant votre accent libanais lors de notre présence à l'arrêt de bus, ma curiosité m'a poussée à parler avec vous. Comme ça a commencé notre amitié en France. Tous les deux vous restez graver dans ma mémoire pour le reste de ma vie.

Ahmad Karakala, j'aime bien ton accent de Baalbek à travers lequel mes rêveries embrassent les souvenirs dans mon pays. Mohamad Saïd je n'oublie jamais ta timidité au début de notre amitié, mais avec le temps tu as cassé cet obstacle et tu es devenu très cher pour moi exactement comme mon frère. Je me rappelle fortement de la leçon que tu m'as donnée, intitulée : comment aller à Paris ? tu te souviens ? Vraiment ce sont des instants inoubliables !

Finalement un vif remerciement à Mohamad Khayri, toujours il était à côté de moi, nos discussions sur la vie sociale me donnaient une énergie positive. Grâce à toi j'ai fait la connaissance des plats égyptiens, grand merci notre brave cuisinier !!! Je n'oublierai jamais ton visage en essayant de parler avec l'accent libanais. C'était vraiment amusant ! Merci car tu as supporté les bavardages de Rima et moi.

Et un énorme remerciement à Youssef Morsay. Son visage couronné par l'innocence me rappelait de mon frère. En sa présence les éclatements de rire dominaient l'endroit. Je te remercie surtout pour ta positivité, ta bonne humeur et la bonne ambiance !

A ma famille, mes tantes et mes oncles, mes cousines et cousins, ma belle-famille, merci pour votre soutien continu et vos encouragements. Mes chères sœurs et mon cher frère, sans vous

je n'aurais pas pu supporter la pression et le stress. Mon cousin Wassim et ma nièce Sandra, c'est grâce à vos rires à votre esprit d'enfants plein de joie et d'espoir que j'étais capable de surmonter toutes les difficultés.

Je n'arrive jamais à trouver les mots pour remercier mon père et ma mère. Papa ce grand homme, grâce à ses sacrifices, grâce à la sueur de son front sous le soleil en travaillant durement, je suis maintenant ici, je réalise mon rêve et je prépare mon avenir. Je peux imaginer nettement les larmes qui vont se promener sur ses joues suite à l'achèvement de mon travail. Chaque fois qu'il m'appelait en me disant ma chère doctorante, je sens que toutes les difficultés que j'affronte disparaissent. A la maman la plus chère du monde, Mona, si je suis arrivée à réaliser mon rêve, saches que c'est grâce à toi... T'es la meilleure maman qui peut exister sur terre, merci pour tous tes sacrifices et tes prières... je n'oublie jamais tes larmes chaque fois que je quitte mon pays, je n'oublie jamais le goût de tes plats préparés avec amour et bien ordonnés dans mes valises. Je t'aime maman...

A titre plus personnel, je remercie chaleureusement mon fiancé, l'homme de ma vie, Walid, c'est parmi les plus belles preuves d'amour, c'est de supporter toutes ces années de distance pour que je puisse réaliser mon rêve... Ta présence dans ma vie m'a donné beaucoup de courage et de joie pour que je vive ma thèse comme un plaisir et pas comme une contrainte ! Merci pour ta grande patience ton encouragement et ta confiance, ton expression ma belle doctorante était le motif qui me pousse à travailler pour terminer mon projet comme il faut. Merci mon homme je t'aime beaucoup !

Je dédie ce travail en signe de reconnaissance :

*A celui qui a lutté et sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite :
Mon très cher père « Khaled », ce cadeau divin qui a consacré toute sa vie pour sa
famille....*

*A celle qui m'a étreint de tendresse et d'affection et qui a constitué la première école de
mon existence. Ma très précieuse, chaleureuse et aimable mère « Mona », cette superbe
femme, qui dès notre naissance nous avons épuisé toute son énergie.....*

*À mon amour éternel Walid pour sa patience, sa tendresse, grâce à sa présence dans ma vie
j'ai pu gravir les pentes qui me semblaient infranchissables.....*

A mes sœurs, mon frère, mes beaux-frères et à toute ma famille.....

*Que ce travail soit l'expression de ma grande affection et un témoignage de
mon attachement et de mon grand profond amour.....*

Je vous aime infiniment !

Résumé générale

Le contrôle des insectes nuisibles pour l'agriculture et des insectes vecteurs de maladies est un enjeu majeur depuis des décennies. Ce contrôle est basé principalement sur l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques (insecticides). L'utilisation de ces derniers a considérablement diminué la pénibilité du travail au champ tout en permettant une production suffisante et à moindre coût pour satisfaire aussi bien le marché que le consommateur. Toutefois, l'utilisation de ces pesticides a fait apparaître plusieurs problèmes tels des impacts létaux ou sublétaux sur des organismes non cibles. Les effets non intentionnels sont souvent des perturbations du système endocrinien ou immunitaire, des altérations du comportement, du développement embryonnaire, voir des cancers. De fait leur utilisation peut être la cause de problèmes environnementaux et de santé publique, d'autant plus que les risques inhérents à certains d'entre eux sont mal évalués. Pour cela, les pratiques agricoles commencent à évoluer vers une réduction de l'utilisation des pesticides chimiques au profit d'alternatives dites de biocontrôle, considérées comme plus respectueuses de l'environnement. Les biopesticides font dorénavant et déjà l'objet d'une utilisation croissante dans la lutte contre les nuisibles et les plantes adventices. Parmi ces biopesticides, la bactérie *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) représente 75% du total des ventes et est utilisée dans le monde entier pour lutter contre les lépidoptères ravageurs en agriculture biologique mais aussi en agriculture conventionnelle. *Bt* est une bactérie sporulante Gram-positif appartenant au groupe *Bacillus cereus*. *Bt* a la particularité de synthétiser des toxines (toxines Cry) aux propriétés entomopathogènes enfermées dans un cristal au sein de la spore, mettant alors en évidence le potentiel d'utilisation qu'elle représentait. Parmi les différentes souches de *Bt*, certaines ont été sélectionnées pour leur spécificité d'action contre des nuisibles et sont commercialisées sous forme de spores dont la production et la conservation, aisées et peu onéreuses, constituent un atout supplémentaire dès les années 50 aux Etats-Unis. La souche *Bt kurstaki* (*Btk*) est le biopesticide le plus utilisé en agriculture biologique en France pour lutter contre les chenilles de lépidoptères ravageuses de cultures. La présence accrue de *Bt* dans les denrées alimentaires (les légumes traités) peut potentiellement affecter la physiologie du tube digestif, premier organe et première barrière en contact avec de la nourriture contaminée par les bioinsecticides *Bt*, les microbes et les toxines.

Ce qui soulève la question suivante : dans quelle mesure les organismes non-cibles seront potentiellement affectés par l'augmentation de l'utilisation des produits *Bt*? Quels sont les effets potentiels à court et long terme de ces produits, même à doses faibles, sur la santé des organismes non-cibles ?

Il est admis que la présence de bactéries non commensales (allochtones) dans l'intestin peut être à l'origine **d'un état pro-inflammatoire** pouvant aboutir au **développement de maladies inflammatoires intestinales chroniques** de type Crohn ou colite ulcéreuse et dans le pire des cas **dégénérer en cancers**. *Bt* étant une bactérie non commensale opportuniste, elle peut donc interférer avec l'épithélium intestinal de l'individu. *Bt* est ainsi mis en cause dans des intoxications alimentaires provoquant des diarrhées. Ces données suggèrent donc qu'une utilisation intensive des **bioinsecticides *Bt* pourrait avoir une incidence sur le développement de pathologies digestives**. Mon projet de thèse s'intéresse aux **conséquences physiopathologiques** intestinales liées à l'ingestion de *Bt* aux doses retrouvées sur les légumes "bio" après un seul traitement en utilisant la drosophile comme modèle.

Dans la première partie de ma thèse, afin d'isoler les impacts potentiels liés à la présence de la bactérie *Bt*, nous avons travaillé avec la forme végétative de *Bt*. Ceci permet d'éviter l'effet additif/synergique des toxines Cry qui sont produites uniquement pendant la sporulation. Nous avons étudié les premières étapes des mécanismes de signalisation induits par la présence de bactéries opportunistes. Nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de défense caractérisé par l'apparition de spasmes viscéraux pour éliminer plus rapidement les bactéries opportunistes. Dans cette étude, nous avons identifié un nouveau circuit physiologique qui est impliqué dans la défense intestinale locale et participe à l'élimination des bactéries allochtone ingérées. Nous avons démontré que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) immunitaires en réponse à la présence de bactéries allochtone dans la lumière intestinale conduit à des contractions viscérales rapides et fortes dispersées le long de l'intestin moyen. Pour résumer l'enchaînement des événements on peut dire que l'intestin moyen antérieur repère la présence des bactéries opportunistes ingérées. La réponse des entérocytes se fait par la production de ROS en moins d'une heure. Les ROS endommagent les bactéries et bloquent leur prolifération. En parallèle, ces ROS sont détectés par une sous population de cellules entéroendocrines (EEC) antérieures grâce au récepteur TRPA1. La liaison des ROS à TRPA1 induit un flux de calcium dans les EEC, ce qui favorise la sécrétion de l'hormone DH31 (homologue du CGRP de mammifère) du côté basal. DH31 à son tour active son récepteur dans les muscles viscéraux voisins ce qui est suffisant pour déclencher une série de spasmes viscéraux favorisant l'expulsion rapide des bactéries.

Afin de mieux comprendre les effets non intentionnels associés à l'utilisation des bioinsecticides *Bt* sur le long terme, dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons étudié les impacts de l'ingestion de bioinsecticides *Btk* (mélange spores et cristaux de toxines Cry) sur l'homéostasie cellulaire intestinale de l'organisme non cible *Drosophila melanogaster* à l'aide de doses

environnementales. Nous avons travaillé pour cette étude directement avec les produits commerciaux provenant de fabricants différents (Dipel®, et Delfin®). Bien que l'impact délétère d'une intoxication aiguë puisse être surmonté par la capacité de régénération et de défense de l'épithélium intestinal, une agression prolongée ou chronique peut compromettre l'équilibre physiologique (l'homéostasie) de l'intestin. Un tel impact peut avoir des conséquences dramatiques pour la santé intestinale et/ou systémique d'un organisme, impactant à la fois sa condition physique générale et sa longévité. Chez la drosophile, il existe schématiquement cinq types de cellules composant l'épithélium intestinal. Les cellules souches intestinales (ISC) sont à la base de ce renouvellement et servent à régénérer chaque type de cellules intestinales. Lors de la division, les ISC donnent naissance aux cellules progénitrices filles qui suivront deux voies de différenciation différentes en fonction des besoins. Les entéroblastes (EB) sont les précurseurs des entérocytes (EC) et les précurseurs entéroendocrines (EEP) des cellules entéroendocrines (EEC). L'équilibre cellulaire et physiologique de l'épithélium intestinal assure le remplacement efficace des cellules endommagées tout en limitant le risque de maladies inflammatoires, qui, dans le pire des cas, peut conduire au développement de cancers. Le taux de prolifération des ISC est étroitement lié à l'exigence de renouvellement des tissus à un moment donné. Par exemple, la prolifération des ISC est stimulée au cours des infections bactériennes ou d'agressions afin de renouveler rapidement les EC endommagés et/ou morts.

Nous avons ainsi montré que l'ingestion de bioinsecticides *Btk* aux doses environnementales par des drosophiles adultes induisait sous 24h une apoptose modérée des EC. Nous avons montré que cette apoptose est causée par les toxines Cry de *Btk*. En réponse à cette apoptose, la voie de signalisation pro-inflammatoire de réponse aux stress JNK est fortement induite dans les EC. L'activation de la voie JNK induit en retour la production de cytokines inflammatoire Upd par les EC. Ces cytokines sécrétées stimulent ensuite la prolifération des ISC. Qui dit apoptose d'EC, dit mise en route du processus de remplacement cellulaire via la différenciation des progéniteurs en EB puis en EC. Cependant, nous n'avons pas observé ce phénomène pourtant largement décrit suite à une intoxication alimentaire bactérienne. Étonnamment, nous avons observé une forte augmentation du nombre de EEC à partir du premier jour suivant l'ingestion. Par lignage cellulaire, nous avons démontré que peu de nouveaux EC apparaissaient, en tous cas pas suffisamment pour remplacer tous ceux mourant. De fait, le nombre total d'EC dans l'intestin diminue alors que le nombre de EEC augmente. Ensuite nous avons démontré que les cristaux de *Btk* détournent les progéniteurs de leur destin initial de EC vers un destin EEC, à cause d'un affaiblissement de l'interaction cellule-cellule entre les ISC mères et les

cellules filles progénitrices. Nous avons pu sauver l'excès de EEC dépendant du bioinsecticides *Btk* en augmentant la force de la jonction adhérente entre les ISC et les progéniteurs. La souche *Btk* composant les produits Dipel et Delfin produit 5 toxines Cry différentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, et Cry2Ab) ciblant les larves de lépidoptères. Nous avons montré que ce sont les toxines de type Cry1A qui sont seules responsables de l'augmentation du nombre d'EEC. En conclusion, une partie de mes travaux participent aux connaissances sur les mécanismes physiologiques, génétiques et cellulaires fondamentaux nécessaires au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinale après à une agression modérée. D'autre part, mes travaux montrent que l'ingestion de bioinsecticides *Btk* aux doses utilisées en agriculture induit une perturbation de l'équilibre physiologique de l'intestin d'un organisme non-cible. La poursuite de ce type de travaux est essentielle pour arriver à évaluer minutieusement les risques consécutifs dus à une exposition aux biopesticides *Btk* par les organismes non-cibles. Il est important d'obtenir des données précises pour mettre en place des mesures préventives et/ou curatives pour la santé humaine et l'environnement.

Table des Matières

Résumé générale.....	8
Table des Matières.....	12
Liste des Figures.....	15
Liste des tableaux.....	16
Liste des abréviations.....	17
Partie.1 : Introduction.....	20
Chapitre 1 : Les bioinsecticides à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
1.1 Introduction générale.....	21
1.2 Définition et historique de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
1.3 Caractéristique générale et cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
1.3.1 Caractéristique générale de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
1.3.2 Cycle de croissance de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
1.4 Les Principales protéines toxiques de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
1.4.1 Les delta-endotoxines (protéines Cry).....	27
1.4.2 Autres facteurs pathogéniques de <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
1.5 Mécanisme d'action des protéines de la famille des Cry1 chez les Lépidoptères.....	35
1.6 Persistance et survie des cellules végétatives et des spores de <i>Bt</i>	39
1.7 Effets non intentionnels.....	40
1.7.1 Effets non intentionnels de bactéries/spores de <i>Bt</i>	40
1.7.2 Effets non intentionnels des toxines.....	42
Chapitre 2 : La drosophile, un modèle d'étude émergent pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires régulant l'homéostasie intestinale.....	44
2.1 Choix du modèle.....	44
2.2 Le système digestif chez la drosophile adulte : fonction et organisation.....	46
2.2.1 Fonction de l'intestin.....	46
2.2.2 Organisation structurelle de l'intestin de la drosophile adulte.....	46
2.2.3 La composition cellulaire de l'intestin moyen.....	48
2.2.4 La régionalisation de l'intestin moyen de la drosophile adulte.....	52
2.3 Conservation évolutive entre l'intestin grêle des mammifères et le tube intestinal chez la drosophile.....	54
2.3.1 Comparaison entre l'organisation structurelle et cellulaire.....	54
2.4 Rôle des jonctions cellulaires dans le maintien de l'épithélium intestinal.....	57
Chapitre 3 : Maintien de l'homéostasie intestinale chez la drosophile adulte.....	59

3.1 Les bases moléculaires régulant la formation et la différenciation du lignage cellulaire intestinale	59
3.1.1 Mode de division des ISC.....	60
3.1.2 Division symétrique ou asymétrique, qui dicte le choix ?.....	60
3.1.3 La voie Dpp/BMP : un autre régulateur du mode de division des ISC	64
3.1.4 Autres déterminants cellulaires du mode de division des ISC	64
3.2 Programme spécifique de régulation du devenir des EEC	65
3.3 Régulation de la prolifération des ISC dans les conditions physiologiques normales	68
3.3.1 La voie de signalisation Wingless/Wnt dans l'intestin moyen de la drosophile adulte	68
3.3.2 Voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)	69
3.3.3 La voie de signalisation JAK/STAT.....	69
3.3.4 Rôle de la voie Hippo dans la restriction de la prolifération des ISC.....	70
3.4 Différents types de stress influencent l'activité des ISC	71
3.4.1 Agents inducteurs de la régénération de l'intestin moyen	72
3.4.2 Régulation de la régénération intestinale en réponse aux stressés	72
3.5 Régulation de la prolifération et de la différenciation des ISC chez les mammifères	75
3.5.1 La voie de signalisation Wnt	75
3.5.2 La voie de signalisation Notch	75
3.5.3 La voie de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMP).....	75
3.6 Perturbation de l'activité des ISC et pathologies intestinales	76
Chapitre 4 : Objectif de la thèse	77
4.1 Objectifs de la thèse : Etude des effets de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> sur la physiologie intestinale	77
4.2 Méthode standardisée d'intoxication des drosophiles	79
Partie. 2 : Résultats	81
Chapitre 1 : Impact de la bactérie <i>Btk</i> sur la physiologie intestinale	82
1.1 Résumé	82
1.2 Article: Benguettat et al., PLOS Pathogens, 2018: The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria	86
Chapitre 2 : Impact des bioinsecticides <i>Btk</i> sur l'homéostasie cellulaire intestinale	87
2.1 Résumé	87
2.2 Article: Jneid et al. en préparation: <i>Btk</i> toxins divert intestinal cell lineage fate by diminishing stem cell/daughter progenitor cell-cell adhesion	91
Partie.3 : Discussion et Conclusion	117
Chapitre 1 : Discussion	118
3.1 Mécanismes de défenses intestinales	118
3.2 Homéostasie cellulaire intestinale et <i>Bt</i>	121

3.3 Pourquoi les bioinsecticides <i>Btk</i> tuent-ils les insectes cibles sans effets létaux sur les organismes non-cible ??	131
3.3.1 Dissolution des Cristaux et activation des protoxines	131
3.3.2 Notion de récepteurs spécifiques.....	132
Chapitre 2 : Conclusion	135
Références bibliographiques	137

Liste des Figures

Figure 1: <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	26
Figure 2: La structure 3D composée des trois domaines de la toxine Cry1Aa de <i>Bt</i>	28
Figure 3: Bt et Nomenclature	32
Figure 4: Représentation schématique de la classification des toxines insecticides de <i>Bt</i> avec exemple de toxines et de leur ravageur cible dans chaque classe	34
Figure 5: Modèle de liaison séquentielle (mode d'action classique dit modèle de Bravo) de la toxine Cry1Ab montrant l'activation de la toxine, la liaison avec des récepteurs spécifiques, la formation de pores et la mort subséquente des larves d'insectes.	37
Figure 6: Le modèle de voie de signalisation (mode d'action alternatif) de la toxine Cry montrant l'attachement de la toxine Cry au récepteur cadhérine (CADR receptor) qui accélère les événements des voies apoptotiques intracellulaires.	38
Figure 7: <i>Drosophila melanogaster</i> et cycle de vie.....	45
Figure 8: Organisation structurale de l'intestin de la drosophile adulte.....	48
Figure 9: Organisation cellulaire de l'intestin moyen de la drosophile adulte.....	51
Figure 10: Distribution des neuropeptides/hormones peptidiques sécrétés par les EEC dans les différentes régions de l'intestin moyen de la drosophile adulte	52
Figure 11: Régionalisation de l'intestin moyen de la drosophile adulte.	53
Figure 12: Comparaison schématique de l'épithélium intestinal chez la drosophile et les mammifères	56
Figure 13: Schéma décrivant les jonctions épithéliales chez la drosophile et chez les vertébrés	58
Figure 14: Le lignage des cellules souches intestinales et mode de division (asymétrique et symétrique)	62
Figure 15: Voie de signalisation Notch dans l'intestin moyen de la drosophile adulte.	63
Figure 16: Régulation du destin EEC.....	67
Figure 17: la régénération intestinale en réponse aux stressés	74
Figure 18: Toxine Cry et jonction adhérentes (Hypothèse 1).	126
Figure 19: Toxine Cry et jonction adhérentes (Hypothèse2).	127
Figure 20: Toxine Cry et jonction adhérentes (Hypothèse3).	128
Figure 21: Schéma résumant les conséquences d'une intoxication par des toxines Cry sur l'homéostasie cellulaire intestinale.....	134

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des souches Bt présentes sur le marché avec leur nom commercial, ainsi que les toxines Cry produites par chacune d'elles et les insectes ciblées.	30
Tableau 2: Les diverses toxines Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt et les plantes dans lesquelles sont insérés un ou plusieurs gènes codant pour les toxines Cry ainsi que les insectes ciblées.	31
Tableau 3: Les différents neuropeptides exprimés dans les EEC de l'intestin moyen de la Drosophile.	50

Liste des abréviations

ALP : Phosphatase alcaline

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APN : Aminopeptidase

Apc :(Adenomatous Polyposis Coli)

AS-C: Acheate-sense complex

Ast: Allatostatine

bHLH: basic Helix-Loop-Helix

BMP: Bone morphogenic protein

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Btk: *Bacillus thuringiensis kurstaki*

Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*

Bta: *Bacillus thuringiensis t var aizawai*

CBC : Cellule souche intestinale (mammifères)

Cry : Crystal (protéines cristallines)

Cyt: Proteines cytolitique

CytK : (cytotoxine K)

Da: Daughterless

DH: Diuretic Hormones

DIAP1: Death-associated inhibitor of apoptosis 1

dILP3: *drosophila* insulin like peptide 3

DI: Delta

Dome: Domeless

Dpp: Decapentaplegic

DSS : sulfate de sodium de dextrane

Duox : Dual oxidase

EB : Enteroblastes

EC : Enterocytes

E-cad : Cadhérine épithéliale

Ecc: *Erwinia carotovora carotovora*

EEC : Cellules entéroendocrines

EEP : Précurseurs de cellules entéroendocrines

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

Esg: Escargot

E(spl)-C: Enhancer of split

GPI: Glycosyl-phosphatidyl- inositol

Hpo: Hippo

ISC : Cellules souches intestinales

InR: Insulin Receptor

JAK/STAT: Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription

JA : Jonctions adhérentes

JS : Jonctions serrées

HBL: hémolysine BL

Lgr5: Leucin-rich G protein-coupled receptor 5

Mats : mob as tumor suppressor

NHE : Entérotoxine non hémolytique

NICD : Notch Intra Cellular Domain

NPF : Neuropeptide F

OGM : Organisme génétiquement modifié

PAM : Peptide anti-microbien

Pdm1 : Pou domain 1

Pe: *Pseudomonas entomophila*

P : Les progéniteurs

PM : Membrane péritrophique

Pros : Prospero, un facteur de transcription pro-neural

RNAi : ARN interference

ROS : Espèces réactives d'oxygène

Robot2: Roundabout receptor / leak receptor

Rpr: Reaper

Sav: Salvador

Sip: Secreted intestinal proteins

Su(H) : Suppressor of Hairless

TA : cellules amplificatrices transitoires

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TK: Tachykinin

TM: Tubules malpighiens

Ttk69: Tramtrack 69

Upd: Unpaired like protein

Vip: Vegetative insecticidal protein

VM: Muscles viscéraux

Wnt/Wg: Wnt/Wingless

Wts: Warts

Yki: Yorkie

Partie.1 : Introduction

Chapitre 1 : Les bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis*

1.1 Introduction générale

La population humaine mondiale augmente régulièrement, ce qui peut mener dans les années à venir à une sérieuse crise alimentaire poussant le secteur agricole à accroître sa production. Il est donc urgent d'optimiser les programmes de lutte contre les ravageurs causant des dommages aux cultures comme les insectes, les champignons, les bactéries et les virus. L'utilisation des insecticides chimiques porte une grande dangerosité. Certains insecticides actuellement utilisés pour lutter contre les insectes ravageurs sont extrêmement toxiques pour les organismes non-cibles et, dans de nombreux cas, sont nocifs pour la santé provoquant des maladies comme le cancer ou les troubles du système immunitaire. De plus, ils sont persistants dans l'environnement, se décomposant lentement, entraînent une pollution des sols et de l'eau. De nombreux insectes ont développé une résistance aux différents pesticides chimiques. Pour ces raisons, et suite aux incitations qui visent à réduire l'utilisation de pesticides chimiques, des mesures sont prises pour encadrer l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques comme c'est le cas en France avec **le plan Ecophyto II qui vise à réduire de moitié leur utilisation d'ici (2025)**. Plusieurs solutions alternatives pour réduire l'utilisation massive des pesticides chimiques ont été cherchées et développées, parmi elles, l'utilisation de pesticides naturels/biologiques (**les biopesticides**) prédomine. **C'est la meilleure option disponible actuellement** pour lutter contre les insectes nuisibles dans les cultures agricoles et ne cesse d'augmenter ces dernières années. Il y a eu une nette augmentation de leur usage ces dernières années, et cette augmentation ne va pas cesser dans l'immédiat. La conséquence en est une augmentation de la dispersion des biopesticides dans l'environnement et de leur présence dans l'alimentation.

Parmi les bioinsecticides, la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est largement utilisée dans le monde entier comme insecticide biologique pour préserver les cultures. Pour neutraliser les organismes cibles, *Bt* produit des toxines insecticides telles que les Cry et les Cyt. Découvertes par Shigentane Ishiwatari en 1901, les propriétés insecticides du *Bt* ont été exploitées et des biopesticides ont été commercialisés à partir de 1950/60. Actuellement, les toxines de *Bt* sont utilisées sous la forme de biopesticides ou incorporées comme transgènes aux génomes des plantes (les cultures génétiquement modifiées) pour lutter contre les

lépidoptères et les coléoptères, ce qui offre un traitement biologique efficace et alternatif aux pesticides chimiques. Les données sur les effets nocifs des toxines de *Bt* sur l'environnement ou la santé humaine sont très rares bien qu'il y ait des préoccupations sanitaires et environnementales sur l'utilisation des cultures transgéniques et donc la présence des toxines dans l'alimentation animale et humaine. Avec cette croissance, **les populations animales et humaines sont et seront de plus en plus exposées aux bioinsecticides *Bt* via l'alimentation. Le premier organe en contact avec la nourriture contaminée par les bioinsecticides *Bt* est donc le tube digestif ce qui place l'intestin comme le premier organe en danger.** La question de savoir s'ils peuvent avoir des effets secondaires, à l'image de ce que l'on a pu connaître avec les insecticides chimiques, est donc pertinente.

Bacillus thuringiensis est un traitement biologique très utilisé notamment pour lutter contre les chenilles. Mais de quoi s'agit-il au juste ? Quel est son mode d'action ? Comment l'utiliser, et contre quels ravageurs ? Partons à la découverte de cet allié du jardinier biologique...

1.2 Définition et historique de *Bacillus thuringiensis*

L'agriculture assure la survie des hommes mais depuis l'antiquité les insectes nuisibles ravagent et détériorent les récoltes. Pour contrer ce problème, des bioinsecticides qui sont des dérivés d'organismes vivants (bactéries, virus, plantes, ...) ont été utilisés au cours du dernier centenaire. Il existe plus de 250 bioinsecticides parmi lesquels ceux qui sont à base **de spores de la bactérie opportuniste *Bacillus thuringiensis*** occupant la deuxième place dans la liste des ventes (75% des bioinsecticides et 4% du marché global des insecticides en 2018, représentant plus de 32.000 tonnes/an) (Casida & Bryant, 2017).

La spécificité d'action de certaines souches de *Bt* envers des insectes nuisibles a ensuite conduit à la sélection de ces souches et à leur utilisation commerciale. *Bt* fût le premier microorganisme homologué dans le monde comme bioinsecticide. Sa découverte revient à l'année 1901 quand le biologiste japonais Shigetane Ishiwata a repéré ses effets sur les vers à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), ce qui a permis d'isoler à partir de cet insecte une première souche de *Bt* surnommé à l'époque *Bacillus sotto*. En 1911, l'isolement d'une souche de *Bt* à partir d'une larve de mite trouvée dans un sac de farine est effectué par le scientifique allemand Ernst Berliner (Glare et O'Callaghan 2000) dans la province de Thuringia (d'où le nom de la bactérie), ce qui a ouvert la voie vers l'utilisation possible de ce germe pour lutter contre des insectes nuisibles.

L'utilisation de *Bt* pour la première fois au titre d'insecticide biologique (bio insecticides) sous le nom de Sporéine a eu lieu en France en 1938. Vingt ans plus tard, l'insecticide à base de *Bt* apparaissait aux Etats-Unis (dès les années 50) (Milner, 1994). Durant les années 1960 et jusqu'au milieu des années 1970, la sous-espèce *kurstaki* (*Btk*) qui sécrète cinq toxines Cry différentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab,) et qui possède une grande efficacité dans la lutte contre les lépidoptères ravageurs (chenille processionnaire du pin, piéride du chou, sphinx de la tomate...) dominait le marché mondial. Elle a été commercialisée sous plusieurs noms (Dipel, Bacivers, Bactura, Biobit ...) et la diversité d'usage (sylviculture, maraîchage, forêt, horticulture, riz, maïs) lui conférait une grande importance. A cette époque, l'utilisation des insecticides *Bt* était consacrée essentiellement pour la lutte contre les lépidoptères ravageurs.

Vers la fin des années 1970 et le début des années 1980, deux nouvelles sous-espèces ont été identifiées. La sous-espèce *israelensis* a montré une toxicité contre les moustiques et les mouches et possède plusieurs noms dans le marché (Vectobac, Teknar, Aquabac...). Les toxines Cry synthétisées par *Bti* (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa et Cry11Aa) sont différentes de celles de *Btk*. En même temps, l'espèce *tenebrionis* produisant une seule toxine Cry (Cry3A) apparaît dans le marché sous le nom de Novodor, son emploi se résume par la lutte contre certains coléoptères ravageurs de légumes .Il existe d'autres souches de *Bt* commercialisées pour combattre certains ravageurs, mais elles sont moins utilisées que celles décrites précédemment, comme par exemple *Bt var aizawai* (*Bta*) produisant six toxines Cry (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry2Ab Cry9Ea) (Caballero et al.,2020), le nom commercial du produit à base de *Bta* est Xentari, utilisé pour lutter contre certains lépidoptères mais il semble être moins efficace que *Btk*. *Bt* produit des endotoxines liées à l'expression des gènes plasmidiques *Cry* lui conférant son pouvoir entomopathogène (Pardo-López et al., 2013). Cette caractéristique a suscité un intérêt pour la production de biopesticides qui s'est accéléré depuis le premier clonage d'une protéine Cry en 1981 avec de nombreux industriels impliqués (Bravo et al.,2011). Grâce à ces découvertes, le grand potentiel insecticide *Bt* a été démontré, amenant ainsi à un fort accroissement de la production industrielles des bioinsecticides.

Comme mentionné ci-dessus, les produits *Bt* sont les bioinsecticides les plus efficaces contre les lépidoptères ravageurs de cultures. Ils sont prédominants en agriculture biologique (*Bt* est aussi utilisé en agriculture conventionnelle), occupant 75% des parts de marché des bioinsecticides. La surface mondiale en agriculture biologique a doublé en 10 ans induisant de facto une augmentation de 4% par an de l'utilisation des bioinsecticides (Willer & Lernoud, 2018). Cette tendance va s'accroître dans les années à venir suite aux incitations nationales et

internationales visant à réduire l'utilisation des produits chimiques. Ces dernières années, le doublement de la surface mondiale en agriculture biologique aboutit à l'augmentation de l'utilisation des produits de biocontrôle (englobant les biopesticides), avec une hausse de 8,5% en 2019 (www.ibmafrance.com) d'où un intérêt économique important autour de *Bt*. Les formulations commerciales de *Bt* se retrouvent sous différentes formes, en granules, en capsules, sous forme d'huiles, en poudre ou simplement en concentrés liquides selon l'environnement dans lequel elles doivent être aspergées. Ajoutons que l'épandage de formulations de *Bt* peut aussi bien se faire en forêt, dans l'eau ou dans les champs.

1.3 Caractéristique générale et cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*

1.3.1 Caractéristique générale de *Bacillus thuringiensis*

Bt est une bactérie gram-positif non-commensale, aérobie facultative, naturellement présente dans de nombreux endroits comme le sol (Martin & Travers, 1989 ; Carozzi et al., 1991), les insectes morts (Carozzi et al., 1991), l'eau, sur le feuillage des plantes (Kaelin et al., 1994) et les excréments d'insectes (Carozzi et al., 1991) ; on parle donc de bactérie ubiquiste.

Bt appartient au groupe phylogénétique de bactéries opportunistes *Bacillus cereus sensu lato*. Ces bactéries sont la 1^{ère} cause d'intoxication alimentaire en France (Santé publique France., 2017) et la 3^{ème} en Europe après *Salmonella spp* et *Staphylococcus aureus*, avec des symptômes diarrhéiques (liés à l'action synergique des entérotoxines : HBL (hémolysine BL), NHE (entérotoxine non hémolytique) et CytK (cytotoxine K), sécrétées par *B. cereus* dans l'intestin de l'hôte) (Berthold-Pluta et al., 2015) et/ou émétiques (dus à l'ingestion du céréulide, une toxine émétique produite dans l'aliment par *B. cereus*). A l'heure actuelle, la capacité de *Bt* à produire les entérotoxines majeures associées aux intoxications alimentaires de type diarrhéique (CytK2, NHE et HBL), est démontrée, ce qui évoque leur pouvoir potentiel de virulence pour l'Homme à l'égal d'autres *B. cereus* (Damgaard et al., 1996; Jöhler et al., 2018) *Bacillus cereus sensu lato* comprend huit espèces taxonomiquement très proches :

- ✓ *B. cereus sensu stricto* (ou *B. cereus*) (une bactérie responsable de toxi-infections alimentaires)
- ✓ *B. anthracis*, non hémolytique, agent de la maladie du charbon,
- ✓ *B. thuringiensis* se différenciant de *B. cereus sensu stricto* **par la production d'un cristal parasporal toxique contenant des toxines Cry qui sont portées par des plasmides .**

NB : L'homologie entre ces 3 bactéries est très forte même si elles présentent une pathogénicité différente. En effet, leurs toxines spécifiques leur permettent de coloniser des hôtes aussi divers que les insectes et les mammifères.

- ✓ *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* et récemment *B. toyonensis*

1.3.2 Cycle de croissance de *Bacillus thuringiensis*

Le cycle de vie de *Bt* est caractérisé par deux phases qui incluent la division et prolifération des cellules végétatives et le développement des spores ou sporulation.

1- La cellule végétative est en forme de tige (2–5 µm de long et environ 1,0 µm de large) pourvu de flagelles et se divise en deux cellules filles uniformes par la formation d'un septum de division initié à mi-chemin le long de la membrane plasmatique (division par scissiparité de la bactérie). Les cellules végétatives se forment lorsque les conditions du milieu sont favorables et la multiplication se fait de façon exponentielle.

2- La sporulation s'effectue lorsque les conditions environnementales sont défavorables, comme le cas d'une carence nutritionnelle. La bactérie entame un processus de différenciation aboutissant à la formation d'une spore résistante (Setlow, 2014). La spore est assimilable à une cellule déshydratée et encapsulée contenant une copie du matériel génétique de la bactérie. Les spores persistent efficacement dans l'environnement grâce à leur capacité de résister à la chaleur, à la dessiccation et à de nombreux agents chimiques (Hofte & Whiteley, 1989). Dans la nature, la persistance du *Bt* dans le sol est surtout due à la formation de spores et il est quasiment impossible de détecter le développement des cellules végétatives (Raymond & Federici, 2017). Comparée aux autres membres du groupe *Bacillus cereus sensu lato*, *Bt* assure son pouvoir entomopathogène grâce à sa capacité de synthétiser, au moment de la sporulation, des toxines qui restent enfermées dans un cristal au sein de la spore (Fiuza & crickmore., 2017) (Fig.1). La spore est formée par une endospore (qui contient le matériel génétique) et un cristal. Ce dernier est composé d'une ou plusieurs toxines de nature protéique appelées Cry (pour crystal) et/ou Cyt (pour cytotoxic), occupant 20 à 30 % du poids sec des spores (Fiuza & Crickmore.,2017). Ces toxines synthétisées sont toxiques pour les insectes, y compris les coléoptères, les diptères et les lépidoptères et même d'autres organismes tels que les nématodes, acariens et protozoaires (Palma et al., 2014).

Les protéines Cry fonctionnent différemment des pesticides chimiques. Leur ingestion par les insectes est une condition obligatoire pour qu'elles puissent agir et les tuer. L'action toxique

des Cry exige plusieurs étapes : d'abord la solubilisation des cristaux de protoxines dans l'intestin de l'insecte, ensuite leur activation par les enzymes protéolytiques dans l'intestin moyen de l'hôte, puis la liaison de la toxine aux récepteurs des cellules épithéliales, et enfin l'insertion dans la membrane apicale permettant la formation de pores membranaires conduisant à la mort des cellules épithéliales et donc la destruction du tube intestinal.

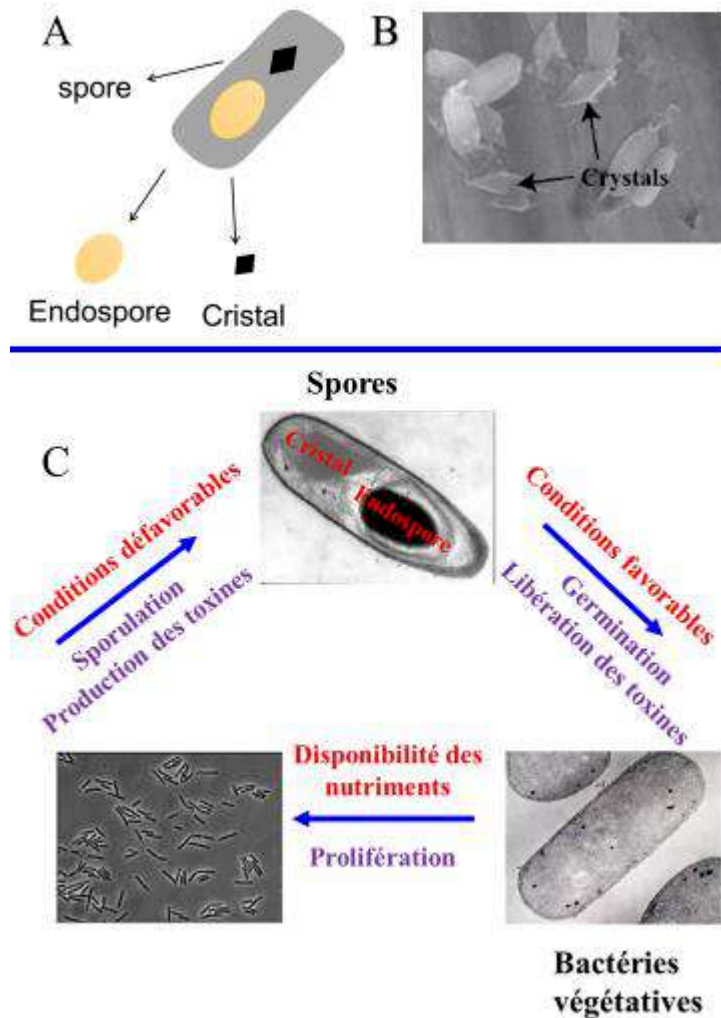


Figure 1: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

- A. Schéma d'une spore de *Bt* renfermant l'endospore et le Cristal
- B. Cristaux de *Bt* observés en microscope électronique (Palma et al., Toxines (2014))
- C. Cycle de vie de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

1.4 Les Principales protéines toxiques de *Bacillus thuringiensis*

1.4.1 Les delta-endotoxines (protéines Cry)

Lors de la phase de croissance stationnaire nommée « la sporulation », *Bt* synthétise des corps d'inclusion parasporal sous forme d'un cristal protéique composé de delta-endotoxines, réparties en deux familles : les protéines cristallines (toxines Cry) et protéines cytolitiques (Cyt) (Liu et al., 2018). Les cristaux occupent 20 à 30 % du poids sec des cellules sporulées (H. Agaisse & Lereclus, 1995). Une attention particulière sera accordée aux protéines **Cry** comme elles constituent une partie intégrante du travail de recherche décrit par la suite dans ce manuscrit.

En adoptant comme critère la similitude d'acides aminés, plus de 700 gènes *cry* ont été classés dans 78 familles de toxines Cry. Celles-ci ciblent différents insectes tels que les Lépidoptères, les Diptères, les Coléoptères, les Hyménoptères, les Homoptères, les Orthoptères, les Mallophages, les nématodes, et les protozoaires (Palma et al., 2014 ; Crickmore et al., 2020).

Grace à des études de cristallographie aux rayons X des protéines Cry, trois domaines structuraux ont été mis en évidence (de fait les toxines Cry sont aussi appelées toxines 3d-Cry). Les protéines 3d-Cry sont produites soit sous forme de grandes protoxines (inactive) ayant un poids moléculaire de 130 kDa environ, telles que la protéine Cry1Aa (dont la forme toxique est d'environ 67kD), soit sous forme de protoxines courtes entre 65 et 70 kDa, telles que la protéine Cry11Aa (dont la forme toxique est de 66-67 kDa).

Les protoxines qui forment le cristal protéique trouvé dans la spore peuvent être décomposées en deux fragments :

- Un fragment dit « structural » (C-terminal), chargé de la formation et la stabilité du cristal par la présence de ponts disulfures (fragment riche en cystéines) (Hofte & Whiteley, 1989). Cette moitié C-terminale ne joue pas un rôle important dans la toxicité.
- Un fragment dit « toxique » (N-terminal), responsable de l'activité insecticide proprement dite (Choma & Kaplan, 1990 ; De Maagd et al., 2001) Ce domaine N-terminal peut être à son tour décomposé en 3 domaines distincts (De Maagd et al., 2001)

(Fig.2) :

- ✓ Le premier domaine, ou domaine I, se situe à l'extrémité N-terminale, et est formé d'un amas de sept hélices α , avec une hélice hydrophobe conservée α -5 au centre, qui est impliquée dans l'oligomérisation de la toxine. Deux rôles sont joués par l'hélice α -5 : elle favorise l'insertion des toxines dans la membrane

des cellules intestinales et elle forme des pores. Le domaine I est donc inséré dans la membrane des cellules cibles, créant un canal ionique transmembranaire et déclenchant la mort de l'hôte. Les protéines Cry sont classées comme toxines porogènes (PFT) à cause des caractéristiques ci-dessus.

- ✓ Le deuxième domaine ou le domaine II est composé de trois feuillets β antiparallèles. Ce domaine est responsable de la reconnaissance spécifique et de la fixation de la toxine sur le récepteur.
- ✓ Le troisième domaine ou domaine III (partie C-terminale), est composé de feuillets β antiparallèles qui forment une structure sandwich β . Ce domaine est également impliqué dans la spécificité de liaison de la protéine aux récepteurs membranaires ; en outre, il est également associé à la formation de pores dans les membranes cellulaires.

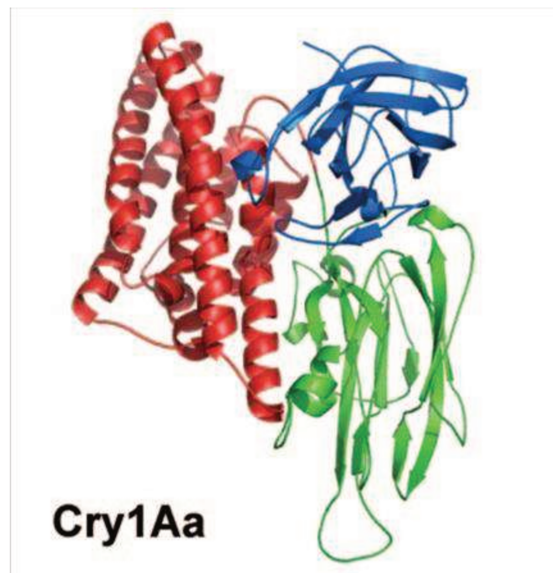


Figure 2: La structure 3D composée des trois domaines de la toxine Cry1Aa de *Bt*.

Le domaine I, le domaine II et le domaine III sont représentés respectivement en rouge, vert et bleu (Pigott & Ellar, 2007)

L'identification et le clonage du premier gène codant pour une protéine Cry insecticide de *Bt* ont eu lieu en 1981. Depuis, le nombre de gènes codant pour de nouvelles protéines Cry a considérablement augmenté, nécessitant la mise en place d'un système de nomenclature organisé. Höfte et Whiteley (1989) ont classé les protéines Cry en quatre grandes classes, selon la spécificité de la toxine pour les différentes classes d'insectes (Fig.3). Cependant, plusieurs chercheurs ont démontré que des toxines de *Bt* peuvent être toxiques pour différentes classes d'insectes. Pour surmonter ce problème, Crickmore et al. (1998) ont introduit un autre système

de classification. La nomenclature actuelle est basée sur les similarités de séquences en acides aminés des toxines Cry (Crickmore et al., 1998). En fonction de son degré d'identité des acides aminés aux toxines précédemment nommées, une nouvelle toxine se voit attribuer un nom à quatre rangs. De plus, le regroupement selon ce critère se base sur des chiffres arabes utilisés pour les premiers et quatrièmes rangs, et des lettres majuscules et minuscules attribuées pour les deuxièmes et troisièmes rangs, respectivement (fig.3) et non pas une structure protéique, une gamme d'hôtes ou même un mode d'action similaire. Ainsi, les protéines partageant moins de 45% d'identité se voient attribuer un rang primaire différent (un nombre arabe, par exemple, Cry1 et Cry2); deux protéines partageant de 45 à 78% d'identité se voient attribuer un rang secondaire différent (une lettre majuscule, par exemple, Cry1A et Cry1C); les protéines partageant moins de 95% d'identité se voient attribuer un rang tertiaire différent (une lettre minuscule, par exemple, Cry1Aa et Cry1Ab), et, finalement, pour pouvoir différencier les protéines partageant plus de 95% d'identité, un rang quaternaire est attribué (un nombre arabe, par exemple, Cry1Aa1 et Cry1Aa2) (Crickmore et al., 2020). Ce système de nomenclature est adapté aux δ -endotoxines (Cry et Cyt) et aux toxines *Bt* sécrétables (Vip et Sip).

Compte tenu l'importance des toxines Cry d'un point de vue commerciale, leurs diverses utilisations sont développées dans la partie suivante.

Les souches *Bt* produisent au moins 271 holotypes de toxine Cry (<https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/statistics/>)(https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/categorize_database_cry). Parmi lesquelles 128 possèdent une activité insecticide. Les biologistes ont choisi et commercialisé sous formes de bioinsecticides (spores produisant des cristaux contenant des combinaisons de toxines Cry) ou d'OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) une vingtaine d'entre elles à cause de leur action spécifique contre certains ravageurs.

Concernant les bioinsecticides, un certain nombre d'informations a déjà été données dans la partie « historique ». Mais vous trouverez ci-dessous une liste assez exhaustive des souches de *Bt* vendues, leur nom commercial, les toxines qu'elles produisent et les insectes ciblées (Tableau 1).

Les biologistes ont caractérisé 78 souches de *Bt* parmi lesquelles quatre sont choisies grâce à leur capacité de produire un mélange de toxines Cry capable d'intoxiquer les insectes cibles d'une façon très efficace ; Toutes les souches citées sont commercialisées comme bioinsecticide mais *kurstaki* (*Btk*) reste la plus importante, elle triomphe le commerce des bioinsecticides où son pourcentage de vente atteint 75%, ses capacités insecticides rendent service à l'agriculture biologique, aux maraichères et à la sylviculture.

Nom	Souche	Nom commerciale	Toxines	Cibles
<i>Bt subsp. kurstaki</i>	-ABT351 -SA11 -SA12 -PB54 -EG2348	-Dipel -Delfin -Belthirul	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry2Aa Cry2Ab	-Larves de lépidoptères
<i>Bt subsp. azawai</i>	-ABTS 1857 -GC-91	- Xentari	Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ca Cry1Da Cry2Ab Cry9Ea	- Larves de Lépidoptères
<i>Bt subsp. israelensis</i>	- AM65-52	- Vectobac	Cry4Aa Cry4Ba Cry10Aa Cry11Aa	- Larves de Diptères (moustiques et mouches noires)
<i>Bt subsp. morrisoni (tenebrioni)</i>	-NB176	-Novodors	Cry3A	- Larves de Coléoptères

Tableau 1: Liste des souches *Bt* présentes sur le marché avec leur nom commercial, ainsi que les toxines Cry produites par chacune d'elles et les insectes ciblées.

Informations issues des bases de données [BPDP: Bio-Pesticides Database](#) et [EU Pesticides database](#)

Concernant les OGM, les génomes de certaines plantes ont été modifiés par l'insertion d'un ou plusieurs gènes codant pour les toxines Cry insecticides. Différentes espèces de plantes OGM, comme le maïs, le coton, la pomme de terre ou le colza, sont cultivées dans plusieurs régions du globe terrestre, la plus grande surface de culture se trouvant en Chine. En 2013, des plantes OGM *Bt* ont été cultivées sur plus de 190 millions d'hectares, témoignant ainsi de l'efficacité des toxines Cry dans la destruction des ravageurs cibles ([isaaa-brief-53-2017](#)). Ces plantes présentent non seulement l'avantage de produire des toxines Cry en grande quantité et de façon constitutive mais ces dernières sont de plus déjà activées (seule le domaine N-terminal des toxines Cry est inséré dans le génome de la plante) alors que les toxines Cry produites par les spores sont sous la forme de protoxines enfermées dans les cristaux.

Cependant, malgré ces avantages indéniables, la culture des plantes OGM n'est pas autorisée partout dans le monde. Elles peuvent en effet être nocives, présenter des effets non intentionnels, développer des résistances.... La France, par exemple, a interdit la production de ces plantes en 2008.

vous trouverez ci-dessous un tableau récapitulatif des différentes toxines Cry de *Bacillus thuringiensis Bt* avec le nom des plantes dans lesquelles sont insérés un ou plusieurs gènes codant pour les toxines Cry et les insectes ciblées (**Tableau2**).

Famille de toxines	Plantes	Cibles (les larves de)
Cry1	Aubergine	Lépidoptères
Cry1, Cry2	Coton	Lépidoptères
Cry1,Cry3,Cry9,Cry34,Cry35	Maïs	Lépidoptères et Coléoptères
Cry3	Pomme de terre	Coléoptères
Cry1	Riz	Lépidoptères
Cry1	Soja	Lépidoptères
Cry1	Tomate	Lépidoptères

Tableau 2: Les diverses toxines Cry de *Bacillus thuringiensis Bt* et les plantes dans lesquelles sont insérés un ou plusieurs gènes codant pour les toxines Cry ainsi que les insectes ciblées.

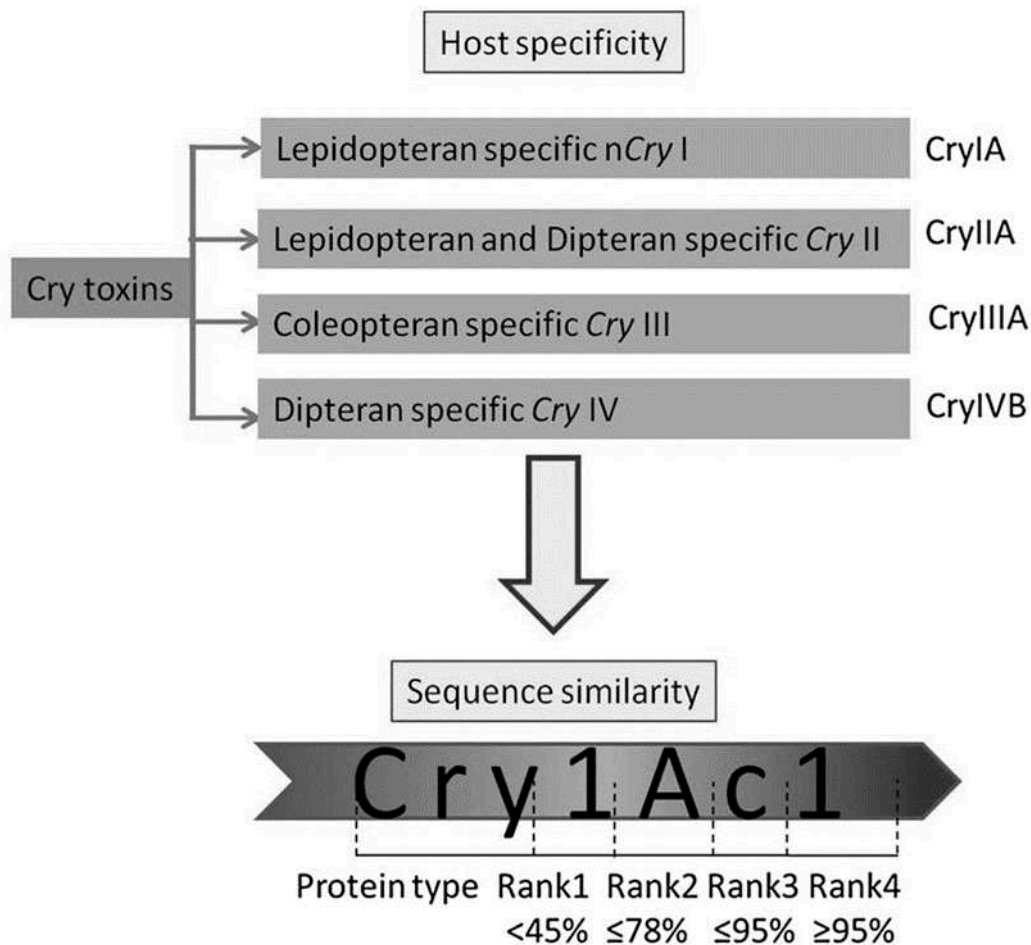


Figure 3: *Bt* et Nomenclature

Aperçu schématique de l'ancien système de nomenclature basé sur la supposée spécificité de toxicité (partie haute du schéma) et du système de nomenclature actuel (partie basse du schéma) utilisé par le comité de nomenclature des *Bt* pour les δ -endotoxines (Cry et Cyt) et les toxines sécrétées (Vip et Sip) basé sur les homologies de séquences. (Chattopadhyay & Banerjee, 2018)

1.4.2 Autres facteurs pathogéniques de *Bacillus thuringiensis*

D'autres δ -endotoxines en phase de sporulation sont produites par les différentes souches de *Bt* : ce sont les toxines Cyt codées par les gènes *cyt*. Ces toxines sont enfermées dans le même cristal que les Cry et possèdent des propriétés cytolitiques (hemolytique) contre les ravageurs diptères. À ce jour, le comité de nomenclature des toxines *Bt* (Crickmore et al., 2020) a classé les protéines Cyt en trois familles différentes, partageant toutes un haut niveau d'identité de séquence (Cyt1, Cyt2 et Cyt3 ; rang primaire) et présentent une toxicité principalement contre certains moustiques et mouches noires vecteurs de maladies humaines (Soberon, Lopez-Diaz et al., 2013). Les protéines Cyt interagissent directement avec les lipides membranaires non saturés des cellules et pénètrent dans la membrane pour former un pore, ne nécessitant donc

aucun récepteur spécifique (Chougule et al.2013). Les protéines Cyt ont également la capacité de synergiser l'activité insecticide d'autres toxines Cry, afin d'augmenter leur toxicité sur les insectes et réduire les niveaux de résistance des insectes à certaines protéines Cry (Soberon, Lopez-Diaz et al., 2013). Ces caractéristiques tendent à accroître l'intérêt des chercheurs pour ce type de toxines afin de développer des insecticides plus efficaces. Il est à noter que la souche *Btk* (objet d'étude de ma thèse) ne possède aucun gène *cyt*. Il n'y a donc pas de toxine Cyt dans les cristaux de *Btk* (Caballero et al., 2020).

A l'instar de *Bacillus cereus*, *Bt* est capable de produire des entérotoxines communes au groupe *B. cereus*. En effet, c'est le cas pour plusieurs hémolysines et entérotoxines pathogènes pour les vertébrés. Les entérotoxines Hbl, Nhe et Cytk de *Bacillus cereus* sont à l'origine d'intoxications alimentaires avec diarrhées (Berthold-Pluta et al., 2015 ; Ehling-Schulz et al 2019). *Bt* peut donc produire ces différentes entérotoxines (Johler et al., 2018 ; Ehling-Schulz et al 2019).

Bt fabrique un grand nombre de toxines au cours de son cycle de vie. La β exotoxine (aussi connue sous le nom de Thuringiensine) est une toxine thermostable (métabolite secondaire non protéique) présentant des propriétés insecticides, produite durant la phase végétative. Contrairement aux δ -endotoxines, la cible des β -exotoxines est non spécifique, affectant également les mammifères et les insectes ravageurs. Il est bien établi que les β -exotoxines jouent un rôle négatif dans la biosynthèse de l'ARN (Chattopadhyay & Banerjee, 2018). Ainsi, la présence de β -exotoxines est interdite dans les produits *Bt* commerciaux (WHO report, 1999). Au cours de la phase de croissance végétative de *Bt*, certaines souches produisent des protéines qui sont sécrétées dans le milieu et se sont révélées avoir des propriétés insecticides. Ce sont les protéines insecticides végétatives (Vip) et la protéine insecticide sécrétée (Sip), qui ont pour cible aussi le tube digestif (formation de pores dans les membranes des cellules intestinales). Sur la base de la séquence d'acides aminés, les protéines Vip peuvent être divisées en quatre familles différentes communément nommés : Vip1, Vip2, Vip3 et Vip4(Crickmore et al., 2014) (Fig.4). Les protéines Vip1 et Vip2 sont des toxines binaires spécifiques des coléoptères et des hémiptères. En revanche, les protéines Vip3 sont des toxines à chaîne unique (non binaires) avec une activité insecticide contre une grande variété d'espèces de lépidoptères (Palma et al., 2014). En ce qui concerne la toxine Sip, c'est une protéine sécrétée moins bien caractérisée sans similitude en acides aminés avec les protéines Vip et qui a montré une activité insecticide contre les coléoptères nuisibles (Fig.4). Comme les toxines Cyt et Vip, un changement de conformation dans la séquence d'acides aminés convertit la toxine Sip inactive en une toxine active (Palma et al., 2014).

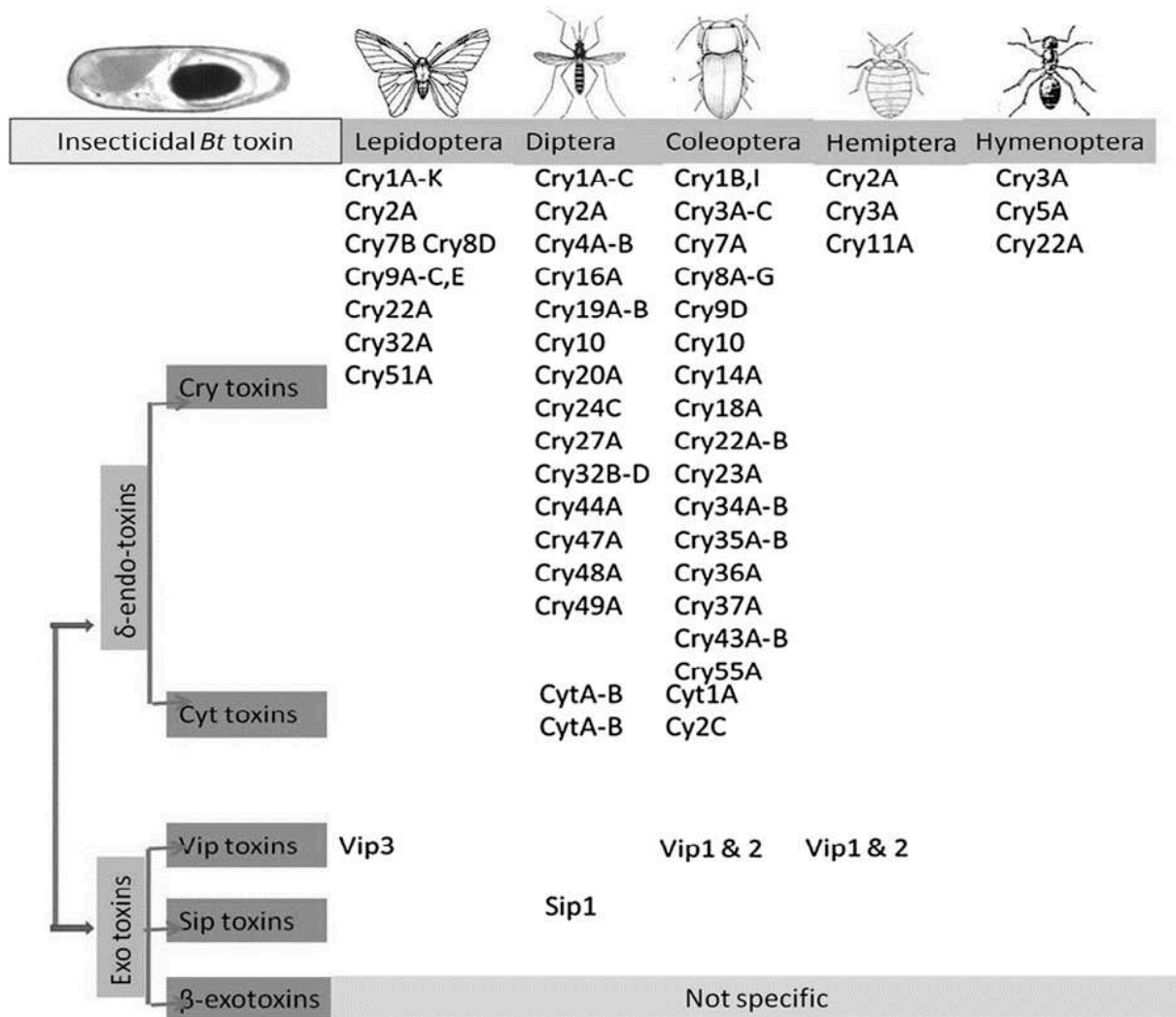


Figure 4: Représentation schématique de la classification des toxines insecticides de *Bt* avec exemple de toxines et de leur ravageur cible dans chaque classe (Chattopadhyay & Banerjee, 2018)

1.5 Mécanisme d'action des protéines de la famille des Cry1 chez les Lépidoptères

Deux modèles ont été proposés pour décrire le mode d'action des toxines Cry dans les cellules intestinales : i) la formation des pores dit "modèle de Bravo" et ii) la signalisation cellulaire ou modèle alternatif. Dans cette partie, les toxines de la famille **Cry1A seront particulièrement décrites** comme elles sont présentes dans le produit commercial utilisé pendant ce travail de thèse.

Pour produire des toxines biologiquement actives, les protoxines sont solubilisés dans l'intestin des insectes, et cette première étape est commune aux deux modèles cités ci-dessus.

La solubilisation du cristal s'effectue grâce à l'environnement intestinal alcalin (pH>8) (Hofmann et al., 1988a) induisant la destruction des ponts disulfures intermoléculaires et la libération des protoxines (d'environ 130 kD) dans la lumière intestinale. Ceci permet aux enzymes protéolytiques intestinales de digérer ces protoxines (Tojo, 1983), produisant ainsi des toxines actives (d'environ 65-67kD). Les lépidoptères possèdent des protéases intestinales de différents types mais celles permettant l'activation des protoxines sont des trypsines (Milne & Kaplan, 1993) ou chymotrypsine (Peterson et al., 1995). C'est le domaine C-terminal qui est enlevé de la protoxine car il intervient dans la formation du cristal mais pas dans la toxicité (Choma et al., 1990). Un clivage supplémentaire intervient à l'extrémité N-terminal de la protoxine (Alejandra Bravo et al., 2007). Les formes activées des toxines Cry sont très stables et résistent aux autres digestions enzymatiques (Choma et al. 1990 ; Bravo et al., 2004).

Modèle dit de « Bravo »

Ce modèle « de formation de pores » reste largement adopté par les scientifiques pour décrire le mécanisme d'action des toxines Cry. La protéine Cry se lie à plusieurs récepteurs cellulaires en suivant une séquence d'événements précis : tout d'abord elle oligomérisse avant de s'insérer dans la membrane pour former un pore (Bravo et al., 2004). Le modèle Bravo se base particulièrement sur la protéine Cry1Ab. Après l'étape de la solubilisation, les toxines activées traversent la membrane péritrophique (couvrant les entérocytes) et atteignent la partie apicale au niveau des microvillosités des entérocytes où elles interagissent avec leurs récepteurs. Une première liaison se réalise entre la protéine activée sous forme de monomère et des récepteurs ancrés à la membrane par un glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) de type aminopeptidase (APN) ou phosphatase alcaline (ALP). Suite à cette liaison, la protéine Cry1Ab se lie à un récepteur de la famille des cadhérines dénommé par les entomologistes BT-R1 pour Bt-

Receptor1 (glycoprotéine : 210 Kda). Bt-R1 est un récepteur de liaison hautement spécifique et sélectif à la toxine Cry1Ab. Ce récepteur est également responsable de l'oligomérisation de Cry1Ab (Liu et al., 2018 ; Gómez et al., 2001 ; Gómez et al., 2003). Grâce à l'interaction entre la toxine Cry1A et BT-R1, le clivage protéolytique de l'hélice $\alpha 1$ du domaine I est facilité. L'hélice $\alpha 1$ est située à l'extrémité N-terminale, entraînant un changement de conformation de la protéine aboutissant à l'induction d'une oligomérisation et ce qui confère à la protéine une structure pré-pore (Alejandra Bravo et al., 2013). L'augmentation de l'affinité entre l'oligomère et les récepteurs membranaires APN et ALP est alors assurée. Grâce à cette forte liaison, l'oligomère peut facilement s'insérer dans la membrane plasmique. Un pore se forme alors provoquant la lyse osmotique de la cellule (Pardo-López et al., 2013) (Fig.5).

Modèle de la signalisation cellulaire/modèle alternatif

Ce second modèle se résume à une simple liaison entre les toxines et un récepteur cadhérine, activant une voie de signalisation intracellulaire aboutissant à la mort cellulaire. L'oligomérisation et la formation de pores membranaires ne sont pas décrites (Zhang et al., 2006) : la liaison entre la toxine Cry1A activée et le récepteur cadhérine est sous forme de monomère. Le résultat de cette liaison se traduit par l'activation des voies de signalisations Mg^{2+} -dépendantes et de la protéine G ancrée adénylate-cyclase-dépendante, permettant l'augmentation du niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et l'activation de protéine kinase A (Pigott & Ellar, 2007). Les conséquences de ces changements intracellulaires se résument par la déstabilisation du cytosquelette de la cellule et des canaux ioniques et enfin la mort de la cellule par apoptose (Vachon et al., 2012) (Fig.6).

Les différents modèles proposés confirment que l'ingestion de spores de *Bt* aboutit rapidement à des altérations cellulaires, ainsi l'épithélium intestinal est détruit quelques heures plus tard. En plus, les spores sont capables de germer dans l'intestin et d'envahir l'hémolymphe, induisant ainsi une septicémie menant à la mort de l'insecte dans les 24-72 heures qui suivent l'intoxication (Raymond et al., 2010 ; Soberón et al., 2009).

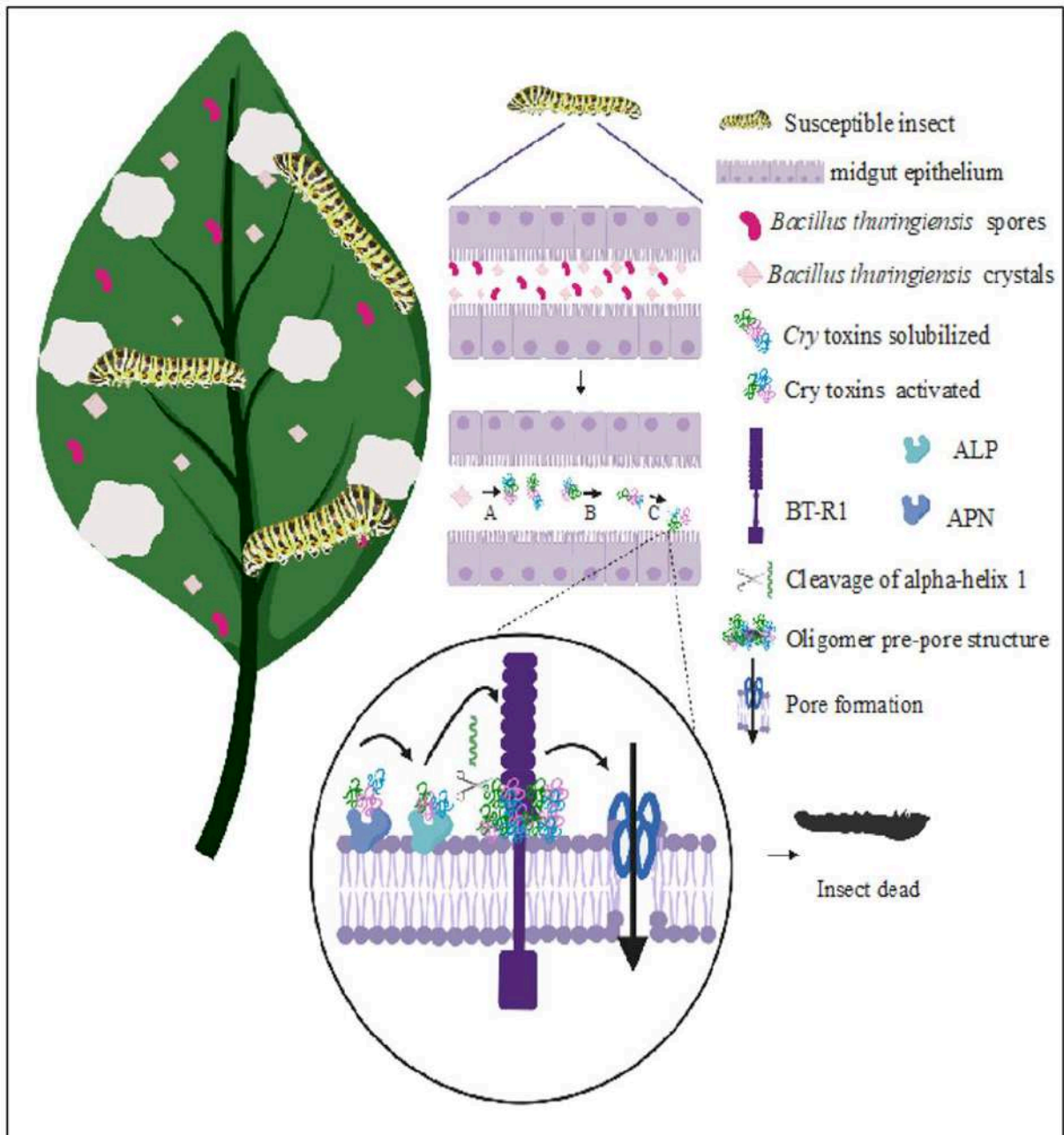


Figure 5: Modèle de liaison séquentielle (mode d'action classique dit modèle de Bravo) de la toxine Cry1Ab montrant l'activation de la toxine, la liaison avec des récepteurs spécifiques, la formation de pores et la mort subséquente des larves d'insectes. (Mendoza-Almanza et al., 2020)

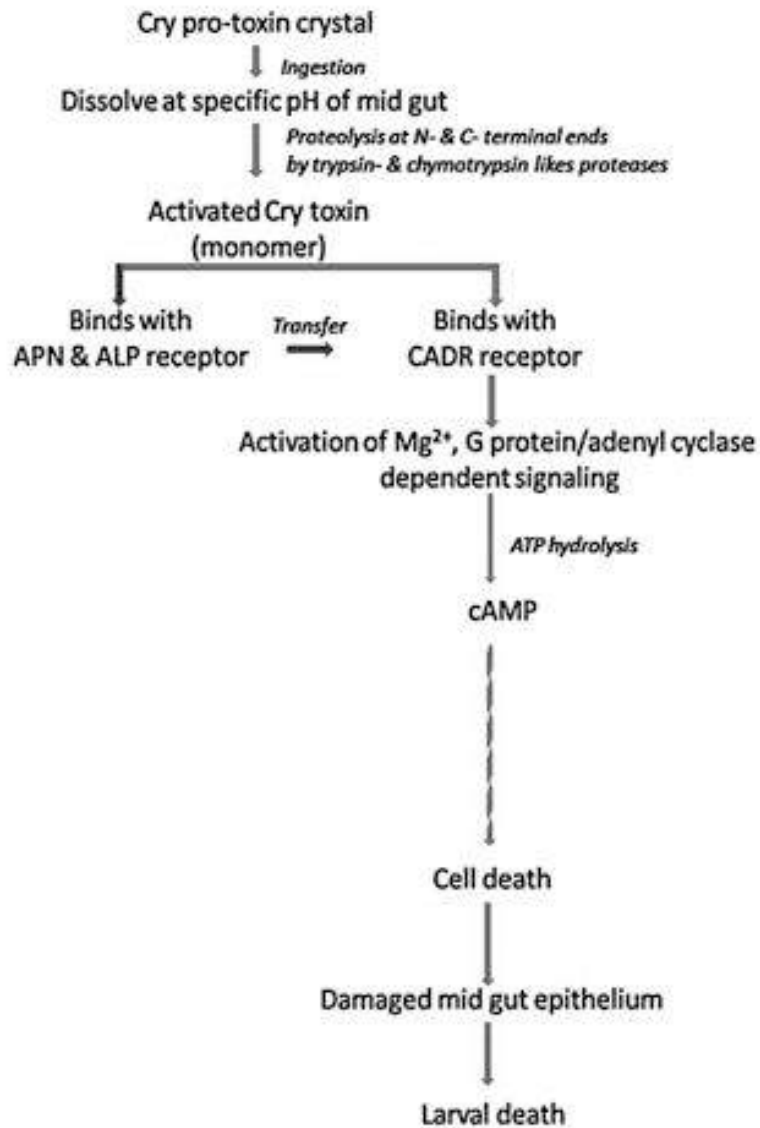


Figure 6: Le modèle de voie de signalisation (mode d'action alternatif) de la toxine Cry montrant l'attachement de la toxine Cry au récepteur cadhérine (CADR receptor) qui accélère les événements des voies apoptotiques intracellulaires. (Chattopadhyay & Banerjee, 2018)

1.6 Persistance et survie des cellules végétatives et des spores de *Bt*

L'atout de *Bt* ne se limite pas à la lutte contre divers insectes ravageurs (Lépidoptères et Coléoptères pour la plupart) en agriculture conventionnelle ou biologique. Il est aussi utilisé en sylviculture dans la lutte contre la chenille processionnaire du pin (*Thaumetopoea processionea*) et dans la lutte anti-vectorielle contre les larves de moustiques (des genres *Aedes* et *Culex*). Les produits *Bt* pouvant être épandus par des moyens terrestres ou aériens. A cause de l'accroissement de leur utilisation, ils sont fortement présents dans les trois sources potentielles de contamination pour l'Homme que sont l'air, l'eau et la nourriture. Les spores et cristaux de toxines de *Bt* (représentant à 50% à 85% du produit final) sont les constituants fondamentaux des produits *Bt* mais, pour augmenter la mouillabilité et la dispersion des produits lors de l'épandage, on ajoute des adjuvants comme l'acide naphthalène-1-sulfonique. De plus, le renouvellement de traitement est courant à cause de l'instabilité des cristaux dont la demi-vie est estimée à 5-7 jours dans les champs (Hung et al., 2016). Jusqu'à 8 traitements espacés d'une semaine sont autorisés par l'EU (SANCO/1541/08 – rev. 4). Ceci aboutit à l'accumulation des spores dans l'environnement et l'accroissement de la charge bactérienne. Il apparaît donc légitime de s'interroger sur les effets réels, à court et long termes, de l'exposition aux produits *Bt*, même à faibles doses, pour la santé des organismes non-cibles et pour l'environnement.

L'importance de *Bt* comme bioinsecticide exige d'étudier sa persistance dans l'environnement. A l'état naturel, *Bt*, qui est une bactérie sporulée, se trouve dans plusieurs endroits : dans les sols, l'eau, sur le feuillage des plantes et dans le cadavre d'insectes. La persistance naturelle de *Bt* dans l'environnement est surtout sous forme de spores, le passage à la forme végétative (germination lors de conditions environnementales favorables) est rare (Raymond & Federici, 2017). Les chercheurs ont montré que la germination et la multiplication de *Bt* se réalisent principalement dans l'intestin des espèces cibles (Raymond & Federici, 2017). Plusieurs études se sont intéressées à la persistance des spores de *Bt* dans l'environnement. 72 heures après avoir pulvérisé des blettes avec un bioinsecticide *Bt*, presque toutes les spores se retrouvent à la surface des feuilles (Bizzarri & Bishop, 2008). D'autres études ont aussi démontré que *Bt* met 28 jours à disparaître de la surface de feuilles de chou traitées (Raymond, Wyres, et al., 2010). Après démoustication par des bioinsecticides *Bt*, des spores de *Bt* ont été retrouvées aux doses proches des doses de traitement pendant au moins 10 semaines voire, à certains endroits, plusieurs années après pulvérisation (Tilquin et al., 2008). Enfin, *Bt* peut résister un an dans le

sol (Vettori et al., 2003). L'une des études effectuées sur la persistance de *Bt* montre que ce dernier est capable de persister dans le sol quatre ans après son application (Van Cuyk et al., 2011). La persistance de *Btk* est donc variable et dépend considérablement des conditions environnementales. La demi-vie des cristaux de Cry1A a été estimée à environ 1 semaine dans le sol (Hung et al., 2016).

La persistance de *Bt* dans le tube digestif de nombreux organismes est largement démontrée : la durée de vie des bactéries *Btk* dans l'intestin de drosophile ayant ingérée une alimentation traitée par les produits *Btk* (aux doses d'usage en agriculture biologique) est au moins de 6 jours (données non-publiée de l'équipe) et dans celui d'une souris elle peut atteindre 30 jours (Oliveira-Filho et al., 2009). Les spores persisteraient au moins 18 jours dans l'intestin de rats à la flore intestinale humanisée (Wilcks et al., 2006) tandis que dans celui de la souris cette durée peut atteindre 30 jours (Oliveira-Filho et al., 2009). Enfin l'analyse d'échantillons fécaux d'agriculteurs qui utilisaient le bioinsecticide a montré la présence de spores de *Btk* 5 jours après l'arrêt de l'utilisation (Jensen et al., 2002). La capacité de persistance des spores de *Bt* dans l'environnement et dans l'intestin pourrait avoir des méfaits sur le développement et la santé de nombreux organismes non-cibles, tels des intoxications alimentaires, le développement de physiopathologies intestinales chroniques ou voire même l'apparition de cancer. Récemment, notre équipe a révélé que si ce sont des bactéries végétatives qui sont ingérées, et non pas des spores, elles sont éliminées rapidement de cet organe grâce à la mise en place des mécanismes de défense de l'intestin (Loudhaief et al., 2017 ; Benguettat et al., 2018).

1.7 Effets non intentionnels

1.7.1 Effets non intentionnels de bactéries/spores de *Bt*

Aucune toxicité aiguë aux doses d'usage agricole n'a été observée envers les espèces non cibles sur une courte période (Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016). Les données sont rares sur les effets nocifs pouvant résulter d'une **exposition prolongée à faible dose (toxicité chronique) des bioinsecticides *Bt***. Cependant, des études récentes ont montré que quel que soit leur mode d'utilisation (bioinsecticides ou OGM), *Bt* et/ou ses toxines se retrouvent dans l'environnement (Raymond, Wyres, et al., 2010 ; Tank et al., 2010 ; Tilquin et al., 2008). La forme végétative de *Btk* peut être source d'effets non intentionnels sur les organismes non-cibles. Un tel impact peut avoir des conséquences à long terme pour la santé intestinale d'un organisme, impactant sa longévité. Plusieurs raisons nous poussent à remettre en cause le dogme que les bioinsecticides *Bt* n'ont pas ou peu d'effets sur les organismes non cibles. En effet, il a été

démontré récemment dans mon équipe qu'une exposition chronique au bioinsecticide *Btk* (sous forme végétative et sous forme de spores) ciblant les larves de lépidoptères, est capable de réduire la longévité des drosophiles adultes (Loudhaief et al., 2017 ; Joly, Soltys et Rousset, données non publiées). De plus, après l'ingestion de nourriture contaminée par des produits *Btk* à des doses 10 à 100 fois supérieures aux doses agricoles, une très forte mortalité des larves de différentes espèces de drosophile a été observée (Babin et al., 2020). Les membres de mon équipe ont aussi récemment démontré que l'ingestion de bioinsecticides *Btk* aux doses agricoles par des larves de drosophile induisait des défauts de croissance et un retard de développement. Ces impacts passent par une perturbation des capacités digestives de l'intestin suite à la mort d'entérocytes provoqués par le bioinsecticide (Nawrot-Esposito et al., 2020).

Les conséquences négatives de la persistance de *Bt* sur la santé humaine et animale pourraient être nombreuses : développement de physiopathologies intestinales aiguës, d'état pro-inflammatoire pouvant aboutir au développement de maladies inflammatoires intestinales chroniques de type Crohn ou colite ulcéreuse. Dans certains cas, cela peut même dégénérer en cancers. En effet, la présence répétée de bactéries non commensales (dites allochtones) dans l'intestin des mammifères et des invertébrés est à l'origine de pathologies. Les bactéries du groupe *B. cereus* sont considérées comme des bactéries infectieuses chez les mammifères. De fait, *Bt* pourrait être impliqué dans certaines de ces pathologies lors de sa consommation chronique même à faible dose. De plus, lors de pathologies attribuées à des bactéries du groupe *B. cereus*, l'identification précise du germe en cause n'est jamais faite par les laboratoires de microbiologies médicales ou vétérinaires. Les laboratoires définissent alors le germe responsable comme appartenant au groupe *Bacillus cereus sensu lato*. Ainsi, l'implication de *Bt* dans des pathologies pourrait être sous-estimée. En accord, *Bt* est fortement suspecté d'être responsable de 20% des intoxications alimentaires imputées à *B. cereus* (Mathilde Bonis et al., Laboratoire de Sécurité des Aliments, Maisons-Alfort, données soumises à publication). Une étude canadienne a accompli l'analyse de 39 cas de toxi-infections alimentaires imputées à *B. cereus*, et a identifié *Bt* dans 4 cas (10%) ainsi qu'une contamination mixte (*Bt* et *B. cereus*) dans 11 cas (McIntyre et al., 2008)

Bt a aussi été identifié dans le cadre d'infections ou de surinfections pulmonaires chez la souris et chez l'Homme (Barfod et al., 2010; Ghelardi et al., 2007), ainsi que dans des cas d'infections nosocomiales avec complication respiratoire ou diarrhée chez l'Homme (Bottone, 2010; Celandroni et al., 2014). D'une autre côté, une étude faite en Nouvelle-Zélande a montré que

parmi 300 individus présents dans une zone de traitement aériens par *Btk*, 61 % souffraient de diarrhées et de maux d'estomac.

De plus *Bt* possède la capacité de résistance naturelle a un grand nombre d'antibiotiques parmi lesquels ceux appartenant à la famille des pénicillines ce qui rend le traitement des malades compliqué. Des perturbations intestinales chez l'abeille peuvent aussi être causées par les bioinsecticides *Bt*. En effet, des modifications de certaines activités enzymatiques impliquées dans la détoxification des xénobiotiques ou le métabolisme énergétique ont été observées (réduction de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et augmentation de l'activité de l'alkaline phosphatase (ALP) et de la glyceraldehyde-3- phosphate déshydrogénase (GAPD)) (Renzi et al., 2016). Ajoutons à cela les changements comportementaux chez le trichogramme (petit hyménoptère parasitoïde, également employé en lutte biologique)

1.7.2 Effets non intentionnels des toxines

Les toxines Cry exprimées dans les plantes transgéniques, fournissent une méthode puissante pour protéger les cultures contre les ravageurs. Ces toxines ne sont généralement pas toxiques pour les mammifères. Elles sont considérées comme respectueuses pour l'environnement car elles touchent relativement peu d'espèces d'insectes en raison de leur degré élevé de spécificité. Cependant, la présence d'une toxine Cry produite par des OGM *Bt* (Cry 1Ab) dans le sang de femmes enceintes suite à une exposition à ces OGM révèle que cette toxine peut pénétrer dans le placenta et se retrouver dans le fœtus (Mueller & Gorst, 2012). La présence Cry1Ab dans les eaux de ruissèlement induirait une mortalité très élevée et un retard de croissance d'espèces de trichoptères à vie larvaire aquatique (Rosi-Marshall et al., 2007; Tank et al., 2010). De même, une génotoxicité (avec retard de développement) des toxines Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2A présentes dans l'eau d'élevage du poisson zèbre a été démontrée, quand elles sont ajoutées à l'eau d'élevage à des doses situées entre 25 et 150 mg/L durant 96 heures (Grisolia et al., 2009). De plus, des traitements de daphnies par des toxines Cry1Ab et Cry2Aa ont montré une mortalité élevée, une réduction de la taille du corps et une diminution de la fécondité (Bøhn et al., 2016).

D'après toutes ces études on peut supposer que l'utilisation accrue des bioinsecticides *Btk* puisse induire des effets indésirables sur plusieurs espèces non cibles dont l'Homme. Il ne faut pas négliger la virulence opportuniste de *Btk* pour de nombreux organismes et surtout ceux qui souffrent de stress nutritionnel, de dysbiose ou dont l'immunité innée est compromise. La

plupart des études citées ci-dessus s'appuyait sur des tests de toxicité aiguë et d'évaluations épidémiologiques. En outre, si elles démontrent bien des impacts inopportuns de *Bt*, il manque encore des études systématiques réalisées avec un ou des modèles de laboratoire avérés. Pourtant, les informations acquises suggèrent qu'une incidence sur la santé publique et sur l'environnement peut être causée par une exposition chronique à des bioinsecticides *Bt*. On sait bien qu'avec l'augmentation de l'utilisation des bioinsecticides *Bt* et de leur dispersion environnementale leur présence sera croissante dans l'air, dans l'eau et dans la nourriture, trois sources de contamination potentielles pour la faune et l'homme. Il faut prévenir les menaces d'une exposition chronique aux bioinsecticides *Bt* par des études mécanistiques approfondies.

Chapitre 2 : La drosophile, un modèle d'étude émergent pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires régulant l'homéostasie intestinale

2.1 Choix du modèle



L'espèce la plus connue des drosophiles, *Drosophila melanogaster* communément appelée la « mouche du vinaigre », appartient à la famille des diptères. Les femelles de cette petite mouche mesurent environ 3 à 4 millimètres de long et les mâles plus petits mesurant 3 millimètres (Fig.7). Cette mouche est notamment attirée par les fruits mûrs et ou abimés dans lesquels elle pond ses œufs. De couleur brun jaune aux yeux rouges vifs avec des anneaux transversaux noirs sur l'abdomen, elle est devenue dès le 19^{ème} siècle un des principaux organismes modèles des recherches en génétique et en biologie du développement pour diverses raisons :

- ✓ Elle occupe peu de place dans un laboratoire
- ✓ Son élevage est peu couteux et simple
- ✓ Son cycle de reproduction (de l'embryon à l'adulte) est relativement court (environ 12 jours à 25°C, un mois à 18°C) et son potentiel reproducteur est important, les femelles peuvent pondre jusqu'à 400/500 œufs en dix jours
- ✓ Son génome a été entièrement séquencé et constamment affiné, ce qui représente un grand avantage pour les études de génétique.
- ✓ De nombreux outils génétiques bien développés disponibles pour la manipulation et l'analyse des données.

La drosophile adulte présente l'avantage d'être insensible en terme de toxicité aigüe aux bioinsecticides *Btk* commercialisés, ce qui nous permet d'étudier les effets d'intoxications subchroniques et chroniques à ces bioinsecticides (Frankenhuyzen,2009 ; Gill & Ellar, 2002). De plus, la conservation des mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant la physiologie

et l'immunité intestinale entre la drosophile et les mammifères (Bonfini et al., 2016 ; Panayidou & Apidianakis, 2013 ; Pasco et al., 2015) nous a aussi encouragé à caractériser les effets d'une exposition aigüe et chronique à *Btk* sur la physiologie intestinale. En effet, la drosophile est devenue récemment un modèle de choix privilégié par les chercheurs pour identifier les voies de signalisation et les déterminants moléculaires contrôlant l'homéostasie ou la régénération intestinale suite à des infections par des agents pathogènes comme les bactéries *Pseudomonas* (Apidianakis & Rahme, 2011). De même, les altérations de la flore intestinale chez la drosophile peuvent induire une dysbiose comme chez l'homme qui peut être à l'origine de certaines maladies inflammatoires et métaboliques (Jasper, 2020).

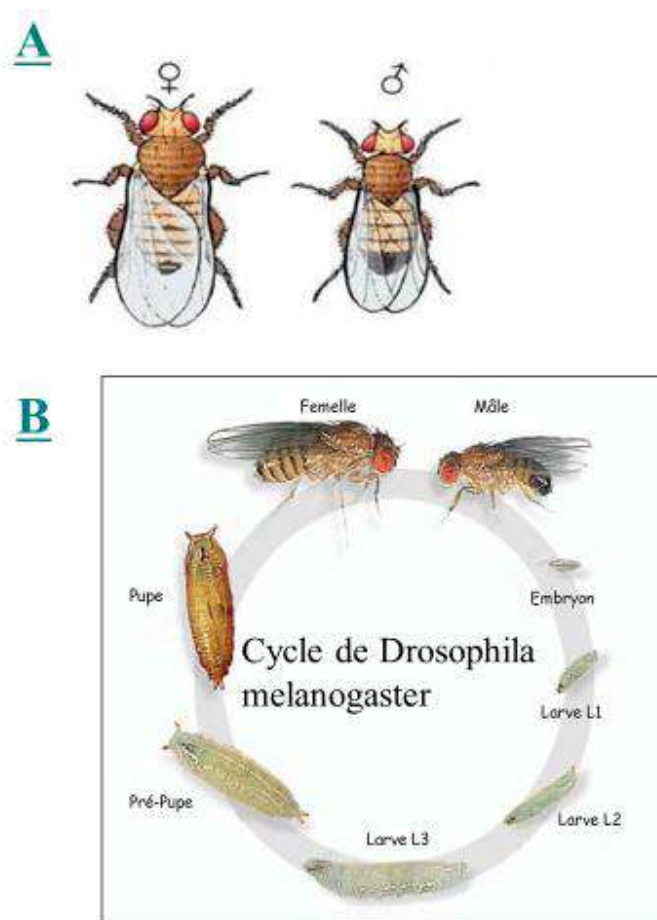
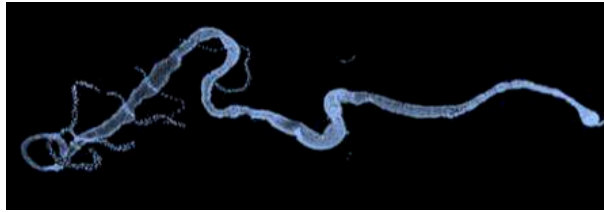


Figure 7: *Drosophila melanogaster* et cycle de vie.

A : *Drosophila melanogaster* (femelle et mâle). Les mâles ont la partie arrière de leur corps plus foncée. **B :** présentation schématique du cycle de vie de la drosophile à 25°C : Après fécondation, le développement embryonnaire va conduire, après 22h, à l'éclosion d'une larve, dite de stade 1 (L1). La larve va ensuite croître au travers de deux mues successives toutes les 72h, pour donner les larves L2 puis L3 respectivement. La larve L3 va ensuite s'immobiliser et former la pupa, dans laquelle se déroule la métamorphose. Après 6 jours, l'adulte, ou imago, sort de la pupa

2.2 Le système digestif chez la drosophile adulte : fonction et organisation



2.2.1 Fonction de l'intestin

L'intestin est un organe vital impliqué dans de multiples fonctions physiologiques :

1. La digestion des aliments et l'absorption des nutriments essentiels à la viabilité des cellules de l'organisme.
2. La première ligne de défense immunitaire contre une grande variété d'agents pathogènes ingérés
3. Un modulateur à distance de la fonction d'autres organes comme le pancréas et le cerveau (chez les mammifères) via la sécrétion des peptides et hormones agissant systématiquement ([Bewick, 2012](#))

2.2.2 Organisation structurelle de l'intestin de la drosophile adulte

Le tractus digestif de la drosophile adulte est composé de trois principales régions : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur qui exercent des fonctions différentes ([Royet, 2011](#)).

- ✓ L'intestin antérieur (foregut) provient de l'ectoderme. C'est un tube court qui comprend la bouche et l'œsophage, ce dernier se connecte aux glandes salivaires et le "crop", cette dernière structure sert pour le stockage temporaire des aliments avant leur déplacement vers la lumière intestinale ([Miguel-Aliaga et al., 2018](#)) ([Fig.8](#)).
- ✓ L'intestin moyen (midgut) d'origine endodermique est l'équivalent de l'intestin grêle chez les mammifères. Le midgut est subdivisé en trois parties : le "midgut" antérieur, la zone acide dite des "copper cells" (partie intermédiaire) et le "midgut" postérieur. Le midgut permet la digestion et l'absorption des nutriments. Le proventricule constitue l'extrémité antérieure de l'intestin moyen antérieur, son rôle est d'assurer le déclenchement de la dégradation mécanique de la nourriture ingérée ([King, 1988](#)). En plus, le proventricule synthétise une membrane riche en chitine appelée matrice/membrane péritrophique (PM) qui tapisse la partie apicale de l'épithélium

intestinale (coté lumière intestinale) et le sépare du bol alimentaire. Fonctionnellement, la PM est l'analogue du mucus dans l'intestin des mammifères et elle forme une barrière physique pour protéger l'épithélium des microbes nocifs et des particules alimentaires abrasives (Kuraishi et al., 2011). L'intestin moyen est entouré par les muscles viscéraux (VM). Il est aussi innervé à ces deux extrémités antérieures et postérieures (Fig.8).

- ✓ L'intestin postérieur (hindgut) dérive de l'ectoderme et il est l'analogue du gros intestin chez les mammifères. Il permet la rétention de l'eau et des électrolytes et élimine les déchets dans le rectum. Le lieu où les tubules malpighiens (TM, équivalent des reins), sont reliés constitue la frontière entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur. En absorbant les électrolytes et en les libérant ultérieurement dans l'intestin postérieur, les TM ajustent les concentrations ioniques de l'hémolymphe (Fig.8).

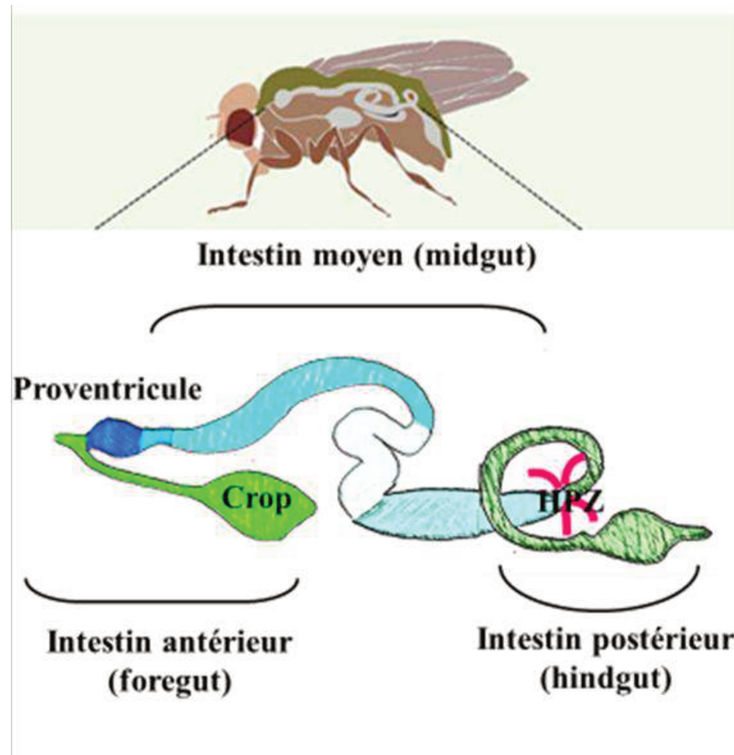


Figure 8: Organisation structurelle de l'intestin de la drosophile adulte.

L'intestin adulte de la drosophile est composé de trois régions principales :

1. L'intestin antérieur contenant l'œsophage, le proventricule (bleu saphir) qui est situé à la jonction entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen (cyan, blanc, bleu ciel), et le Crop (vert)
2. L'intestin moyen, principal site de digestion et d'absorption des nutriments (qui est subdivisé en trois parties : le "midgut" antérieur (cyan), la zone acide dite des "copper cells" (blanc) et le "midgut" postérieur (bleu ciel),
3. L'intestin postérieur (Vert mousse),

Les tubules de Malpighi (Rose) sont connectés au système intestinal à la jonction entre l'intestin moyen et postérieur proche de la « Hindgut Prolifération Zone » (HPZ).

2.2.3 La composition cellulaire de l'intestin moyen

L'épithélium de l'intestin moyen de la drosophile est une monocouche cellulaire, composé de six types de cellules : les cellules souches intestinales (ISC), les cellules progéniteurs (issus de la division asymétrique des ISC) qui vont elles-mêmes se transformer soit en entéroblastes (EB) qui deviennent à leur tour des entérocytes (EC), soit en précurseurs de cellules entéroendocrines (EEP) qui se différencient ensuite en cellules entéroendocrines (EEC) (Pasco et al., 2015 ; Joly & Rousset, 2020) (fig.9)

Les cellules souches intestinales (ISC) chez la drosophile adulte sont des petites cellules diploïdes. Elles ont été découvertes par les laboratoires de Perrimon et de Spradling en 2006 (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006). Les ISC sont les seules cellules identifiées jusqu'à présent comme capables de se diviser une fois par jour. Les approches de

lignage cellulaire ont démontré que les ISC donnent naissance à tous les types cellulaires présentes dans l'épithélium intestinal (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006). L'ISC est caractérisée par l'expression du facteur de transcription Escargot (Esg) et le ligand de la voie de signalisation Notch, Delta (Dl). C'est une cellule mitotique et multipotente qui se présente tout le long de la membrane basale (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006). En effet, par division asymétrique, les ISC donnent naissance à des progéniteurs de deux types : 1) les **EB** exprimant le marqueur SU(H) et incapables de proliférer, ils se trouvent dans un état indifférencié transitionnel avant de se différencier en EC; 2) les **EEP** positifs pour les marqueurs Esg, Dl, et Prospero (Pros, un facteur de transcription pro-neural qui marque spécifiquement les EEP et les EEC), capables occasionnellement de subir un cycle de division et qui eux vont se différencier en EEC.

Les entérocytes (EC) sont des cellules polyploïdes qui constituent 90% de l'épithélium de l'intestin moyen. Les EC sont des cellules post-mitotiques et hautement différenciées. Leur rôle est d'assurer la digestion (par la sécrétion d'enzymes digestives), l'absorption des nutriments et la production des peptides anti-microbiens. Ces cellules expriment le facteur de transcription Pdm1 également connu sous le nom de Nubbin (Beebe et al., 2010 ; Lee et al., 2009 ; Mathur et al., 2010 ; Tang et al., 2018). Pdm1/Nubbin est l'homologue des facteurs Pou/Oct chez les mammifères (Holland et al., 2007 ; Tantin, 2013). Le transgène driver *myo1A-Gal4* est aussi un excellent marqueur des EC chez la drosophile.

Les cellules entéroendocrines (EEC) sont des cellules post-mitotiques sécrétrices, situés dans diverses régions de l'intestin moyen, insérées entre les EC, et caractérisées par l'expression du facteur de transcription Pros (Ohlstein & Spradling, 2006). Ces cellules jouent un rôle très important qui se résume par la sécrétion de divers hormones et peptides impliqués dans l'immunité, la régulation des fonctions intestinales, le métabolisme locale et systémique, le comportement alimentaire (Tableau 3). Certains des peptides sont colocalisés dans des sous-populations d'EEC (Chen et al., 2016). Par exemple, Allatostatin C (Ast-C) et Orcokinine B sont colocalisés dans l'intestin moyen antérieur, Allatostatin A (Ast-A) et Ast-C sont colocalisés dans l'intestin moyen postérieur, Diuretic hormone 31 (DH31) et Tachykinin (TK) dans la partie postérieure (Chen et al., 2016), et les TK peuvent également être observées dans les EEC de l'intestin postérieur et antérieur (Fig.10). Les EEC peuvent être classées en quatre catégories différentes, marquées par l'expression combinées de neuropeptides spécifiques (Beehler-Evans & Micchelli, 2015). Les cellules EEC du classe I expriment Allatostatin B (Ast-B/MIP) et Ast-C ; les cellules EEC du classe II exprimant Ast-C sont présentes dans la partie antérieure de l'intestin moyen postérieur, tandis que les EEC de classes III qui expriment Ast-A et Ast-C et

de classe IV qui expriment TK et DH31 sont localisées dans la partie distale de l'intestin moyen postérieur.

Peptides enteroendocrines	Fonctions connues chez la drosophile
Allatostatin A (Ast-A)	Recherche de nourriture, alimentation, métabolisme et sommeil (Chen et al., 2016 ; Donlea et al., 2017 ; Hentze et al., 2015 ; Wang et al., 2012)
Allatostatin B (Ast-B/MIP)	Satiété des mouches adultes, mues (Kim et al., 2006 ; Min et al., 2016).
Allatostatin C (Ast-C)	Nociception et immunité
Bursicon alpha	Quiescence locale ISC (Scopelliti et al., 2014). Homéostasie métabolique (Scopelliti et al., 2019).
CCHamide-1	Perception des odeurs (Farhan et al., 2013). Activité et sommeil (Fujiwara et al., 2018).
CCHamide-2	Augmente la motivation à se nourrir.
Diuretic hormone 31 (DH31)	Péristaltisme, spasmes viscéraux pour l'expulsion des bactéries opportunistes (Benguettat et al., 2018 ; La jeunesse et al., 2010). Séduction masculine et le contrôle circadien du sommeil (Kunst et al., 2014).
Neuropeptide F (NPF)	Recherche de nourriture, perception des odeurs alimentaires, alimentation (Chung et al., 2017 ; Pu et al., 2018 ; Wang et al., 2016 ; Wang et al., 2013), sensibilité à l'alcool (Guevara et al., 2018), stress (Xu et al., 2010), accouplement et reproduction (W. J. Kim et al., 2013) et sommeil (Chung et al., 2017).
Orcokinin-B	Pas connu
Tachykinin (TK)	Modulation présynaptique des apports olfactifs dans le lobe antennaire (Ignell et al., 2009), contrôle de l'agressivité chez les mouches mâles (Asahina et al., 2014), et métabolisme lipidiques dans l'intestin .
Dilp3	Prolifération des ISC (Dutta et al 2015)

Tableau 3: Les différents neuropeptides exprimés dans les EEC de l'intestin moyen de la Drosophile.

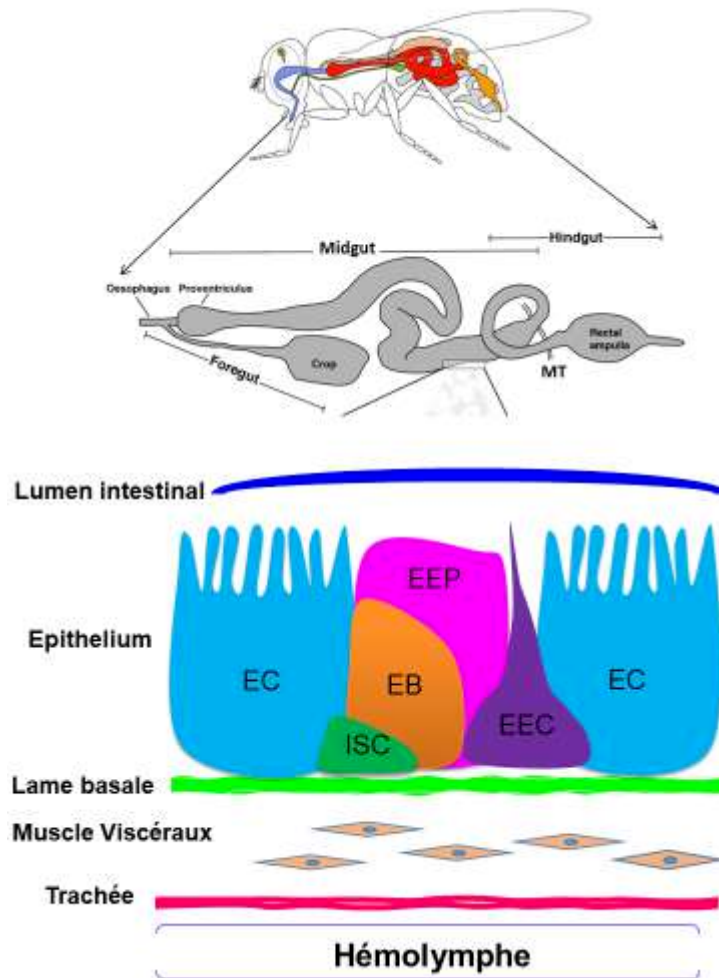


Figure 9: Organisation cellulaire de l'intestin moyen de la drosophile adulte

L'épithélium intestinal de la drosophile est composé de plusieurs types cellulaires. Les fonctions intestinales sont assurées par deux types de cellules différenciées : les entérocytes (EC) et les cellules entéro-endocrines (EEC). L'épithélium intestinal comprend aussi des cellules souches intestinales (ISC) en position basale et des progéniteurs : entéroblastes (EB) et cellule pre-entéroendocrine (EEP). L'épithélium repose sur la lame basale, une matrice extracellulaire spécialisée. Des muscles viscéraux longitudinaux et circulaires entourent tout l'intestin. Un réseau très dense de trachées permet l'apport de l'oxygène à tous ces types cellulaires. L'intestin est totalement immergé dans l'hémolymphe

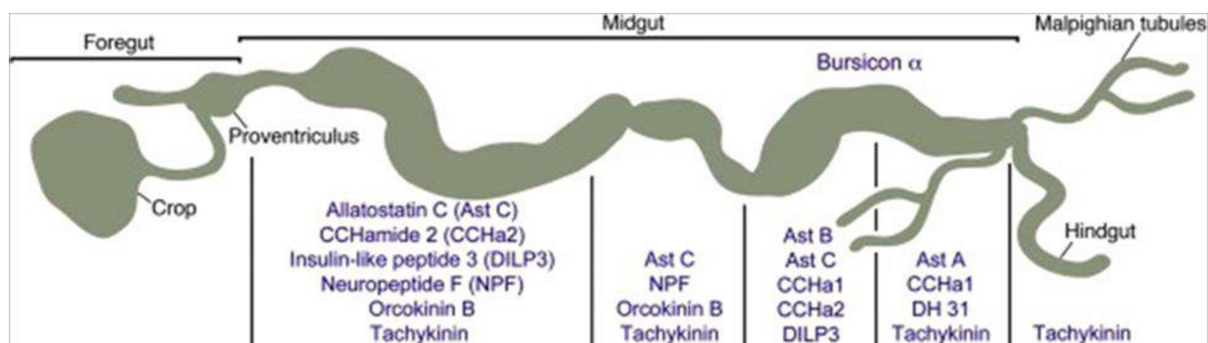


Figure 10: Distribution des neuropeptides/hormones peptidiques secrétés par les EEC dans les différentes régions de l'intestin moyen de la drosophile adulte

(Nässel & Zandawala, 2019)

2.2.4 La régionalisation de l'intestin moyen de la drosophile adulte

Historiquement, et suite à la découverte dans la région médiane de l'intestin moyen des cellules acides sécrétant des ions H^+ appelées « cellules de cuivre » (Dubreuil, 2004), les scientifiques ont divisé l'intestin moyen adulte en trois grandes parties : antérieure, intermédiaire et postérieure (Hakim et al., 2010). Par comparaison à l'intestin intermédiaire acide, le contenu luminal de l'intestin antérieur et postérieur est légèrement alcalin (Dubreuil, 2004). Cette subdivision anatomique basée sur des propriétés physico-chimiques a permis de postuler que l'intestin moyen de la drosophile adulte est formé de 3 régions physiologiquement spécialisées. Ceci a incité deux laboratoires de recherche à caractériser de façon exhaustive, en combinant des approches anatomiques, cellulaires et génétiques, la régionalisation de l'intestin moyen de la drosophile et à s'interroger sur les réseaux génétiques qui établissent et maintiennent une telle structure.

Tout d'abord, une analyse micro-morphométrique de l'intestin adulte réalisée dans l'équipe de Bruno Lemaître a permis d'identifier six constriction majeures tout au long de la lumière intestinale. Ces constriction délimitent cinq grands compartiments nommés R1 à R5 et qui peuvent eux-mêmes être divisés en huit sous-régions d'histologie distincte sur la base de la morphologie des EC, et 14 sous-régions exprimant des groupes de gènes spécifiques (Buchon, Osman et al., 2013). Une subdivision similaire de l'intestin moyen a été confirmée par Marianes et Spradling en 2013, quoique seulement 10 régions ont été identifiées par cette dernière étude (incluses dans les 14 régions identifiées par Buchon, Osman et al.). Ces deux équipes ont également effectué une analyse de transcriptomes intestinales et ont révélé des spécificités régionales fonctionnelles (Buchon et al., 2013; Marianes & Spradling, 2013). De plus, une différence dans l'activité mitotique des ISC résidentes dans les différentes sous-régions a été

défecté : la rapidité de la division des ICS de la région postérieure de l'intestin moyen P1-P3 (R4) est remarquable avec un taux de division d'une fois par jour contrairement à la partie antérieure où ce taux est plutôt faible. A noter que les cellules filles issues des ISC qui sont présentes près des frontières séparant les différentes régions aboutissent à la naissance de lignées cellulaires qui restent résidentes de leur régions d'origine (Marianes & Spradling, 2013) (Fig.11).

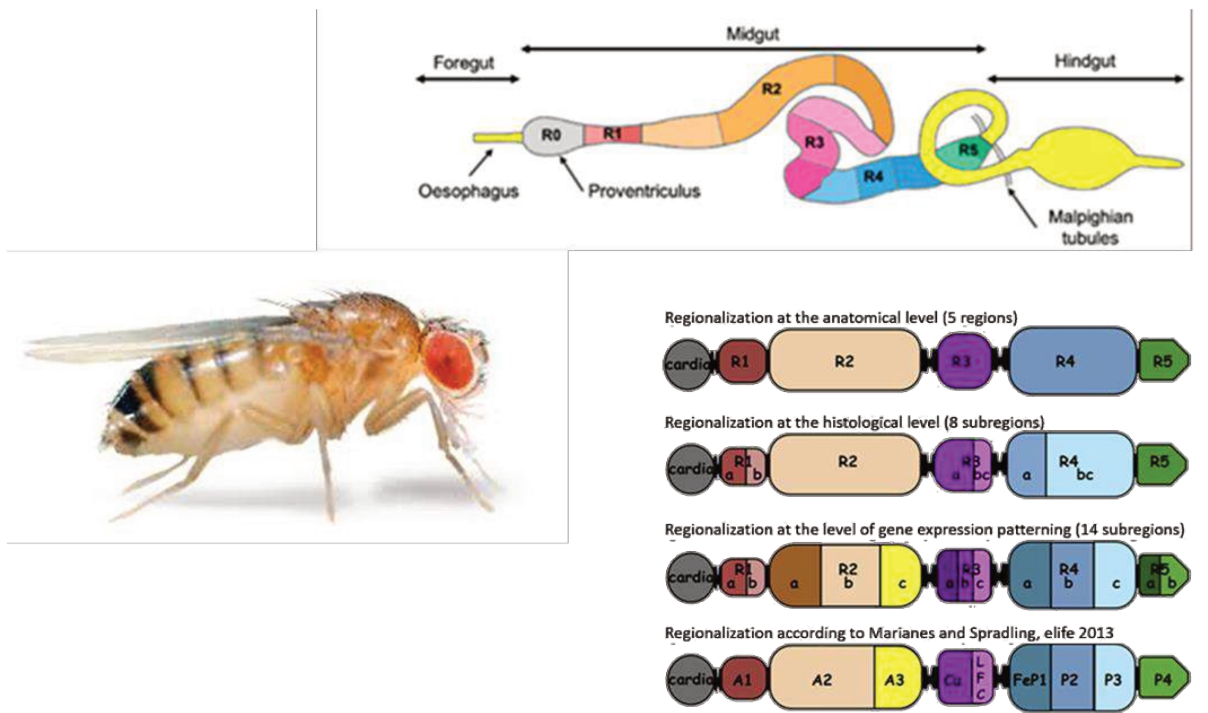


Figure 11: Régionalisation de l'intestin moyen de la drosophile adulte.

Sur la base des caractéristiques anatomiques, l'intestin moyen est divisé en 5 régions différentes (R1 à R5). Ces régions sont ensuite divisées en 8 sous-régions contenant des EC de morphologies différentes (niveau histologique). La structuration de l'expression génique a conduit à un niveau supplémentaire de régionalisation (14 sous-régions) (Buchon et al., 2013). Marianes et Spradling ont démontré la présence de 9 régions différentes contenues dans les 14 sous-régions trouvées par Buchon et al. (Marianes & Spradling, 2013)

2.3 Conservation évolutive entre l'intestin grêle des mammifères et le tube intestinal chez la drosophile

Malgré la distance évolutive qui sépare la drosophile de l'homme, des ressemblances frappantes ont été identifiées entre leurs tubes digestifs respectifs. Ces similitudes sont trouvées à la fois au niveau anatomiques, cellulaires et moléculaires.

2.3.1 Comparaison entre l'organisation structurelle et cellulaire

Chez les mammifères, l'épithélium de l'intestin grêle s'organise en cryptes et en villosités. Les cryptes, dites de Lieberkühn, sont des invaginations de l'épithélium qui abritent les ISC et les précurseurs et constitue ainsi une zone de prolifération. Comme chez la drosophile, les principales fonctions de l'intestin grêle des mammifères sont accomplies par les EC et les cellules sécrétrices. A rappeler que chez la drosophile, l'intestin est formé d'un épithélium linéaire et plat.

Dans l'intestin grêle des mammifères, il existe quatre grands types cellulaires : les ISC, les cellules progénitrices, les cellules sécrétrices et les entérocytes. La lignée cellulaire sécrétrice est divisée en **EEC** qui produisent les hormones intestinales, **les cellules gobelets** qui sécrètent de la mucine, et **les cellules Paneth**, les seules cellules différenciées résidant dans la crypte, secrètent des peptides antimicrobiens, des facteurs de croissances et des morphogènes régulant la prolifération des ISC et la différenciation des cellules amplificatrices transitoires (TA), et **les cellules de tuft** (sécrétant des interleukines). Chez la drosophile, les cellules de Paneth, goblet et tuft sont absentes et leurs fonctions sont en grande partie assurées par les EC et EEC. Comme mentionné précédemment, les EEC chez la drosophile sont subdivisées en quatre classes différentes (Beehler-Evans et Micchelli, 2015) (Fig.12).

Dans l'intestin grêle des mammifères, les cellules souches intestinales (CBCs) se situent entre les cellules de Paneth à la base des cryptes, et sont caractérisées par l'expression du gène codant pour le récepteur 5 contenant des domaines riche en Leucine et couplé à la protéine G (Lgr5), récepteur de la R-Spondine qui potentialise la voie de signalisation Wnt (Barker et al., 2007). A côté de ces CBCs actives, un autre type d'ISC situé à la position +4 par rapport à la base de la crypte est présent. Les cellules +4 sont au repos pendant l'homéostasie et sont caractérisées par l'expression du répresseur transcriptionnel Bmi1, nécessaire au maintien de leur état indifférencié. Récemment, les ISC+4 ont été nommée « cellules souches de réserve » en raison de leur capacité à remplacer les CBCs perdues (Tian et al., 2011).

Chez les mammifères, la potentialité de cellules souches des ISC+4 ne constitue pas un obstacle pour qu'elles soient des précurseurs engagés à devenir des cellules sécrétrices (Buczacki et al.,

2013). Les ISC effectuent chaque jour une seule division et donnent naissance à des progéniteurs nommés cellules amplificatrices transitoires (TA). Ces dernières sont capables de faire quatre à cinq divisions par jour avant de s'engager dans la différenciation soit en entérocytes, soit en cellules sécrétrices. A noter que les TA restent localisées dans les cryptes et les cellules se différenciant tout en se dirigeant vers l'apex des villosités. Chez la drosophile, les EB sont post-mitotiques et donnent donc lieu à des EC tandis que les progéniteurs EEC conservent une capacité mitotique très limitée relativement comparables aux cellules TA (Guo & Ohlstein, 2015).

Chez la drosophile, la présence de plusieurs types d'ISC a été soulignée par de nombreux laboratoires. Dans l'intestin postérieur, les ISC sont plus actifs mitotiquement contrairement à ceux qui se localisent dans l'intestin antérieur et l'intestin intermédiaire qui restent peu actifs (Marianes & Spradling, 2013). Des variations morphologiques ont été aussi identifiées au niveau des ISC avec des morphologies et un taux de division différents (En R1), où les entérocytes sont plus courts que dans les autres régions, les cellules souches sont plus plates que la forme pyramidale dirigée vers la haute vue dans toutes les autres régions). Les ISC qui se divisent le plus rapidement se trouvent dans (R4-R5), qui se divisent environ une fois par jour, tandis que la division des ISC est légèrement moins fréquente dans l'intestin moyen antérieur et beaucoup plus lente dans la région médiane (Marianes & Spradling, 2013).

A
Épithélium intestinal chez la drosophile

B
Épithélium intestinal chez les mammifères

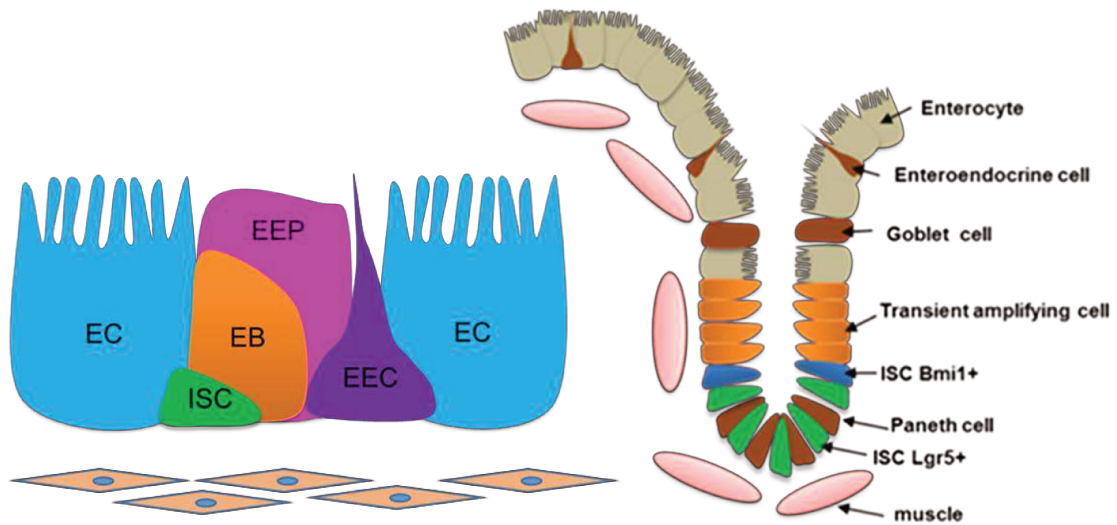


Figure 12: Comparaison schématique de l'épithélium intestinal chez la drosophile et les mammifères

- A- L'épithélium intestinal de drosophile comprend des cellules souches intestinales (ISC) en position basale, des progéniteurs (entéroblastes (EB) et cellule pré-entéroendocrine (EEP)) et des cellules différenciées (entérocytes (EC), cellules entéroendocrines (EEC)).
- B- L'intestin grêle des mammifères adultes est organisé en cryptes et villosités. La crypte est la zone proliférative contenant deux types de cellules souches (ISC LGR5+ et ISC+4) et des cellules intercalées (cellules Paneth). Les ISC donnent naissance à des cellules d'amplification transitoire (TA) qui prolifèrent et donnent naissance à des cellules différenciées dans la zone des villosités. Il existe 5 types de cellules différenciées: les entérocytes, les cellules tuft, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth et les cellules gobelet.

2.4 Rôle des jonctions cellulaires dans le maintien de l'épithélium intestinal

Dans l'intestin, les jonctions cellulaires jouent plusieurs rôles : elles lient les différentes cellules intestinales et les organisent en épithélium, tout en assurant le maintien de leur stabilité et polarité, en plus elles préservent l'étanchéité de l'épithélium intestinal.

La conservation de ces jonctions cellulaires intestinales entre la drosophile et les mammifères est démontrée. Deux types de jonctions sont responsables de la liaison latérale des cellules intestinales chez la drosophile :

- ✓ **Les jonctions serrées (JS)** : elles sont formées par différentes protéines (DLG, SCRIB, LGL) et sont enrichies par des ankyrines, des β spectrines et la fascicline III. Elles régulent d'une façon sélective le transport des solutés et des ions à travers l'épithélium en passant à travers l'espace intercellulaire.
- ✓ **Les jonctions adhérentes (JA)** : le complexe cadhérines- β -caténines (appelées Armadillo chez la drosophile) forment ces jonctions, dans le but de maintenir la polarité cellulaire, celles-ci réalisent la liaison avec les filaments d'actine.

Cependant, il y a certaines différences dans l'ordre de localisation le long du compartiment latéral d'une région intestinale à l'autre. Dans la partie antérieure de l'intestin de drosophile, les jonctions adhérentes se localisent dans la partie apico-latérale des entérocytes et les jonctions serrées se trouvent dans la partie baso-latérale. Dans la partie postérieure, cette configuration est inversée. Cette partie postérieure est justement ordonnée comme chez les mammifères ([St Johnston & Ahringer, 2010](#)).

Chez les mammifères, trois types de jonctions intestinales sont présentes et remplissent les mêmes fonctions que celles décrites chez la drosophile

- ✓ **Les jonctions serrées** : elles sont apico-latérales et sont formées par un complexe protéique transmembranaire (les occludines, les claudines, les junctional adhesion molecules (JAMs) et les tricellulines). L'expression des protéines formant les jonctions serrées dans l'intestin est fortement régulée et dépend du compartiment intestinal (intestin grêle/colon, villosités/crypte, la localisation apicale/basale au niveau de la membrane cellulaire).
- ✓ **Les jonctions adhérentes** : sont latérales et sont formées principalement par des cadhérines et des β -caténines.

- ✓ **Les desmosomes** : sont localisés baso-latéralement, ils sont formés par des glycoprotéines membranaires et leur fonction se résume par l'assurance de la liaison avec les filaments d'actine.

A noter que les muscles lisses qui entourent l'épithélium intestinal renforcent aussi le maintien des cellules épithéliales, chez les mammifères comme chez la drosophile.

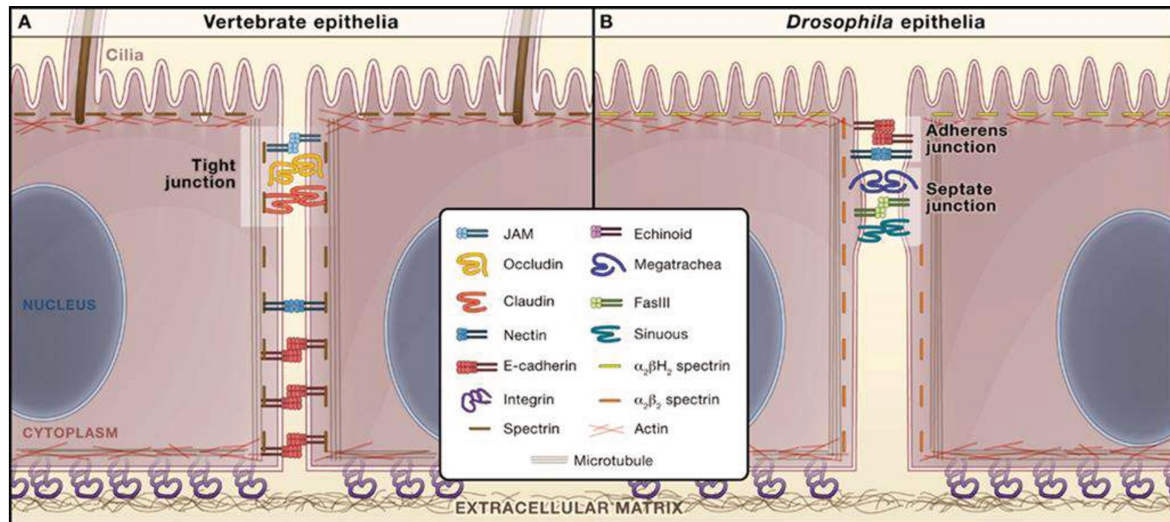


Figure 13: Schéma décrivant les jonctions épithéliales chez la drosophile et chez les vertébrés. À gauche on a une photo schématisant les jonctions cellulaires chez les vertébrés et dans l'intestin postérieur de la drosophile : on trouve les jonctions serrées (apicolatérales) et les jonctions adhérentes (basolatérales). A droite, la photo schématise le positionnement des jonctions épithéliales chez la drosophile (la position des jonctions adhérentes et des jonctions serrées est différente entre l'intestin moyen antérieur et l'intestin postérieur de la drosophile. (St Johnston & Ahringer, 2010)

Chapitre 3 : Maintien de l'homéostasie intestinale chez la drosophile adulte

3.1 Les bases moléculaires régulant la formation et la différenciation du lignage cellulaire intestinale

Plusieurs études ont permis de démontrer que les ISC (1) sont localisées du côté basal de l'épithélium intestinal, (2) expriment le facteur de transcription Escargot (Esg) et le ligand de la voie de signalisation Notch, Delta (DI), (3) se divisent de manière asymétriquement pour à la fois s'auto-renouveler et donner naissance à des progéniteurs post-mitotiques (EB). L'EB se trouve dans un état indifférencié transitionnel et est incapable de se diviser (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006). La différenciation des EB en entérocytes et en cellules entéroendocrines apparaît alors être sous le contrôle de la voie de signalisation Notch. En effet, l'ISC exprime DI et active la signalisation Notch dans l'EB. Le modèle initial propose que la génération d'EC nécessite des niveaux élevés d'activité Notch dans les EB, tandis qu'une activation Notch plus faible conduit à la production des EEC (Bardin et al., 2010 ; Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006,2007 ; Perdigoto et al., 2011) (Fig.14).

Trois études ont par la suite proposé un modèle alternatif pour le choix du destin cellulaire. Ce modèle suggère que les EEC proviennent d'un autre type de progéniteurs qui n'activent pas Notch, appelé précurseurs EEP qui expriment un marqueur spécifique appelé Piezo (He et al., 2018). Les progéniteurs des cellules EEC n'expriment pas le gène rapporteur de la voie Notch *Su(H)-GBE*. Mais sont positifs pour les marqueurs Esg, DI, et Prospero et que les tumeurs mutants Notch contiennent toujours des cellules EEC (Biteau & Jasper, 2014 ; Z. Guo & Ohlstein, 2015 ; Zeng & Hou, 2015). Ce modèle est encore affiné par des observations démontrant que les EB sont capables de produire une petite population de cellules EEC de classe II (Beehler-Evans & Micchelli, 2015). Après une division asymétrique, un EEP peut directement donner un EEC (29% des cas), ou se diviser une fois avant de se différencier en deux EEC (de classe I et de classe II). Cela indique que les EEP sont aussi capables de se diviser comme les ISC (Beehler-Evans & Micchelli, 2015 ; Jun Chen et al., 2018 ; Z. Guo & Ohlstein, 2015 ; X. Guo et al., 2019) (Fig.14). He et al. ont montré en 2018 que la capacité proliférative des ISC (Piézo-négatifs) est beaucoup plus grande que celle des EEP (Piézo-positifs) (He et al., 2018). Enfin, les EEC peuvent également être produites par des divisions symétriques des ISC ou par différenciation directe des ISC (Biteau & Jasper, 2014 ; Zeng & Hou, 2015).

3.1.1 Mode de division des ISC

Il a été montré que 80% des ISC se divisent asymétriquement, ce qui génère deux cellules filles de destin différent, une ISC auto-renouvelée et un précurseur (EB ou EEP). Seulement 20% subissent une division symétrique et donnent naissance à deux ISC (auto-renouvellement symétrique) ou à deux précurseurs (différenciation symétrique). Ainsi, la perte d'ISC engagée en EB est compensée par l'apparition de deux nouveaux ISC (ISC-ISC) en raison de la division symétrique des ISC voisins (Goulas et al., 2012 ; Guisoni et al., 2017 ; O'Brien et al., 2011 ; Perdigoto et al., 2011 ; Sallé et al., 2017).

Le basculement entre les deux modes de division est particulièrement important pour que l'intestin s'adapte à différentes conditions, telles que la disponibilité des nutriments, les agressions externes ou le vieillissement. Les mécanismes impliqués dans cette régulation commencent à être mieux décrits, bien que notre compréhension des processus moléculaires contrôlant la capacité adaptative des cellules souches adultes reste rudimentaire.

3.1.2 Division symétrique ou asymétrique, qui dicte le choix ?

Chez la drosophile, la signalisation Notch joue un rôle important dans ce choix. Le ligand transmembranaire Dl présent à la surface des ISC se lie à son récepteur N exposé par une cellule EB voisine. Cela induit le clivage du domaine intracellulaire de N qui entre dans le noyau pour activer ses gènes cibles. Lors de la division de l'ISC, la décision des cellules filles de s'auto-renouveler ou de se différencier est dictée par la voie Notch, dont le haut niveau d'activation dans le futur EB empêche le devenir ISC et favorise la différenciation (Ohlstein & Spradling, 2007; Perdigoto et al., 2011 ; Sallé et al., 2017). Lors d'une division asymétrique, la cellule fille ISC maintient l'expression de Dl, tandis que, la cellule fille EB exprime les gènes cibles de la voie Notch (Ohlstein & Spradling, 2007 ; Maeda et al., 2008 ; Perdigoto et al., 2011). Le modèle initial propose que la génération d'entérocytes nécessite des niveaux élevés d'activité Notch dans les EB, tandis qu'une activation Notch plus faible conduit à la production d'EEC (Bardin et al., 2010 ; Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007 ; Perdigoto et al., 2011). Fait intéressant, l'engagement de l'ISC vers l'EB nécessite également l'activation de Notch mais à un niveau très élevé par rapport au niveau de signalisation Notch requis pour la différenciation terminale de l'EB vers l'EC (Perdigoto et al., 2011). Il a été suggéré que ce niveau différentiel est nécessaire pour protéger les ISC de leur perte par différenciation. En l'absence de Notch, l'ISC ne peut pas se différencier et continue à proliférer conduisant à des masses tumorales (induit des tumeurs constituées de cellules de type ISC et de type EEC)

(Ohlstein & Spradling, 2007). Inversement, l'activation constitutive de la voie Notch en exprimant le domaine intracellulaire de N (NICD) dans les EB force la différenciation en EC. De plus, l'activation de Notch dans les EB semble dépendre de l'interaction ISC-EB médiée par les molécules **d'E-cadhérine**, également nécessaires pour le maintien de la morphologie cellulaire. Lors de la division asymétrique, la réduction de la quantité d'E-Cadhérine dans les ISC entraîne une augmentation du nombre d'EEC. Ceci peut s'expliquer par une réduction de la signalisation Notch (Maeda et al., 2008). Un niveau élevé de signalisation Notch induit par un fort contact médié par la E-Cadhérine, régule à la baisse la molécule d'adhésion elle-même pour séparer l'ISC et l'EB ce qui favorise ensuite la différenciation de EB en EC (Maeda et al., 2008). Il a été proposé qu'un contact prolongé cellule-cellule (ISC-EB) soit nécessaire pour permettre à la signalisation Notch d'atteindre le seuil nécessaire à la différenciation des EB en EC (Maeda et al., 2008). En accord avec cela, les molécules de jonction adhérentes, DE-Cadherin et Armadillo/ β -Catenin, marquent fortement les membranes plasmiques impliquées dans le contact cellule-cellule entre l'ISC et l'EB (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007 ; Maeda et al., 2008 ; Choi et al., 2011). De plus, Maeda et ses collègues (2008) ont observé que la réduction de l'adhésion cellule-cellule ISC/EB (par RNAi E-Cad) favorise soit la mauvaise différenciation de l'EB, soit la différenciation de précurseur en EEC (Maeda et al., 2008).

La signalisation Notch agit de manière bidirectionnelle et est importante non seulement pour la différenciation EB, mais également pour la lignée EEC (Z. Guo & Ohlstein, 2015). Dans la lignée EC, les ISC (DI élevé) restent attachées à la membrane basale, tandis que les EB (Signalisation Notch élevée) sont plus apicaux (Z. Guo & Ohlstein, 2015 ; Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007). En revanche, dans la lignée EEC, les cellules filles EEP sont localisées à la base et expriment de faibles niveaux de DI, induisant une faible signalisation Notch dans l'ISC (Z. Guo & Ohlstein, 2015), mais elle est unidirectionnelle par rapport à la membrane basale, car les cellules situées à la base activent les cellules qui sont plus apicale, et non l'inverse (Z. Guo & Ohlstein, 2015) (Fig.14).

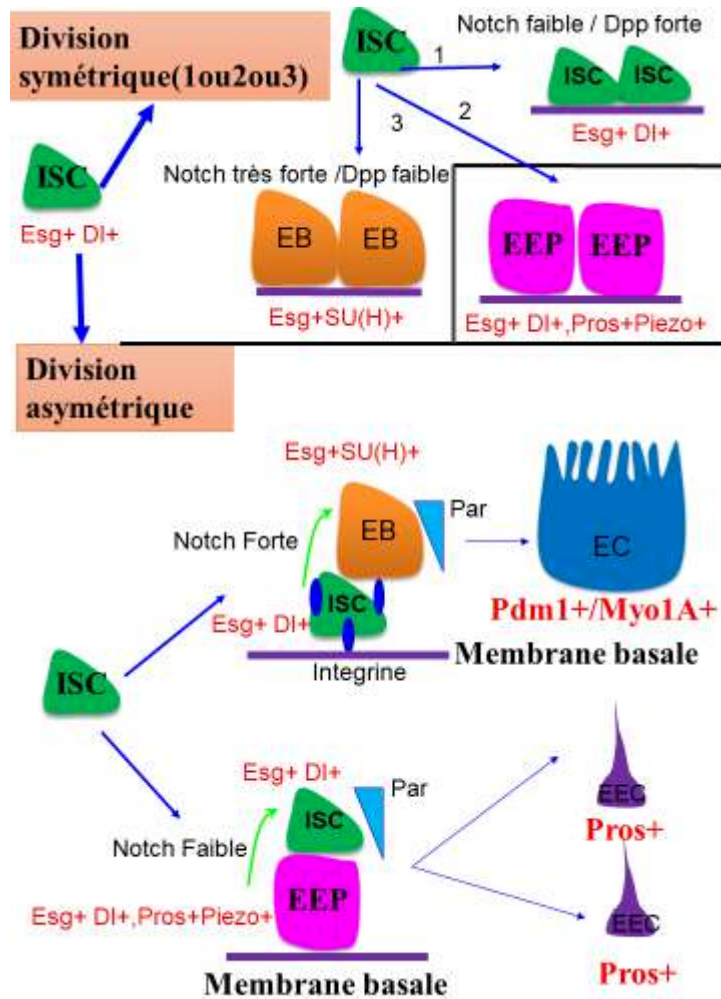


Figure 14: Le lignage des cellules souches intestinales et mode de division (asymétrique et symétrique)

- La division asymétrique donne naissance à deux lignées, EC et EEC, selon le niveau d'activité Notch
- Pendant la division symétrique, une signalisation Notch faible (Dpp/BMP élevé) et la perte d'intégrines conduisent à la production d'ISC-ISC. Inversement, un Notch élevé (faible Dpp/BMP) conduit à la production d'EB-EB. La division symétrique de l'ISC peut également donner lieu à deux EEP, mais les événements de signalisation n'ont pas été décrits.

L'identité ISC est maintenue, au moins en partie, par Daughterless (Da), un activateur transcriptionnel qui soutient l'expression de *Delta* (DI) et la capacité d'auto-renouvellement (Bardin et al., 2010). De plus, Hairless (H) et Suppressor of Hairless Su(H) agissent dans les ISC pour réprimer l'expression d'un gène cible principal de Notch, *Enhancer of split* (*E(spl)-C*), (Bardin et al., 2010). L'activation de la voie Notch dans les EB déclenche l'expression de *E(spl)-C* qui, à son tour, réprime l'activité de Da, permettant ainsi la sortie du cycle cellulaire pour générer un EC (Bardin et al., 2010) (Fig.15).

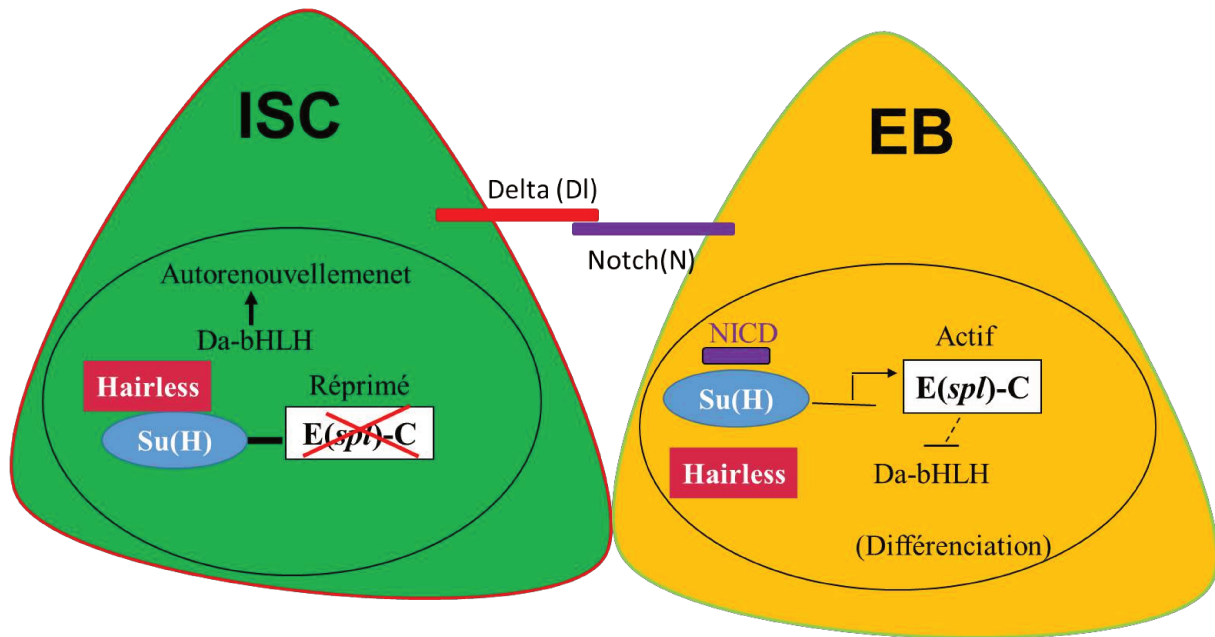


Figure 15: Voie de signalisation Notch dans l'intestin moyen de la drosophile adulte.

- Dans l'ISC : Suppressor of Hairless (Su(H)) en association avec Hairless se lie à la région régulatrice de *Enhancer of Split* (*E(spl)-C*) et inhibent son expression.
- En l'absence de *E(spl)-C*, le facteur proneural Daughterless (Da) est exprimé et induit l'expression de Delta, maintenant ainsi les propriétés ISC. Delta se lie au récepteur Notch exprimé au niveau de la membrane cellulaire des EB. Le domaine intracellulaire Notch (NICD) transloque dans le noyau où il déstabilise Hairless et se lie à Su(H), ce qui conduit à la dérégulation d'*E(spl)-C*, à la répression de l'activité de Da et à la différenciation en EB. (Bardin et al., 2010).

3.1.3 La voie Dpp/BMP : un autre régulateur du mode de division des ISC

Un autre régulateur des modes de division des ISC est la voie Dpp/BMP (Decapentaplegic/Bone Morphogenetic Protein). Il a été démontré que les voies de signalisation BMP et Notch agissent de manière antagoniste ([Aiguo Tian & Jiang, 2014](#))

Premièrement, la signalisation BMP est activée de manière asymétrique, fortement dans l'ISC et faiblement dans l'EB. Deuxièmement, la suppression de la signalisation BMP dans ISC favorise les divisions symétriques (EB/EB). Troisièmement, la suractivation de la signalisation BMP dans l'ISC favorise les divisions symétriques (ISC/ISC) ([Aiguo Tian & Jiang, 2014](#)). Par conséquent, les niveaux d'activation de ces deux voies au sein de l'ISC et de l'EB affinent le choix du destin cellulaire des cellules filles progénitrices. Fait intéressant, DI est un ligand transmembranaire intrinsèquement produit par l'ISC uniquement capable de se lier à son récepteur Notch, dans les cellules voisines (par contact cellule-cellule). Les ligands BMP proviennent de nombreuses sources (mésoderme viscéral, trachée et EC) ([Z. Guo et al., 2013](#)) et agissent à distance : les cellules filles apicales, situées plus loin de la source des ligands Dpp/BMP, sont actives pour la signalisation Notch, alors que les cellules filles basales, qui reçoivent des niveaux élevés de Dpp/BMP, n'ont pas d'activité Notch.

3.1.4 Autres déterminants cellulaires du mode de division des ISC

De la drosophile aux mammifères, le choix entre la division symétrique ou asymétrique des cellules souches est déterminé par l'orientation du fuseau pendant la mitose ([Venkei & Yamashita, 2018](#)). Une question intéressante est de savoir comment la décision de faire une division symétrique ou asymétrique est prise par les cellules en division. Au cours de la neurogenèse embryonnaire de la drosophile, le complexe Par est responsable de la division asymétrique des neuroblastes et est lui-même localisé asymétriquement à l'intérieur des neuroblastes. Lors de la mitose, le complexe Par est également exprimé dans l'ISC et l'EB de l'intestin moyen adulte et interagit avec le fuseau mitotique pour l'orienter le long de l'axe apico-basal. Chez la drosophile, la localisation asymétrique du complexe Par est également en corrélation avec des divisions asymétriques ([Goulas et al., 2012](#); [Z. Guo & Ohlstein, 2015](#)). De même, dans l'intestin de la drosophile, la division asymétrique (ISC-EB) est guidée par une position oblique, presque perpendiculaire, du fuseau mitotique par rapport à la membrane basale ([Goulas et al., 2012](#); [Z. Guo & Ohlstein, 2015](#)). En absence de complexe Par, l'ISC se divise symétriquement donnant naissance à deux cellules filles identiques (ISC-ISC) ce qui

augmente le nombre des ISC, La présence symétrique du complexe Par déclenche la duplication EB-EB par l'activation de la voie Notch (Goulas et al., 2012).

De plus, la perte de fonction des intégrines (impliquées dans la fixation de la muqueuse intestinale à la membrane basale) ou du complexe Par entraîne une réorientation du fuseau mitotique parallèle à la membrane basale (Goulas et al., 2012) favorisant une division symétrique ISC-ISC. Ces données suggèrent que les intégrines, en médiant l'adhésion de l'ISC à la membrane basale, fournissent des informations de position pour la ségrégation asymétrique du complexe Par au pôle apical, favorisant ainsi le mode de division asymétrique (Fig.14). La signalisation intégrine est nécessaire à la fois pour le maintien et la prolifération des ISC, car la perte de fonction diminue le nombre d'ISC, ainsi que leur taux de division. Goulas et ses collègues ont également observé que les intégrines sont génétiquement en amont du complexe Par, indiquant qu'elles représentent à ce jour l'événement moléculaire le plus précoce dans le contrôle de la symétrie/asymétrie. Alors que ces travaux se sont concentrés sur la lignée EC lors de la division asymétrique, le complexe Par favorise aussi la localisation basales de Pros dans les cellules filles, spécifiant ainsi l'EEP (Z. Guo & Ohlstein, 2015).

3.2 Programme spécifique de régulation du devenir des EEC

En comparant le nombre des EEC et des EC présents dans l'épithélium intestinal, on trouve que la population des EEC est très faible par rapport à celle des EC (EC :80 à 90%, EEC : 10 à 20%). Les EEC ne jouent aucun rôle dans l'absorption des nutriments, elles sont des régulateurs physiologiques agissant localement mais aussi systémiquement. Il est donc indispensable de modérer leur nombre afin d'assurer l'homéostasie de l'intestin (Amcheslavsky et al., 2014) et de l'organisme (Nässel & Zandawala, 2019). La détermination du choix du destin cellulaire entre les EC et EEC ne se limite pas aux voies de signalisation, plusieurs facteurs transcriptionnels y jouant des rôles fondamentaux. Voici la description de ces régulateurs positifs et négatifs de la détermination du sort des EEC.

Les facteurs proneuraux bHLH du complexe Achaete-Scute (AS-C) ont une grande influence sur la génération des EEC durant laquelle la suppression de l'AS-C dans les ISC conduit à une déplétion complète des EEC, sans aucune modification du nombre d'ISC. Inversement, le nombre d'EEC s'accroît suite à la surexpression d'Asense ou de Scute dans les ISC/EB/EEP (Bardin et al., 2010). Scute est ainsi indispensable à la différentiation des EEC mais n'est pas nécessaire pour la maintenance des ISC. De plus, il a été proposé que Scute, un facteur

mitogène, soit exprimé de manière transitoire dans les ISC et conduit à leur division asymétrique produisant un nouvel ISC et un progéniteur EEP (Jun Chen et al., 2018). Les EEP se divisent une fois avant que l'accumulation de Prospero ne provoque la sortie du cycle cellulaire et la différenciation en EEC (Jun Chen et al., 2018).

Durant la mitose, un inhibiteur de la voie de signalisation Notch (N) nommé « Numb », inhibe le recyclage de la protéine Notch vers la membrane plasmique (Sallé et al., 2017) ce qui aboutit à l'affaiblissement de l'expression Asense et Scute, conduisant ainsi à l'expression du Prospero et l'acquisition du destin EEC (Sallé et al., 2017) (Fig.16).

D'autres régulateurs transcriptionnels sont capables d'inhiber le destin EEC. A titre d'exemple, le répresseur transcriptionnel Tramtrack 69 (Ttk69) est capable de contrôler la survie des cellules EEC (Chenhui Wang et al., 2015) et module leur capacité à produire des hormones (Chenhui Wang & Xi, 2015). De manière intéressante, les EEC sont également capables de réguler leur nombre de manière autonome. Une EEC nouvellement formée exprime le ligand D1 et active la signalisation Notch dans l'ISC situé apicalement. Cette activité bloque la production d'EEC et maintient la multipotence des ISC, de sorte à les reconvertir à la production d'EC (Z. Guo & Ohlstein, 2015) (Fig.16).

Les EEC autorégulent aussi leur nombre en sécrétant un ligand appelé Slit capable de se fixer à son récepteur Roundabout (Robot2) spécifiquement exprimé par les ISC. La fixation Slit/Robot2 inhibe spécifiquement l'expression de Pros dans l'ISC, puis inhibe la génération de nouveaux EEC (Biteau & Jasper, 2014) (Fig.16). Ainsi la signalisation Slit/Robot2 agit comme un régulateur maintenant l'équilibre entre les lignées EC et EEC. Les EEC influencent aussi l'activité des ISC par la sécrétion d'hormones qui agissent sur les muscles viscéraux. En 2011 Biteau et Jasper ont pu montrer que la sécrétion du Vein, un ligand de la voie EGF, est favorisée par les cellules musculaires, de même la fixation sur son récepteur qui se localise à la surface des ISC, permet leur prolifération (Biteau & Jasper, 2011). Le contrôle de manière non autonome de la sécrétion de Vein est exécuté par les EEC qui sécrètent les hormones tel le bursicon dans le but de réprimer son expression (Scopelliti et al., 2014) (Fig.17). Sur le même schéma, la Tachykinine sécrétée par les EEC induit de l'expression de Dilp3 (Drosophila insulin like peptide3). Dilp3 est sécrété et va activer la voie de signalisation de l'insuline dans les ISC grâce à sa fixation sur son récepteur InR avec comme conséquence l'augmentation de la prolifération des ISC (Amcheslavsky et al., 2014 ; Scopelliti et al., 2014) (Fig.17). Ensemble, ces études montrent que les EEC régulent l'activité des ISC en utilisant des mécanismes moléculaires variés et jouent donc un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie intestinale.

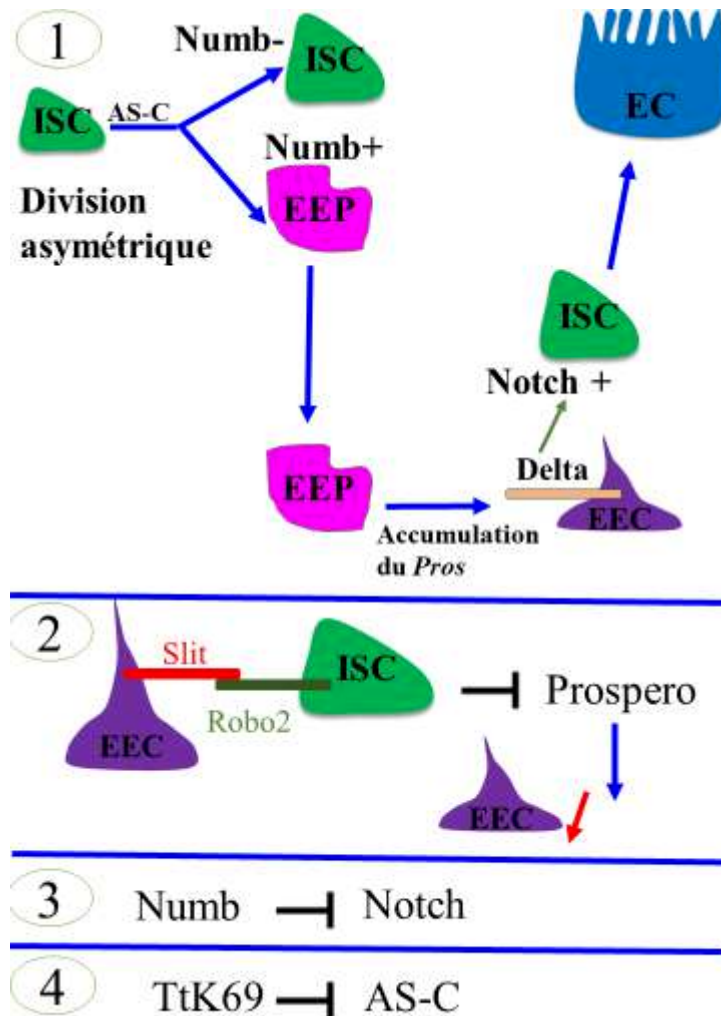


Figure 16: Régulation du destin EEC

- Le complexe Achaete- Scute (AS-C) requis pour maintenir l'expression du Pros et par la suite la production de cellules EEC est activé de manière transitoire pendant la division des ISC (vert) et conduit à la génération d'une nouvelle ISC et d'une EEP (Violet).
- L'EEP se divise une fois avant de commencer à accumuler Pros. De plus, l'EEP nouvellement formé hérite de la protéine Numb qui inhibe la signalisation Notch .
- La génération des EEC est régulée négativement par le répresseur transcriptionnel Tramtrack69 (Ttk69) qui inhibe l'AS-C en parallèle à Notch. Les cellules EEC (mauve) nouvellement formées expriment le ligand Delta et activent Notch dans l'ISC situé apicalement qui passe à la production de cellules EC plutôt que d'EEC.
- EEC autorégule leur production également en sécrétant le ligand Slit qui active le récepteur Roundabout / récepteur (Robot2) présent à la surface de l'ISC conduisant à l'inhibition de l'expression du Prospero

3.3 Régulation de la prolifération des ISC dans les conditions physiologiques normales

Dans les conditions physiologiques normales, l'intestin est complètement renouvelé en quelques jours, 8 jours chez les mammifères et de deux semaines chez les insectes, (Ohlstein & Spradling, 2006; Jiang et al., 2009; Choi et al., 2011). Les anciens EC sont éliminés et remplacés par de nouveaux dérivés de cellules progénitrices. Pour maintenir l'homéostasie intestinale, une régulation stricte de la prolifération des ISC est indispensable non seulement pour remplacer les cellules endommagées, mais aussi pour empêcher une prolifération excessive des ISC qui peut conduire au développement de tumeurs (Radtke & Clevers, 2005). De nombreuses voies de signalisation conservées sont impliquées dans le contrôle de la division des ISC. Dans la section suivante, je décrirai nos connaissances actuelles sur le rôle des diverses voies de signalisation dans la régulation de la prolifération des ISC dans les conditions homéostatiques et aussi suite à des stress environnementaux.

3.3.1 La voie de signalisation Wingless/Wnt dans l'intestin moyen de la drosophile adulte

Chez la drosophile ainsi que chez les vertébrés, la voie Wg/Wnt est impliquée dans la stimulation de la division des ISC. Le ligand Wg est exprimé dans les muscles viscéraux entourant l'intestin moyen de la drosophile et active sa signalisation dans les ISC. En générant des clones dépourvus de composants de la voie Wg /Wnt tels que le récepteur Frizzled, une réduction du taux de division et prolifération des ISC a été détectée, sans affecter la différenciation des EC et des EEC. Inversement, la surexpression de *wg* dans les cellules *esg+* est suffisante pour induire une expansion des cellules *esg+* *DI+*. Cette étude a permis de conclure que la signalisation Wg/Wnt est nécessaire et suffisante pour maintenir l'auto-renouvellement de l'ISC.

La signalisation Wg/Wnt agit probablement par la régulation de son gène cible *myc* (Cordero et al., 2012), qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire chez les vertébrés et les invertébrés. En accord avec cela, il a été montré que Myc est impliqué dans la division des ISC à l'état homéostatique car la réduction de l'expression de *myc* dans les ISC bloque leur division (Ren et al., 2013). D'autres études ont apporté des résultats complémentaires concernant la source du ligand Wg et le site d'activation de la signalisation Wnt. Buchon et al ont observé un enrichissement de l'expression des gènes rapporteurs de signalisation Wnt aux différentes limites de l'intestin moyen (Buchon et al., 2013). Tian et al

ont démontré que les EC plutôt que les cellules ISC sont le site principal de l'activation de la signalisation Wnt dans l'intestin moyen adulte de la drosophile (A. Tian et al., 2016). Cette activité est nécessaire pour inhiber la libération des facteurs de croissance par les EC tels que Upd2 et Upd3 qui agissent comme des signaux paracrines et activent la prolifération des ISC (A. Tian et al., 2016).

3.3.2 Voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)

L'une des principales voies de signalisation impliquées dans la stimulation de la division des ISC est la voie EGFR. La signalisation EGFR est activée dans les ISC par trois ligands (Vein, Spitz et Keren) libérés de différentes sources locales. Les muscles viscéraux entourant l'épithélium intestinal produisent le ligand Vein (Biteau & Jasper, 2011 ; Jiang et al., 2011 ; N. Xu et al., 2011), Keren est libéré à la fois les EB (N. Xu et al., 2011) et les EC (Jiang et al., 2011) et Spitz est exprimé dans les EB (Buchon et al., 2010 ; N. Xu et al., 2011). Les trois ligands activent la voie EGFR dans les ISC par l'activation de la petite GTPase Ras et de la kinase ERK qui phosphoryle le facteur de transcription FOS (Biteau & Jasper, 2011 ; Jiang et al., 2011 ; N. Xu et al., 2011). Les clones (ISC) mutants pour les composants de la voie EGFR ne prolifèrent pas (Biteau & Jasper, 2011 ; Jiang et al., 2011 ; N. Xu et al., 2011). A noter que l'inhibition de la voie EGFR ne modifie pas la survie ni la différenciation des ISC. Une inhibition prolongée d'EGFR dans les ISC entraîne leur disparition après 4 semaines.

3.3.3 La voie de signalisation JAK/STAT

Chez la drosophile, la voie de signalisation JAK/STAT est un acteur majeur contrôlant l'homéostasie. Elle est nécessaire à la coordination de la prolifération et de la différenciation des cellules souches dans de nombreux tissus. Trois ligands Unpaired (Upd1, Upd2 et Upd3) (Hervé Agaisse et al., 2003 ; Gilbert et al., 2005) existent chez la drosophile et interagissent avec le récepteur de la voie JAK/STAT, Domeless (Dome). Le signal est ainsi transmis au sein des cellules par la kinase JAK/Hopscotch (Hop) (Binari & Perrimon, 1994) aboutissant à l'activation du facteur de transcription Stat92E (Hou et al., 2002). L'activation de celui-ci mène à sa dimérisation et son passage dans le noyau afin d'initier l'expression de gènes cibles, dont *socs36E*, qui agit comme un régulateur négatif de la voie JAK/STAT.

Upd1 est exprimé et sécrété à la fois par le muscle viscéral (MV) entourant l'intestin moyen (Lin et al., 2010) et les EB (Osman et al., 2012). L'activité JAK/STAT n'est détectée que dans les ISC et les EB (Jiang et al., 2009 ; Osman et al., 2012). Il est généralement admis que des niveaux de signalisation élevés (suractivation de la voie JAK/STAT dans les ISC) accélèrent le

taux de division des ISC (Jiang et al., 2009 ; Lin et al., 2010). L'effet de l'inhibition de la signalisation JAK/STAT est moins clair. Certaines études montrent que l'inhibition de la voie JAK/STAT dans les ISC ne modifie pas leur division (Buchon et al., 2009 ; Jiang et al., 2009), tandis que d'autres groupes constatent que les ISC disparaissent de l'épithélium intestinal en l'absence de signalisation JAK/STAT dans les ISC (Lin et al., 2010) ou lors de l'inhibition de la production de Upd1 dans les progénitures (Osman et al., 2012). Fait intéressant, ces expériences ont suivi le maintien des ISC sur une longue période et ont constaté que les ISC disparaissent après avoir inhibé la signalisation JAK/STAT dans les ISC à partir de 3 semaines (Osman et al., 2012). Ces divergences suggèrent que l'inhibition de la signalisation JAK/STAT n'est pas suffisamment efficace, expliquant pourquoi une période plus longue est nécessaire pour observer la perte des ISC, ou (et) que d'autres voies parallèles pourraient compenser partiellement le manque de signalisation JAK/STAT dans les ISC. Bien que ces deux possibilités ne soient pas exclusives, il existe une série de preuves soutenant l'hypothèse « compensatoire ». En effet, l'inhibition de la signalisation EGFR dans les ISC supprime la division des ISC dépendante de la surexpression de la voie JAK/STAT. Réciproquement, l'absence de signalisation JAK/STAT dans les ISC abolit la mitose des ISC qui est dépendante de la voie EGFR (Buchon et al., 2010). Chez les mouches vieillissantes, les ISC prolifèrent d'une manière anormale. Cette caractéristique est partiellement médiée par les ligands Upd2 et Upd3 libérés par les EB et les EC. De plus, ces deux ligands ainsi Upd1 sont également surexprimés lors d'une infection bactérienne afin d'induire un renouvellement épithélial rapide (Osman et al., 2012 ; Loudhaief et al., 2017). Par conséquent, la voie JAK/STAT régule la prolifération et la différenciation des ISC dans des conditions saines et pathogènes.

3.3.4 Rôle de la voie Hippo dans la restriction de la prolifération des ISC

Un régulateur négatif de la division des ISC est la voie Hippo/Yorkie (Hpo/Yki), qui est hautement conservée au cours de l'évolution. Des forces mécaniques subies par les entérocytes contrôlent cette voie, qui régule à la fois la prolifération cellulaire et l'apoptose (Harvey et al., 2003 ; Wu et al., 2003 ; Loudhaief et al., 2017). Quatre kinases forment le complexe Hippo : Warts (Wts) (Justice et al., 1995) Hippo (Hpo) (Harvey et al., 2003 ; Wu et al., 2003), Mob/Mats (Lai et al., 2005) et Salvador (Sav) (Kango-Singh et al., 2002 ; Tapon et al., 2002). Une fois activée, la voie aboutit au déclenchement d'une cascade de phosphorylation : Hpo phosphoryle Sav tout en stabilisant leur interaction physique (Aerne et al., 2015 ; Wu et al., 2003), ensuite Hpo phosphoryle Mats qui interagit avec Wts et potentialise son activité kinase (Justice et al.,

1995 ; Wei et al., 2007 ; Wu et al., 2003). La cascade des kinases entraînant finalement la phosphorylation et l'inactivation du facteur de transcription Yorki (Yki), qui reste retenu dans le cytoplasme (Huang et al., 2005 ; Ren et al., 2010). Le rôle de Yki se résume par l'induction de l'expression des gènes anti-apoptotique (*Diap1*) et du cycle cellulaire (*Cycline E*) (Dong et al., 2007 ; Huang et al., 2005). Donc, après l'activation de la voie, Yki est phosphorylé et reste dans le cytoplasme, et ses gènes cibles jouant un rôle fondamental dans la croissance et la prolifération cellulaire ne sont pas exprimés. Ainsi la prolifération cellulaire est bloquée et l'apoptose est induite dans certaines conditions.

La déphosphorylation de Yki permet l'activation des gènes cibles (impliqués dans la prolifération cellulaire *myc*, *cycE* et *Bantam*) ou la survie cellulaire (par exemple *Diap1*). Inversement, l'induction de la prolifération anormale des ISC par surexpression de *Diap1* et de *cycline E* est favorisée par le gain de fonction *yki* (ou perte de fonction *wts*) (Shaw et al., 2010). Pour contrôler la prolifération des ISC, Hpo agit de manière non cellulaire autonome dans les EC. En effet, Yki induit, dans les EC abîmés, l'expression de *Upd3* (Shaw et al., 2010 ; Staley & Irvine, 2010) et de *Keren* (Ren et al., 2010), ce qui provoque l'activation des voies de signalisation JAK/STAT et EGFR respectivement, induisant la prolifération des ISC. Par conséquent la voie de signalisation Hpo/Yki permet aux EC de signaler aux ISC lorsqu'ils sont endommagés tout en agissant comme un capteur de stress épithélial dans les EC.

3.4 Différents types de stress influencent l'activité des ISC

Le contact entre l'intestin et le milieu environnant est continu. L'intestin remplit plusieurs fonctions parmi lesquelles la défense contre de fortes contraintes comme les agressions physiques (lésions), chimiques (stress oxydatif) ou pathogènes. Dans ces conditions, différents types de réponses de l'intestin peuvent être déployés. Les agents peuvent agir de deux façons différentes : positivement ou négativement, ils peuvent être bénéfiques ou maléfiques. Dans certains cas, le système digestif se détruit d'une façon irrémédiable. Pour lutter contre les attaques extrêmes par les microbes, le système immunitaire local est activé. En parallèle, la reconstitution de l'intestin par les ISC est requise pour le rétablissement de l'intégrité du tissu et le retour à un état physiologique normal. Les mêmes voies de signalisation actives en conditions basales sont réutilisées dans les conditions des stress, quoiqu'avec quelques adaptations spécifiques. Dans ce qui suit, je décris quelques démarches expérimentales pratiquées lors de l'induction de la régénération de l'intestin moyen de la mouche. Ensuite je présenterai les signaux transmis à l'ISC dans des états de stress pour l'activation des voies de signalisation mitogéniques notamment EGFR, Wnt et JAK/STAT.

3.4.1 Agents inducteurs de la régénération de l'intestin moyen

Différents agents pathogéniques ou chimiques induisant des lésions tissulaires ont été utilisés pour activer la régénération intestinale :

- 1- Divers types de bactéries Gram négatives pathogènes infectieuses comme *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora* (Ecc15), *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* ...) et Gram positives comme *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Apidianakis et al., 2009 ; Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009; Buchon , Broderick , Poidevin , et al., 2009 ; Vodovar et al., 2005 ; Loudhaief et al.,2017) ont montré leur capacité à activer la prolifération des ISC.
- 2- Plusieurs agents chimiques toxiques tels le peroxyde d'hydrogène ou le paraquat qui induisent un stress oxydatif via la production d'espèces réactives de l'oxygène (Choi et al., 2008), le sulfate de sodium de dextrane (DSS) qui perturbe la membrane basale, ou la bléomycine, un antibiotique cytotoxique produisant des dommages à l'ADN des EC (Amcheslavsky et al., 2009).
- 3- L'expression ciblée de gènes proapoptotiques tels que Reaper (Rpr) dans les EC induisant leur mort (Jiang et al., 2011).

3.4.2 Régulation de la régénération intestinale en réponse aux stress

Les infections bactériennes et les agents cytotoxiques endommagent principalement les cellules épithéliales intestinales notamment les EC. Elles sont donc les premières cellules à affronter les facteurs de stress ce qui induit leur apoptose (Amcheslavsky et al., 2009 ; Apidianakis et al., 2009 ; Buchon et al., 2010 ; Jiang & Edgar,2009). Il est connu que, chez la drosophile, l'ingestion de fortes doses de bactéries opportunistes telles qu'*Ecc* (plus de 10⁸ CFU par drosophile) ou de pathogènes tels que *Pe* induit l'apoptose des EC. Cette apoptose stimule la prolifération des cellules souches intestinales pour remplacer les EC mourants. Ce modèle est appelé « mort cellulaire régénératrice » (Vriz et al., 2014) .A une dose plus faible (10⁶ CFU par drosophile), les bactéries *Btk* sont éliminées rapidement au bout de 4 heures, et pourtant, ce passage rapide est suffisant pour stimuler la régénération intestinale sans qu'il y ait apoptose d'EC (Loudhaief et al., 2017). La mort des EC induit donc l'activation et la prolifération des ISC pour réparer les dommages intestinaux. Tandis que l'induction de l'apoptose par l'expression du facteur Reaper dans les EC est suffisante pour provoquer la prolifération des ISC même en absence d'infection (Jiang et al.,2011 ; Amcheslavsky et al., 2009 ; Apidianakis et al., 2009 ; Jiang & Edgar,2009).

Au niveau moléculaire, la sécrétion du ligand Upd3 est induit par les EC abimées (stressés ou en apoptose). Ainsi Upd3 s'accroche à son récepteur Dome présent à la surface des ISC, activant la voie JAK/STAT au sein des ISC ce qui déclenche leur prolifération et assure le renouvellement tissulaire (feedback loop) (Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009 ; Jiang et al., 2009). En parallèle, le ligand Keren, sécrété par les EC, stimule l'activation de la voie de signalisation EGFR et promeut la prolifération des ISC en coordination avec JAK/STAT (Buchon et al., 2010 ; Jiang et al., 2011). Les EC endommagées envoient aussi des signaux aux muscles viscéraux environnants qui à leur tour secrètent le ligand Vein qui conduit à la prolifération des ISC (Buchon et al., 2010 ; Jiang et al., 2011). Récemment les chercheurs ont découvert un autre rôle de la voie EGFR dans la régénération des EC. L'infection n'aboutit pas seulement à la prolifération des ISC mais elle est aussi la cause de l'induction de l'augmentation de cycles d'endoréplication des EC (les EC sont naturellement polyploïdes, avec 8 à 16 copies de leur génome (Choi et al., 2011). Pendant la régénération, les EC nouvellement formées héritent de la signalisation EGFR activée via les EB, et subissent de multiples cycles d'endoréplication qui conduisent à l'hypertrophie des EC et à une ploïdie plus élevée. Les plus gros EC compensent ainsi ceux qui sont morts (Xiang et al., 2017).

Les EB quant à eux jouent un rôle dans la régulation de la prolifération des ISC. Il a été montré que suite à une infection bactérienne (*P. entomophila*, *Ecc15*), les EB sécrètent le ligand Spitz de la voie EGFR et les ligands Upd1-2 de la voie JAK/STAT et stimulent leurs voies respectives au sein des ISC conduisant leur prolifération (Buchon et al., 2010 ; Jiang et al., 2011). De plus, suite à une intoxication avec l'agent chimique DSS, les EB sécrètent le ligand Wg et activent la signalisation Wg/Wnt au sein des ISC via l'activation de l'expression de *myc* (Cordero et al., 2012).

La voie EGFR agit en aval de JAK/STAT afin d'induire la prolifération des ISC lors des dommages aigus (Buchon et al., 2010 ; Jiang et al., 2011 ; N. Xu et al., 2011). En effet, des études épistatiques ont démontré que l'induction de la prolifération des ISC par les ligands Upds suite à une infection bactérienne est abolie dans un fond mutant EGFR. De plus, Xu et al ont montré que EGFR, Wg/Wnt et JAK/STAT agissent en coordination pour assurer la régulation de la prolifération des ISC et que l'inhibition simultanée des trois voies de signalisation induit une perte des ISC.

Donc l'endommagement des EC lors de stress infectieux ou chimiques active de façon indirecte la prolifération des ISC, favorisant ainsi leur renouvellement et/ou remplacement. Mais de manière intéressante, après une forte perte des ISC, les EC peuvent se différencier et acquérir des capacités « souches » afin de rétablir l'homéostasie tissulaire (Lucchetta & Ohlstein, 2017)

.Dans le cas d'un stress intense comme par exemple une carence nutritionnelle pour 2 jours, le nombre des EC diminue fortement ce qui aboutit à la formation *de novo* d'ISC d'une manière originale. L'apoptose dédifférencie les EC seulement dans les situations de stress extrême ce qui permet le retour à un état de diploïdie proche de celui des ISC, afin de reconstituer leur nombre et maintenir l'homéostasie du tissu (Lucchetta & Ohlstein, 2017) (Fig.17).

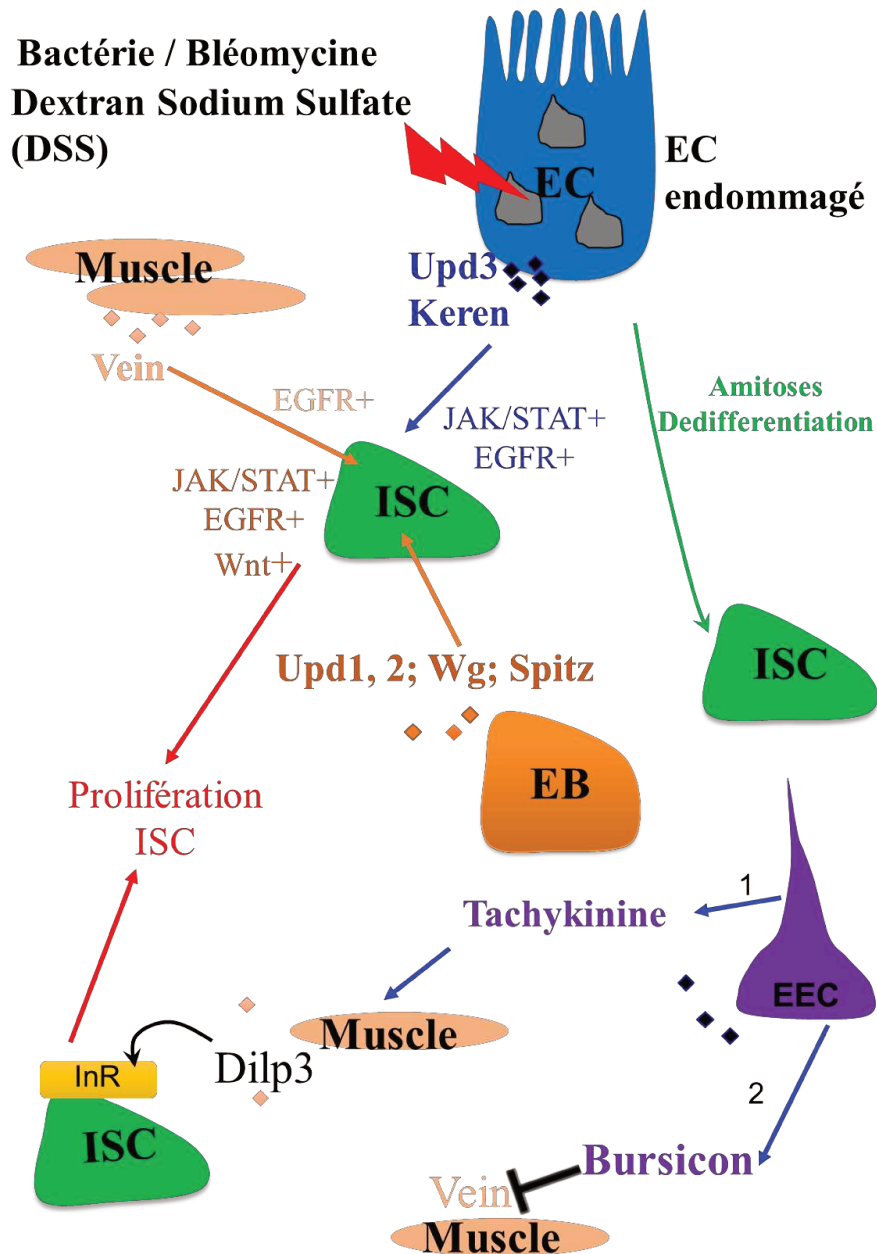


Figure 17: la régénération intestinale en réponse aux stress

Les cellules souches intestinales (ISC) reçoivent des signaux transmis par un grand nombre d'éléments de son environnement, à la fois des sources épithéliales : Les EC, les EB, les EEC, et non épithéliales : les muscles viscéraux (MV). Le contrôle de l'homéostasie du système intestinal par ces éléments est effectué via la sécrétion de différents signaux moléculaires dont la production est influencée par divers stress (Dextran Sodium Sulfate (DSS), bléomycine, infection bactérienne).

3.5 Régulation de la prolifération et de la différenciation des ISC chez les mammifères

Une brève description du contrôle de la prolifération des ISC chez les mammifères par les voies Wnt et Notch(N) et de leur différenciation par BMP est présentée dans la partie suivante.

3.5.1 La voie de signalisation Wnt

Au sein de l'intestin des mammifères, la voie mitogénique la plus active est la signalisation Wnt. Un gradient décroissant de la crypte vers le villus existe ; l'activité extrême se localise à la base de la crypte (Batlle et al., 2002). L'activation de la voie Wnt est indispensable pour maintenir les CBCs et assurer la différenciation terminale des cellules de Paneth. L'arrêt de la prolifération des CBCs dans des conditions normales et pathogéniques et la dégénérescence de la crypte sont les résultats de l'inactivation de Wnt (Kuhnert et al., 2004 ; Pinto et al., 2003). La sécrétion des ligands Wnt provient des cellules de Paneth et du stroma voisin (Sato et al., 2009 ; Valenta et al., 2016).

A rappeler que chez la drosophile, les muscles viscéraux environnants et les EB sont responsables de la production du ligand Wg. Les chercheurs ont démontré la conservation de la notion de « niche » des ligands Wg/Wnt et le rôle de signalisation Wg/Wnt dans la prolifération des ISC dans l'intestin moyen de la drosophile adulte et chez les mammifères.

3.5.2 La voie de signalisation Notch

Chez la drosophile, N permet la restriction de la prolifération des ISC tandis que chez les mammifères elle représente une voie mitogénique essentielle. La perte totale des CBCs et des TA est causée par l'inhibition de la voie N, accompagnée d'une forte croissance du nombre de cellules sécrétrices (Milano et al., 2004 ; Van Es et al., 2005). En revanche, l'excès d'expression de NICD est suffisant pour l'expansion de la partie proliférative et la perte de la lignée sécrétrice (Fre et al., 2005). Ainsi, la prolifération des ISC et le choix du destin EC sont déterminés par la voie Notch. On retrouve donc une conservation de certains aspects de la signalisation Notch entre l'intestin de drosophile et des mammifères.

3.5.3 La voie de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMP)

Les protéines BMPs sont des facteurs de croissance, appartenant à la famille des TGF- β (Feng & Derynck, 2005 ; Miyazono et al., 2005 ; Moustakas & Heldin, 2009). Le ligand BMP est enrichi dans la région mésenchymateuse entourant les villosités d'où il signale à l'épithélium

intestinal pour restreindre la prolifération des ISC (Hardwick et al., 2004). Le blocage de la signalisation BMP dans l'intestin de souris aboutit à la formation ectopique de cryptes dans la région des villosités. De plus, la morphologie intestinale est altérée dans ce contexte, et une différenciation aberrante de la lignée sécrétrice a été observée. Au contraire de la signalisation Notch, la signalisation BMP assure donc la restriction de l'hyperprolifération des ISC comme chez la drosophile, et elle est requise pour la différenciation de la lignée cellulaire sécrétrice.

3.6 Perturbation de l'activité des ISC et pathologies intestinales

Les mutations touchant les composants des voies de signalisation cellulaires sont les principales causes de l'apparition de cancers gastro-intestinaux humains. L'activation des voies de signalisation mitogène ou l'inhibition des voies de différenciation aboutissent à l'hyperprolifération des ISC ce qui cause le développement cancéreux dans l'intestin grêle des mammifères comme dans l'intestin moyen de la drosophile (Apidianakis et al., 2009 ; Sansom et al., 2004).

Chez l'homme, la principale cause de cancers colorectaux est due à l'activation anormale de la voie Wnt qui affecte principalement des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *Apc* (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Sansom et al., 2004). En effet, la perte d'*Apc* favorise l'apparition d'adénomes qui, lorsqu'ils sont couplés à des mutations oncogéniques secondaires comme Ras (agissant en aval de la signalisation EGFR) peuvent se développer en adénocarcinomes agressifs donnant lieu à des métastases.

Comme chez les mammifères, la mutation *Apc1* conduit à une prolifération des ISC chez la drosophile et à une hyperplasie intestinale (Lee et al., 2009). Dans les deux cas, ceci est dû à la surexpression du protooncogène *myc*, un effecteur actif en aval de la signalisation Wg/Wnt provoquant la formation de tumeurs intestinales (Athineos & Sansom, 2010 ; Finch et al., 2009 ; Lee et al., 2009 ; Sansom et al., 2007).

Chapitre 4 : Objectif de la thèse

4.1 Objectifs de la thèse : Etude des effets de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* sur la physiologie intestinale

L'opinion publique et les efforts politiques poussent à la réduction de l'utilisation des pesticides chimiques. En revanche, la production des bioinsecticides est en plein essor, parmi lesquels les produits constitués de spores de la bactérie sporulante opportuniste *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). La particularité de *Bt* c'est sa capacité à produire lors de la sporulation des toxines Cry isolées dans un cristal et possédant des caractéristiques entomopathogènes.

Les produits utilisant la souche *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk*) sont extrêmement efficace contre les larves de lépidoptères ravageuses de cultures (tomates, choux, maïs, poireaux etc...). Ils sont très utilisés en agriculture biologique et on les trouve aussi présents dans l'agriculture conventionnelle.

Ces dernières années, le doublement de la surface mondiale en agriculture biologique aboutit à l'augmentation de l'utilisation des produits de biocontrôle (englobant les biopesticides), avec une hausse de 8,5% en 2019 (www.ibmafrance.com). Les produits *Bt* représentent 75% du marché des bioinsecticides avec 32 000 tonnes vendus par an (Casida & Bryant, 2017). Les efforts entrepris nationalement et internationalement pour réduire l'utilisation des pesticides chimiques vont conduire, dans le futur, à une poursuite de l'augmentation de leur utilisation. **Devant cette croissance, l'Homme et l'animal se trouvent toujours plus exposés aux bioinsecticides, et en particulier à *Btk* à travers l'alimentation. La question qui se pose ici et dont la recherche des réponses est urgente, est : quels sont les effets potentiels à long terme de ces produits sur la santé et l'environnement ?**

Les bioinsecticides *Bt* fonctionnent par ingestion et détruisent le tube digestif des organismes cibles. La partie la plus postérieure de l'intestin moyen est un lieu favorable à la germination des spores et à la libération des toxines Cry des cristaux. La conséquence est la destruction de l'épithélium intestinal. La spécificité de l'action de *Btk* revient à la présence de récepteurs particuliers à la surface de l'épithélium intestinal des larves de lépidoptères. En effet, bien que le récepteur principal aux toxines Cry soit une cadhérine (composant universel des épithélia)(St Johnston & Ahringer, 2010), l'existence de récepteurs secondaires spécifiques aux lépidoptères est nécessaire pour que les toxines s'insèrent dans la membrane des entérocytes, forment des pores et les tuent (Adang & Crickmore, 2014). Ceci crée des brèches dans l'épithélium

favorisant la pénétration des spores de *Btk* ayant germées, que l'on appelle « bactéries ou cellules végétatives », dans le milieu intérieur, ce qui aboutit à une septicémie et par la suite la mort de l'insecte ciblé en 2-3 jours. Grâce à leur mode d'action, les toxines Cry présentent une grande spécificité en termes de toxicité aigüe envers les larves de lépidoptères tout en respectant les autres organismes de l'écosystème, dont l'homme. Sur une courte durée, aucune dangerosité sur les organismes non cibles dont les mammifères, n'est détectée ([Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016](#)). Ceci repose sans doute en partie sur les capacités de régénération et de défense de l'épithélium intestinal qui est capables de surmonter les effets néfastes liés à une ingestion de bactéries pathogènes ([Bonfini et al., 2016](#)). Cependant cela n'exclue pas la possibilité que l'équilibre physiologique de l'intestin puisse être affecté par des ingestions répétées sur une longue durée mettant **alors la santé intestinale et/ou systémique de l'organisme en danger**. Cependant il est dommageable que des études d'une exposition prolongée à faible dose de bioinsecticides *Btk*, des organismes non-cibles, n'aient pas encore été réalisées ([Avis de l'Anses, Saisine n° 2013-SA-0039](#)).

Il est important de savoir que la durée de persistance des bactéries *Btk* (spores et/ou végétatives), dans l'intestin suite à la prise d'un seul repas contaminé par les produits *Btk* (aux doses d'usage en agriculture biologique) est estimée à 10 jours chez la drosophile (Salma Hachfi, données non publiées) et 30 jours chez la souris ([Oliveira-Filho et al., 2009](#)), deux organismes non-cibles. Ajoutons, que 5 jours après l'arrêt de l'utilisation de bioinsecticides *Btk* par des agriculteurs, les spores sont encore présentes dans leurs échantillons fécaux ([Jensen et al., 2002](#)). Chez les mammifères, un état pro-inflammatoire pouvant progresser en maladies inflammatoires intestinales chroniques de type Crohn ou colite ulcéreuse et dans le pire des cas sa dégénérescence en cancers, est causé par la présence prolongées ou répétées de bactéries non commensales (allochtones) dans l'intestin. Cet état intestinal pro-inflammatoire est aussi présent chez la drosophile suite à l'ingestion de petite quantité de *Btk* ([Loudhaief et al., 2017](#)). Enfin, les bactéries du groupe *Bacillus cereus* (incluant *Bt*) occupent la deuxième place dans la liste des causes d'intoxication alimentaire en France et la 3ème en Europe (invs.santepubliquefrance.fr).

Au-delà des effets que peuvent avoir les bactéries *Bt* sur l'intestin, une interaction entre les toxines Cry et les nombreuses protéines extracellulaires de l'épithélium intestinale peut avoir lieu, notamment une interaction entre les toxines Cry et les protéines d'adhésion cellulaire telles que les cadhérines formant les jonctions serrées des épithélia ([St Johnston & Ahringer, 2010](#)). En effet, ce sont des membres de cette famille qui jouent le rôle de récepteur principal aux

toxines Cry dans l'épithélium intestinal des organismes cibles. Même si cela n'a pas des conséquences à court terme sur les organismes non-cibles, il peut en résulter l'induction d'impacts sur le long terme ou sur des individus qui souffrent déjà de pathologies intestinales. **Toutes ces informations suggèrent que l'utilisation des bioinsecticides *Btk* de façon intensive pourrait être impliquée dans le développement de pathologies digestives.**

L'objectif essentiel de mon projet de thèse est de détecter l'influence de l'ingestion de faible dose de bioinsecticides *Btk*, sur la physiologie intestinale et plus précisément sur l'homéostasie cellulaire intestinale. Pour atteindre ce but, j'ai utilisé la drosophile comme système modèle. Le choix de la drosophile n'est pas venu par hasard. La drosophile est déjà un organisme non-cible de *Btk* favorisant l'étude des effets non-létaux. Ensuite, les outils génétiques, cellulaires et moléculaires disponibles chez cet insecte permettent de déterminer les mécanismes physiologiques affectés et impliqués dans les effets observés. Les mécanismes biologiques contrôlant la physiologie intestinale étant fortement conservés entre la drosophile et les vertébrés, le traitement des problèmes chez les mammifères en devient facilité (Pasco et al., 2015).

4.2 Méthode standardisée d'intoxication des drosophiles

Avant de décrire le protocole suivi, je veux me focaliser brièvement sur son importance. Tout d'abord nous l'avons développé en nous basant sur les multiples travaux publiés dans le domaine et en tenant compte des doses d'utilisation « plein champ » du bioinsecticide *Btk*. Ensuite il assure une reproductibilité des résultats et réduit les variations concernant le sexe, la température, la lumière, la nourriture, etc.

L'élevage des drosophiles est effectué sur un milieu nutritif normalisé (sa composition : 0,8% Agar, 2,5% sucre, 8% farine de maïs, 2% levure) à une température de 25°C avec un cycle jour/nuit 12h/12h. Ensuite j'ai utilisé des drosophiles femelles non vierges âgées de 5 à 6 jours (car plus grosses et donc plus facile à disséquer et leur intestin est totalement mature 3-4 jours post-éclosion) dans toute mes expériences. Dans chaque expérience, j'ai privé 10 mouches de nourriture 2 h avant leur intoxication afin de synchroniser la prise de nourriture. L'intoxication se fait avec 50 µl d'une solution (d'eau ou de sucrose, cf ci-dessous) contenant des spores sans cristaux, des spores + des cristaux (le bioinsecticide) ou des cristaux purifiés. Cette solution est déposée sur un papier filtre qu'on dispose à la surface du milieu nutritif dans un tube à drosophile de 5 cm². Les doses utilisées sont de 10⁷ spores pour 10 mouches et par tube (soit 10⁶ spores à disposition par drosophile). Cette dose correspond à la quantité présente à la surface des tomates

après traitement ([Avis de l'Anses, Saisine n° 2013-SA-0039](#)). La quantité de cristaux utilisés correspond à 30% du poids des spores, les cristaux de *Btk* représentant entre 25% et 30% du poids du produit insecticides (soit des spores de *Btk* et des cristaux) ([Agaisse & Lereclus, 1995](#)). Il est important de préciser que lors de la préparation des produits commerciaux, la membrane entourant la spore est dégradée libérant ainsi le cristal et l'endospore. Le produit commercial est donc constitué de deux entités bien distinctes : les endospores et les cristaux. Par abus de langage (en anglais) des scientifiques spécialistes du groupe *B. cereus*, l'endospore est communément appelée spore. Quand je parlerai de spores dans les pages suivantes, cela sous-entendra endospore ([Fig.1](#)).

L'évaluation des effets d'une ingestion de *Btk* sur la physiologie cellulaire intestinale est faite en utilisant deux souches de *Btk*: un produit commercial (Dipel ou Delfin) produisant cinq toxines Cry différents (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab) et une souche de *Btk* modifiée (nommée 4D22 ou *Btk Cry-*) ne produisant pas de toxines Cry obtenue du BGSC (Bacillus Genetic stock center, <http://www.bgsc.org>). *Btk Cry-* permet de pouvoir distinguer l'effet spore de l'effet cristal de toxines Cry. L'appellation *Btk Cry-* est donnée à cette souche pour insister sur le fait qu'elle ne produit pas de toxines Cry.

Lors de ma thèse j'ai examiné les effets des bactéries végétatives, des spores et des cristaux sur la physiologie intestinale. Pour mes expériences sur l'étude des effets de bactéries végétatives, j'ai fait l'usage du contrôle négatif du « LB avec 5% de sucre ». Pour les spores ou les cristaux de *Btk*, le contrôle utilisé était l'eau car les produits commerciaux sont dilués dans l'eau. Enfin il faut noter que dans chaque tube on a introduit 10 drosophiles qui sont restées en contact avec le milieu traité jusqu'au temps où on doit les disséquer.

Partie. 2 : Résultats

Chapitre 1 : Impact de la bactérie *Btk* sur la physiologie intestinale

1.1 Résumé

Le tube digestif est un organe vital requis pour l'absorption des nutriments et constitue la première barrière contre les agents pathogènes (virus, bactéries, les toxines) ou les produits chimiques (médicaments, pesticides) ingérés avec la nourriture et qui attaquent le tractus gastro-intestinal de façon continue. Pour maintenir son intégrité suite à l'ingestion de bactéries végétatives allochtones, l'épithélium intestinal utilise plusieurs systèmes de défense: (1) une barrière physique recouvrant la muqueuse intestinale soit le mucus chez les vertèbres ou la membrane péritrophique chez les invertébrés; (2) l'accélération de son renouvellement pour remplacer les cellules abimées (endommagées) et (3) la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des peptides antimicrobiens pour combattre les bactéries ingérées. C'est ce qu'on appelle « le système de défense ».

Des muscles lisses entourent l'intestin afin de lui permettre de se contracter d'une manière végétative pendant la prise alimentaire. Nommé péristaltisme, ces contractions possèdent plusieurs caractéristiques. Elles sont autonomes et involontaires, elles sont physiologiques, se propagent de l'antérieur vers le postérieur et n'aboutissent pas ou peu à des modifications de longueur et de structure de l'intestin. Leur rôle se résume par la poussée de la nourriture ingérée à travers l'intestin, afin de permettre la digestion et l'absorption des nutriments puis l'excrétion des fèces.

Dans notre équipe, nous avons mis en évidence et caractérisé un nouveau mécanisme de défense contre les bactéries opportunistes ingérées qu'elles soient Gram-positives comme *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ou Gram-négatives comme *Erwinia carotovora*, indépendant du système immunitaire. Ce mécanisme est l'apparition de spasmes viscéraux qui participent à l'élimination des bactéries opportunistes. Je vous résume le contenu ci-dessous. Ces travaux ont été réalisés en utilisant des bactéries végétatives, et non pas des spores, les spores étant la forme utilisée dans les produits bioinsecticides *Bt*.

Nos résultats montrent que moins de deux heures après ingestion par la drosophile de bactéries opportunistes végétatives, de fortes contractions viscérales spasmodiques sont présentes. Ceci provoque un raccourcissement de la longueur de l'intestin. Cependant, lorsque les mouches sont

nourries avec la bactérie commensale *Lactobacillus plantarum* nous n'avons observé aucun raccourcissement de l'intestin, mettant en évidence la spécificité de la réponse aux bactéries opportunistes. Ces spasmes sont le résultat de fortes contractions des fibres musculaires longitudinales et la durée de leur disparition est estimée à moins de 4 heures. En bloquant ces spasmes (en utilisant le Lopéramide, un inhibiteur non sélectif des canaux Ca^{2+} couramment utilisé en médecine pour bloquer les contractions des muscles viscéraux), nous avons montré que sans leur présence, l'expulsion rapide des bactéries opportunistes, ne peut pas avoir lieu. Nous avons ensuite caractérisé le circuit physiologique entre la présence de bactéries opportunistes et l'apparition des spasmes viscéraux. Immédiatement après leur arrivée dans l'intestin, les bactéries sécrètent un agent responsable de la croissance bactérienne, l'uracile (Du et al.,2016 ; K. A. Lee et al., 2013). La présence d'uracile déclenche une réaction immunitaire de l'hôte menant à la production de ROS autour de 1h PI par les bactéries allochtones, dépendant de DUOX (K. A. Lee et al., 2015 ; K. A. Lee et al., 2013). Et comme nous avons observé la contraction entre 1h et 2h PI (post-ingestion), nous avons supposé que les ROS pourraient être le signal activant. Pour tester cette hypothèse, nous avons ajouté à la nourriture de Dithiothréitol (DTT, un "anti" ROS). Nous avons remarqué que la neutralisation des ROS cause une absence de spasmes et une persistance plus longue des bactéries dans l'intestin. Toutes ces données montrent que les spasmes viscéraux suite à l'ingestion de *Btk* sont causés par la production de ROS. Les ROS et les spasmes viscéraux sont tous deux indispensables à l'expulsion des bactéries ingérées.

Suite à cela, nous avons identifiés le signal entre la production des ROS et les spasmes musculaires. L'implication du récepteur TRPA1 à la surface apicale des cellules entéroendocrines (EEC) dans l'accélération de la défécation lors de la production de ROS, a été auparavant démontrée (Du et al.,2016). Nous avons montré que lorsque le récepteur TRPA1 est absent il n'y a plus de spasme viscéral et la durée de persistance des bactéries augmente. Nous avons ensuite identifié le signal entre les EEC et le muscle viscéral. Puisque les EEC sont responsables de la sécrétion de peptides entéroendocrines qui régulent de nombreuses fonctions physiologiques, nous avons recherché précisément un peptide exprimé dans les EEC localisées dans la partie antérieure de l'intestin car c'est lieu où se déroulent les deux phénomènes : la production de ROS et l'activation de TRPA1. Plusieurs raisons nous ont poussés à choisir le peptide DH31. D'abord l'implication de TRPA1 dans la libération de DH31 chez la drosophile (Kunst et al.,2014) et de CGRP (Calcitonin gene related peptide), l'homologue de DH31 chez les mammifères (Benemei et al.,2014); ensuite DH31 a été impliqué dans le contrôle du

péristaltisme des muscles viscéraux et de la motilité des larves de drosophile (La Jeunesse et al.,2010 ; Vanderveken & O'Donnell, 2014) et enfin le gène qui code le récepteur DH31 (DH31- R) est exprimé dans la partie antérieure du muscle viscéral (Buchon et al .,2013 ; Dutta et al.,2015). La question qui se pose ici : la détection des ROS par TrpA1 pourrait-elle contrôler la sécrétion de DH31 ? En accord, nous avons détecté une accumulation de DH31 dans les EEC de la partie antérieure de l'intestin dans les mutants perte de fonction *TrpA1*, ce qui nous mène à conclure que la libération de DH31 par les EEC antérieures se fait sous le contrôle de la liaison ROS/TrpA1.

Ensuite le suivi de la réponse des cellules EEC antérieures exprimant DH31 à la présence de bactéries a été faite en suivant le flux de calcium intracellulaire. Pour cela j'ai spécifiquement exprimé un senseur de calcium dans les EEC exprimant l'hormone DH31. Nous avons remarqué que chez les mouches qui ont subi une intoxication par *Btk*, les EEC qui expriment DH31 présentent un flux de calcium intracellulaire spécifique, le flux atteignant son apogée durant les premières 15 minutes après l'ingestion des bactéries. Le flux de Ca²⁺ diminue ensuite d'une façon progressive jusqu'à ce qu'il s'arrête après 45 minutes. En se basant sur les données obtenues, on peut supposer que les EEC antérieures exprimant DH31 sont sensibles à la présence de bactéries allochtones et joueraient un rôle dans le déclenchement des spasmes. Pour confirmer que les EEC exprimant DH31 était effectivement impliquée dans l'apparition des spasmes viscéraux, nous avons forcé ces EEC à sécréter leur contenu en surexprimant Reggie (un composant majeur des microdomaines membranaires qui favorise la sécrétion de morphogènes (Katanaev et al.,2008). Nous avons ainsi observé de fortes contractions viscérales tout le long de l'intestin moyen confirmant qu'un facteur sécrété par les EEC exprimant DH31 était impliqué. Pour prouver définitivement l'implication de la libération de DH31 dans l'apparition des spasmes et l'élimination des bactéries, nous avons recouru i) à l'utilisation des mouches mutantes perte de fonction pour le gène *DH31*, ii) à l'invalidation spécifique de l'expression de *DH31* dans les EEC antérieures l'exprimant par ARNi et iii) à l'invalidation spécifique du récepteur DH31-R dans le muscle viscéral. Dans toutes ces conditions, nous avons observé que la persistance des bactéries végétatives *Btk* dans l'intestin augmente et en même temps que la disparition des spasmes. Ces résultats nous donnent à conclure que DH31 est effectivement engagé dans le transfert du signal des ROS dans le lumen vers le muscle viscéral.

Pour résumer l'enchaînement des événements on peut dire que l'intestin moyen antérieur repère la production d'uracile par les bactéries opportunistes ingérées. La réponse des entérocytes se

fait par la production de ROS en moins d'une heure. Les ROS endommagent les bactéries et bloquent leur prolifération. En parallèle, ces ROS sont détectés par une sous population de cellules entéroendocrines antérieures grâce au récepteur TRPA1. La liaison des ROS à TRPA1 induit un flux de calcium dans les EEC, ce qui favorisent la sécrétion de l'hormone DH31 (homologue du CGRP de mammifère) du côté basal. DH31 à son tour active son récepteur dans les muscles viscéraux voisins ce qui est suffisant pour déclencher une série de spasmes viscéraux favorisant l'expulsion rapide des bactéries.

Enfin, il faut mettre l'accent sur le fait que tous les éléments participants à cette réponse sont conservés dans le règne animal (les ROS, le récepteur TRPA1, les cellules entéroendocrines et le neuropeptide (DH31/CGRP)). Nous avons ainsi montré que l'hormone humaine CGRP induit des spasmes viscéraux chez la drosophile. De manière empirique et principalement basée sur des données cliniques, les contractions intestinales spasmodiques douloureuses lors d'intoxications alimentaires ou de gastroentérites sont considérées comme pathologiques chez l'humain. Mais en même temps il a été estimé que ces contractions sont nécessaires à l'élimination du pathogène. Notre étude montre d'une manière scientifique, et non plus empirique, l'importance de cette réponse intestinale dans l'éviction des bactéries opportunistes ingérées.

1.2 Article: Benguettat et al., PLOS Pathogens, 2018: The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria

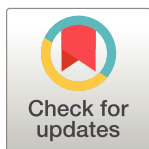
RESEARCH ARTICLE

The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria

Olivia Benguettat¹, Rouba Jneid^{1,2}, Julie Soltys¹, Rihab Loudhaief¹, Alexandra Brun-Barale¹, Dani Osman², Armel Gallet^{1*}

1 Université Côte d'Azur, CNRS, INRA, ISA, France, **2** Faculty of Sciences III and Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, LBA3B, EDST, Lebanese University, Tripoli, Lebanon

* gallet@unice.fr



OPEN ACCESS

Citation: Benguettat O, Jneid R, Soltys J, Loudhaief R, Brun-Barale A, Osman D, et al. (2018) The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *PLoS Pathog* 14(9): e1007279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279>

Editor: Karel Talavera, Catholic University Leuven, BELGIUM

Received: February 2, 2018

Accepted: August 13, 2018

Published: September 4, 2018

Copyright: © 2018 Benguettat et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported from Région Provence Alpes Côte d'Azur, Département des Alpes-Maritimes and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-CESA-0003-01 to AG). RL was supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. RJ was supported by a grant

Abstract

The digestive tract is the first organ affected by the ingestion of foodborne bacteria. While commensal bacteria become resident, opportunistic or virulent bacteria are eliminated from the gut by the local innate immune system. Here we characterize a new mechanism of defense, independent of the immune system, in *Drosophila melanogaster*. We observed strong contractions of longitudinal visceral muscle fibers for the first 2 hours following bacterial ingestion. We showed that these visceral muscle contractions are induced by immune reactive oxygen species (ROS) that accumulate in the lumen and depend on the ROS-sensing TRPA1 receptor. We then demonstrate that both ROS and TRPA1 are required in a subset of anterior enteroendocrine cells for the release of the DH31 neuropeptide which activates its receptor in the neighboring visceral muscles. The resulting contractions of the visceral muscles favors quick expulsion of the bacteria, limiting their presence in the gut. Our results unveil a precocious mechanism of defense against ingested opportunistic bacteria, whether they are Gram-positive like *Bacillus thuringiensis* or Gram-negative like *Erwinia carotovora carotovora*. Finally, we found that the human homolog of DH31, CGRP, has a conserved function in *Drosophila*.

Author summary

The intestine is the first barrier to fight non-commensal bacteria ingested along with the food. The innate immune system is the main mean mounted by the gut lining in response to ill-causing bacteria to avoid detrimental impact. Intestinal cells produce chlorine bleach and antimicrobial peptides that destroy exogenous bacteria. Here, we identified and characterized a new mechanism of gut defense that occurs rapidly after ingestion of exogenous bacteria. We found that the enteroendocrine cells perceive the presence of chlorine bleach in the lumen thanks to a sensor. This sensor promotes a calcium flux within enteroendocrine cells that allows the release of a hormone. This hormone acts locally on the visceral muscle surrounding the intestine by provoking its strong contractions (or spasms). We show that these strong but brief visceral contractions are helping to the quick expulsion of

from the association AZM & SAADE. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

the ingested bacteria thus limiting their potential detrimental impact on the intestine. Markedly, the bleach-sensor is well known to be involved in pain. Therefore we have deciphered in this study a biological mechanism that has so far been described only empirically by medicine, potentially explaining intestinal pain and visceral spasms upon food poisoning.

Introduction

The intestinal mucosa is endowed with several systems of defense to fight against the bacteria that are swallowed along with food. First of all, the gut epithelium is a sealed barrier preventing aggressors from crossing the epithelial layer [1]. Secondly, the gut lining is covered by mucus in vertebrates [2] or a peritrophic membrane in arthropods, which protects it from aggression [3, 4]. Furthermore the innate immune system produces reactive oxygen species (ROS) [5] and antimicrobial peptides (AMPs) to kill bacteria [6, 7]. Finally, the gut epithelium accelerates its cellular renewal to quickly replace damaged cells [8].

Another mechanism that is poorly understood, despite long-standing empirical evidence of its role in the eviction of pathogens, is visceral contractions or spasms. Limited data are available on the physiological and cellular mechanisms governing this process. In mammals, a denervated small intestine of guinea pig displays enhanced contractility upon infection by the parasitic nematode *Trichinella spiralis*, suggesting an intrinsic signal that triggers gut contractions. This enhanced motility is necessary for efficient elimination of the worm [9]. In rodents, it has been shown that the anterior portion of the intestine shows greater contractility following inflammation, compared to the posterior section (ileum and colon) [10]. The JAK/STAT pathway has been implicated in this hypercontractility, which is triggered by many parasitic nematodes [11, 12].

Recently, studies on *Drosophila melanogaster* have shed light on the relationship between the ingestion of pathogens and increased gut motility. Once in the gut, allochthonous bacteria (the Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora carotovora 15-Ecc15*) secrete uracil which would act as a bacterial growth factor [13, 14]. The presence of uracil triggers a host immune reaction leading to the DUOX-dependent production of ROS (hypochlorous acid, HOCl) which is released in the lumen [13, 15, 16]. Induced in less than 1 hour in *Drosophila*, the production of ROS is the first immune mechanism to fight ingested bacteria [16–18]. Interestingly, Du and colleagues have shown that the evolutionarily conserved Transient Receptor Potential A1 channel (TRPA1), known to be activated by a wide spectrum of chemical and mechanical stimuli [19, 20], binds HOCl and triggers increased defecation [14]. They further showed that TRPA1 is expressed in some enteroendocrine cells (EECs) located in the anterior part of the *Drosophila* adult midgut [14], which is also the domain of HOCl release [13].

Here, we used *Drosophila melanogaster* to gain insights into the signaling mechanisms underlying midgut visceral muscle contractions upon ingestion of opportunistic bacteria. We found that the Diuretic Hormone 31 (DH31), the fly homolog of the vertebrate Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) [21], produced by a subpopulation of anterior EECs, promotes strong visceral contractions less than 2 hours post-ingestion of bacteria. These visceral contractions are required to rapidly clear the ingested bacteria from the gut. Our results strongly suggest that the binding of HOCl to TRPA1 induces a calcium flux in anterior DH31-positive EECs, thus promoting DH31 release. Thereafter, DH31 binds to its receptor, DH31-R, in the neighboring visceral muscle and triggers contractions. Finally, we showed that the human CGRP displays an activity similar to DH31 and induces contractions of *Drosophila* visceral muscle.

Results

Ingestion of opportunistic bacteria rapidly induces local visceral muscle contractions

In order to determine whether the presence of opportunistic bacteria in the adult *Drosophila* midgut was able to trigger visceral muscle contractions, we first measured the length of the midgut. We have previously shown that the vegetative form of the bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*), a Gram-positive sporulating bacillus, was cleared from the adult *Drosophila* midgut in less than 4 hours when the amount of ingested bacteria is mild [22]. These data suggested that the defense mechanisms mounted by the midgut were established quickly after *Btk* ingestion. Therefore, we carried out a dose-dependent analysis of midgut length by providing to adult flies *Btk* in quantities ranging from 10^4 to 10^8 CFU (Colonies Forming Units) and then measuring the length of the midgut from 30 min to 4 h post-ingestion (PI) of the bacteria (Fig 1A and 1B). To ensure accurate timing, flies were allowed contact with the contaminated medium for only 30 min (see Materials & Methods). Interestingly, we observed a significant shortening in midgut length within 1 h PI (17% at 10^4 CFU, 18% at 10^6 and 13% 10^8 CFU) and this response was not dose-dependent (Fig 1B). The midgut recovered its normal length in less than 4 hours. No additional midgut shortening was observed at later time points. We also observed a similar midgut length shortening upon feeding flies with the opportunistic Gram-negative bacteria *Erwinia carotovora carotovora* 15 (*Ecc15*; S1A Fig). We also checked that this midgut shortening also occurred upon continuous feeding even though *Btk* persists for a longer time in the midgut [22]. Interestingly, we did observe both similar amplitude and timing of midgut shortening (S2B Fig). It is important to note that we did not observe any midgut shortening when flies were fed with unchallenged food (i.e. without bacteria), demonstrating that normal peristalsis does not promote significant changes in midgut length. Similarly, when flies were fed with the commensal bacteria *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) that persist for a longer time in the midgut (S2A Fig), we did not observe any midgut shortening (Fig 1C), highlighting the specificity of this response to opportunistic bacteria.

It has previously been shown that, upon continuous feeding with large amounts of *Ecc15*, *Drosophila* intestinal epithelial cells can delaminate as soon as 2 h PI and die by apoptosis soon after [23]. We investigated whether cell delamination and cell death could account for midgut shortening under our feeding conditions (e.g. a pulse of feeding with 10^8 CFU of *Btk* for only 30 min). We did not observe any cell delamination (Fig 1D and S3A Fig) or increase in staining of Caspase 3 (Casp3, a marker of apoptosis; Fig 1E). However, we observed that the midgut lining was thicker with elongated cells compared to unchallenged fly midguts (Fig 1D and S3A Fig). This observation was in accordance with a narrower lumen (S2D Fig) while the midgut width was not affected by the ingestion of *Btk* (S2E Fig). Considered together, our data suggested that the shortening of the midgut could be due to strong visceral muscle contractions. We tested this hypothesis using phalloidin staining, which binds to F-Actin and therefore strongly labels the muscle fibers. We observed significant thickening of some longitudinal visceral muscle fibers 2h PI scattered along the entire length of the midgut (Fig 1F and 1G and S3B Fig) indicating local strong contractions. Indeed, we noticed that a given longitudinal fiber was not contracted all along its length and that not all the longitudinal fibers were contracted at the same time. Therefore, we can assimilate what we observed to visceral spasms. We observed similar longitudinal muscle fiber contractions upon ingestion of *Ecc15* (S1B Fig) or upon continuous feeding with *Btk* (S2C Fig). Strikingly, we never observed the thickening of circular fibers, these latter being involved in normal peristalsis following food intake. Peristalsis corresponds to a wave of contractions of circular fibers associated with a relaxation of longitudinal fibers propagating along the length of the gut, leading to overall lengthening of

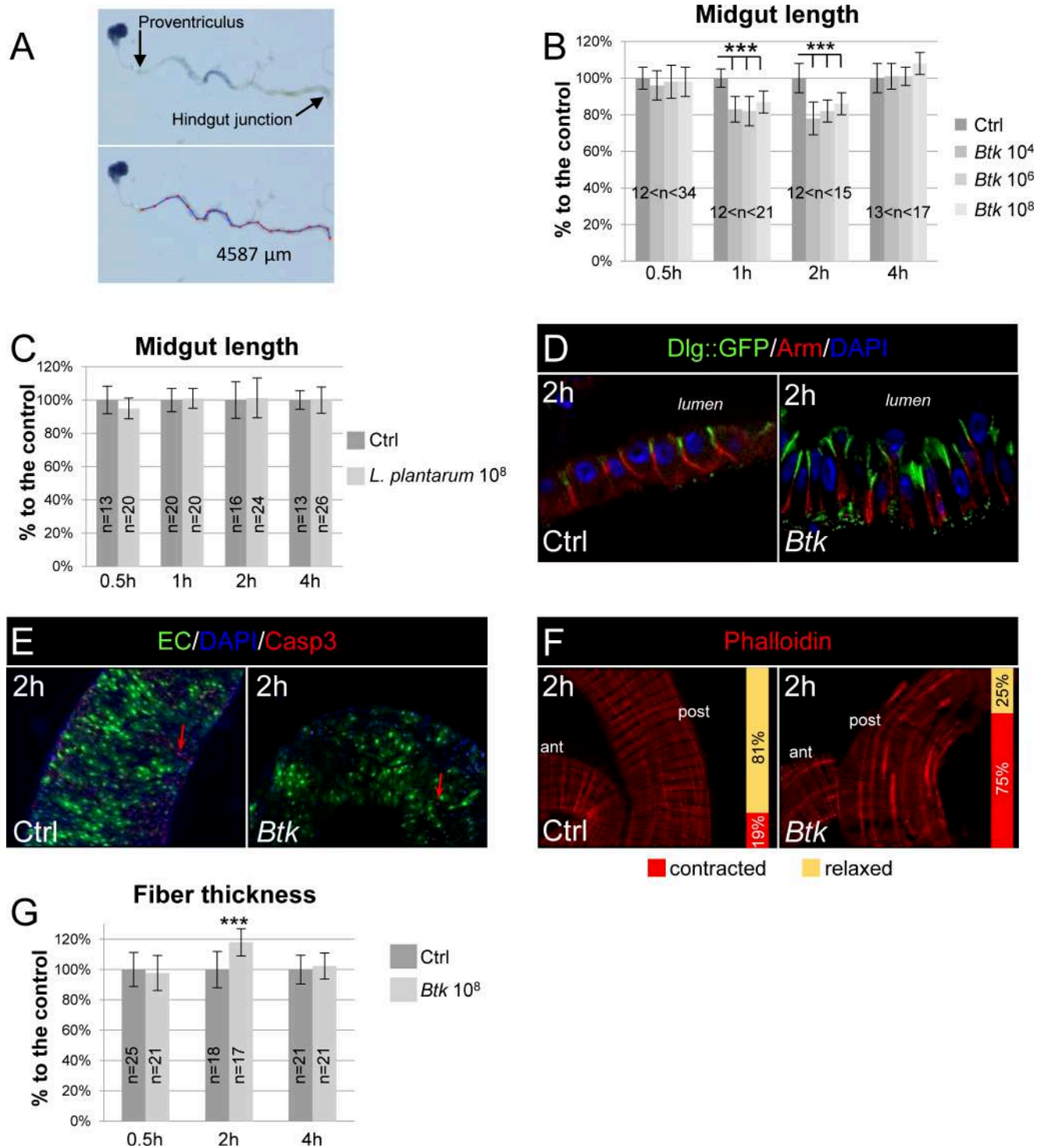


Fig 1. Ingestion of opportunistic bacteria rapidly induces visceral muscle spasms. (A) Pictures of a midgut dissected from a fly having ingested a blue food dye. The lower image shows the method to measure the length of the midgut between the proventriculus and the hindgut. (B) Measurement of midgut length upon intoxication by 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU of *Btk*. The length is expressed in function of the control (Ctrl, 100%). Flies were fed for 30 min and the measurements were taken 30 min, 1 h, 2 h and 4 h after the initiation of feeding. (C) Midgut length upon intoxication by 10^8 CFU of the commensal bacterium *L. plantarum*. (D) Immunolabelling of posterior midgut 2 h post ingestion of 5% sucrose (Ctrl) or *Btk* (10^8 CFU/fly) were provided. DAPI labels the nuclei (Blue), Arm marks the basolateral compartment (Red) and Dlg::GFP marks the apical compartment. (E) Caspase3 staining (Red, Casp3) of posterior midgut 2 h after feeding with 5% sucrose (Ctrl) or *Btk* (10^8 CFU/fly) were provided. Green marks the enterocytes (EC) and blue the nuclei (DAPI). Note the very few presence of apoptotic enterocytes (red arrow) in both conditions. (F) Visceral muscle fibers were labelled by Phalloidin 2 h after

feeding with 5% sucrose (Ctrl) or *Btk* (10^8 CFU/fly were provided). Note that only the longitudinal fibers are contracted in presence of *Btk*. Because the images are more apparent in the posterior midgut, this region was chosen to illustrate the visceral contractions in this figure and in all the following images. The vertical bars on the pictures indicate the proportion of intestines with (red) or without (yellow) contractions. (G) Measure of the width of the longitudinal visceral muscle fibers. Data are represented as a function of the control (Ctrl, 100%). Objective is 40X in D and 20X in E and F.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g001>

the intestine [24, 25]. Therefore, our results indicate that opportunistic bacteria rapidly provoke longitudinal visceral muscle contractions which do not correspond to peristalsis.

Visceral muscle contractions help to evict opportunistic bacteria

We sought to assess the role of these strong visceral contractions in the eviction of bacteria from the midgut. We used loperamide, a non-selective Ca^{2+} channel inhibitor that is commonly used in medicine to block spasmodic contractions of visceral muscles. As expected, the longitudinal visceral muscles were no longer contracted, whether loperamide was added alone or mixed with *Btk* (Fig 2A and 2B). We then monitored the amount of *Btk* that persisted in the midgut by counting *Btk* CFU growing from gut lysates. In absence of loperamide, *Btk* was eliminated in less than 4 h PI, whereas *Btk* persisted for at least 4 h at a dose of 2.18×10^3 CFU in the presence of loperamide (Fig 2C). Feeding *Drosophila* with *Ecc15* led to similar observations with *Ecc15* persisting a longer time in presence of loperamide (S1C Fig). Because the persistence of the bacteria could be due to an inhibition in HOCl production (immune ROS), we verified that loperamide did not impair its production. We used the R19S probe that specifically marks HOCl in the midgut lumen [26], initially confirming that the ingestion of *Btk* induced HOCl production. As expected, HOCl was quickly detected in the anterior midgut, within 30 min PI of *Btk*, with a peak at 1 h PI (Fig 2D). In the presence of loperamide, the production of HOCl by the anterior part of the midgut was not affected (Fig 2D). Noteworthy, we do not rule out the possibility that loperamide blocks visceral spasms in *Drosophila* indirectly through unknown mechanisms. At later time point, bacteria were still eliminated (Fig 2C) demonstrating that the other mechanisms of defenses (e.g. the production of ROS and AMPs) are efficient to ultimately eliminate opportunistic bacteria. In summary, our data showed that strong longitudinal visceral muscle contractions occur between 1 and 2 h PI of opportunistic bacteria and participate in their accelerated clearance from the midgut.

ROS signaling is required to promote visceral spasms

Our next step was to identify the cellular signal that triggers the midgut spasms. As we had observed these contractions between 1 h and 2 h PI, we surmised that HOCl could be the activating cue, given that it is one of the immune components produced around 1 h PI of allochthonous bacteria [13] (Fig 2D). To determine if ROS were indeed implicated in visceral muscle contractions, we complemented fly food with the ROS-quenching dithiothreitol (DTT, 10 mM) (S4A Fig) and monitored: 1) the amount of *Btk* remaining in the midgut, 2) the midgut length and 3) the visceral muscle contractions (Fig 3A–3C). As expected, by blocking ROS activity, bacteria persisted for a longer time in the gut but, as with loperamide, were ultimately eliminated at a later time point (Fig 3A) [27]. Furthermore, we also observed an absence of midgut shortening (Fig 3B) and an inhibition of visceral muscle contractions (Fig 3C). We proceeded to confirm these results by silencing the intestinal Dual Oxidase (DUOX) enzyme which is usually expressed in enterocytes and responsible for the production of immune HOCl [5]. We specifically down-regulated DUOX expression in enterocytes using the *Drosophila* TARGET system [28] with the *Myo1A-Gal4^{ts}* promoter (see [Material and methods](#)) to drive the expression of the *DUOX^{RNAi}*. We first confirmed that no HOCl was produced upon feeding with *Btk* (S4B Fig). As expected, we did observe an increase in *Btk* persistence (Fig 3D) and

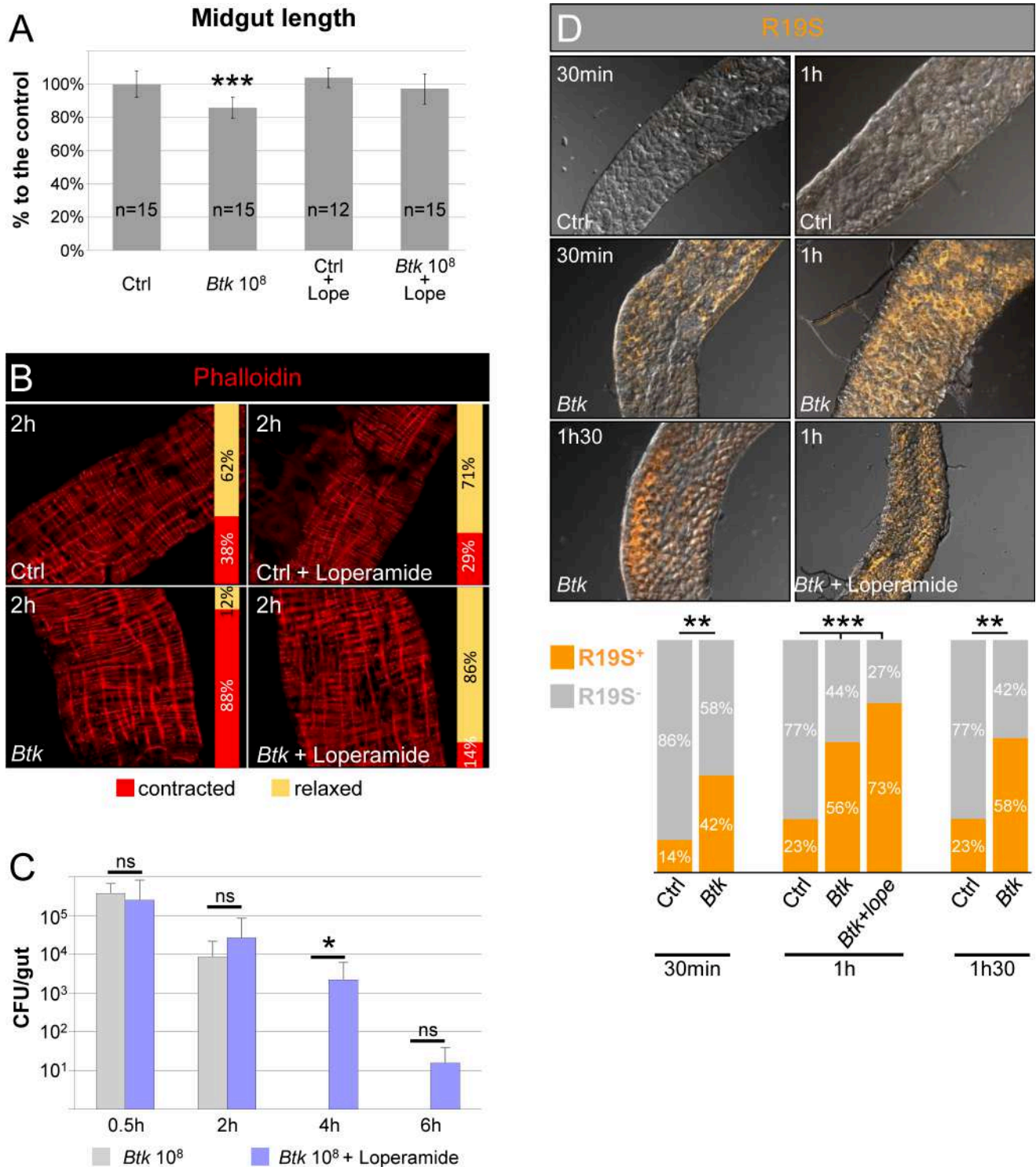


Fig 2. Visceral muscle spasms helps to evict opportunistic bacteria. (A) Measurement of the length or (B) phalloidin staining (red, 20X objective) of midguts from flies 2 h post-intoxication with sucrose (Ctrl), 10⁸ CFU of *Btk*, sucrose + loperamide or 10⁸ CFU of *Btk* + loperamide. (C) Monitoring of *Btk* persistence in the midgut of flies fed with 10⁸ CFU of *Btk* (grey bars) or 10⁸ CFU of *Btk* + loperamide (blue bars). Note that after 30 min of feeding, the same amount of *Btk* is recovered in the midgut (about 2.10⁵ CFU compared to the 10⁸ CFU/fly deposited on the medium). (D) Labelling of HOCl in anterior midgut by the R19-S fluorescent probe (Orange). Flies were fed with 10⁸ CFU of *Btk* or 10⁸ CFU of *Btk* + loperamide. 20X objective. The proportion of R19-S-positive (orange bars) intestines are presented in the graph below the pictures.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g002>

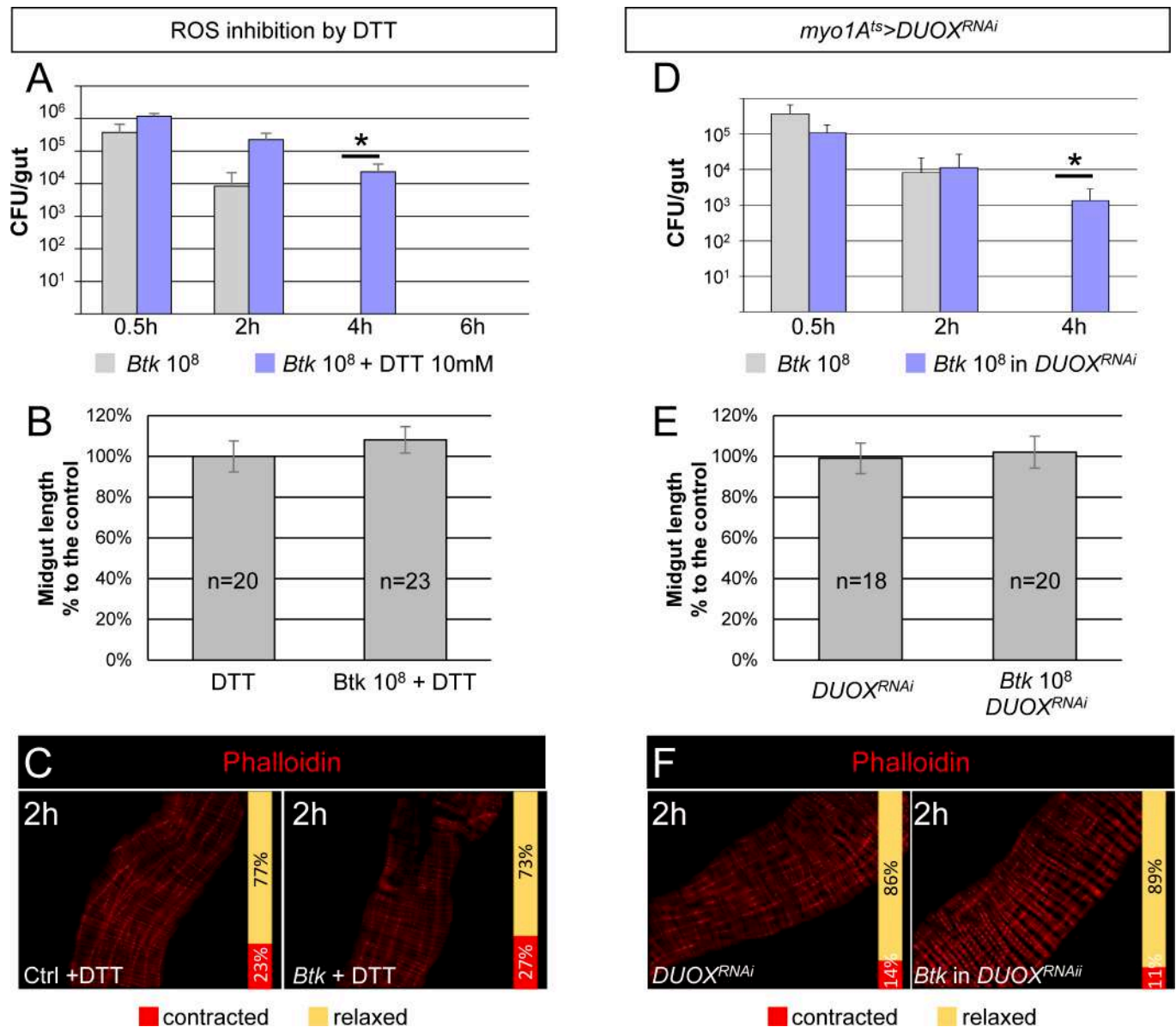


Fig 3. HOCl signaling is required to promote visceral spasms. (A) CFU counting in midguts of WT flies fed with 10⁸ CFU of *Btk* or 10⁸ CFU of *Btk* + DTT. (B) Measure of midgut length from flies 2 h post-intoxication with DTT (left) or 10⁸ CFU of *Btk* + DTT (right). (C) Phalloidin staining of posterior midgut 2 h after feeding with 5% sucrose (Ctrl) or *Btk* + DTT. 20X objective. (D) CFU counting in midguts of WT (grey bars) or *myo1A^{ts}>DUOX^{RNAi}* (where *DUOX* expression was silenced in enterocytes, blue bars) flies fed with 10⁸ CFU of *Btk*. (E) Measure of midgut length of *myo1A^{ts}>DUOX^{RNAi}* flies 2 h post-intoxication with sucrose (left) or 10⁸ CFU of *Btk* (right). Note that the silencing of *DUOX* in enterocytes does not affect the length of midguts compared to those from WT flies fed with 5% sucrose (Ctrl). (F) Phalloidin staining of posterior midgut of *myo1A^{ts}>DUOX^{RNAi}* flies after feeding with 5% sucrose (left panel) or 10⁸ CFU of *Btk* (right panel). 20X objective.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g003>

both midgut shortening and visceral muscle contractions were inhibited (Fig 3E and 3F). We also noticed during the estimation of *Btk* CFU in the midgut that there were many small colonies of *Btk* on the Petri dishes after overnight incubation when intestinal plated bacteria came from flies fed with Loperamide (production of ROS allowed but without visceral spasms) compared to flies fed with DTT (no ROS and no spasms) (S4C Fig). This observation confirmed that the presence of ROS in the lumen harms bacteria that need more time to grow once on the Petri dishes to compensate for the damages caused by the ROS [27]. Considered together,

our data showed that the production of ROS by the DUOX is responsible for visceral spasms upon ingestion of *Btk*, and that both ROS production and spasms are necessary to efficiently eliminate ingested bacteria.

TRPA1 is involved in visceral spasms and controls DH31 release

We investigated the signaling events that occur between ROS secretion in the lumen and the spasms of visceral muscle. It has recently been shown that the TRPA1 channel at the surface of a subset of anteriorly localized EECs was implicated in increased defecation upon ROS production [14]. Therefore we examined the role of TRPA1 in the visceral contractions of the longitudinal muscle fibers that we had previously observed. We took advantage of the homozygous viable *TrpA1*¹ allele [29] to assess the TRPA1 requirement for visceral muscle spasms. Interestingly, in homozygous *TrpA1*¹ midguts, *Btk* persisted for a longer time, the length was not shortened and the visceral muscle was not contracted (Fig 4A–4C).

Therefore, we wanted to identify the EEC signal that was affecting the visceral muscle. Given that EECs secrete peptides in response to many luminal inputs [30], we searched for putative enteroendocrine peptides that could regulate visceral contractions. We specifically searched for a peptide that was expressed in the EECs located in the anterior midgut because both immune ROS production [13] and HOCl-induced TRPA1 activation take place in the anterior part of the midgut [14]. We chose to focus on the DH31 peptide for several reasons. First, it has been shown that TRPA1 is implicated in the release of both DH31 in *Drosophila* [31] and CGRP in mammals [32]. Second, DH31 has been implicated in the control of visceral muscle peristalsis and motility in *Drosophila* larvae [33, 34]. Third, although DH31 is expressed in many EECs located in the posterior adult midgut, the expression of DH31 has been detected in few anterior EECs in the adult midgut [35, 36]. Fourth, two transcriptomic analyses in the *Drosophila* midgut revealed that the DH31 receptor-encoding gene (*DH31-R*) [37] is expressed in the anterior region of visceral muscle [38, 39] (<http://flygut.epfl.ch>; <http://flygutseq.buchonlab.com>).

We confirmed the expression of DH31 in anterior EECs using different sources of antibodies directed against DH31 [31, 40]. We observed a weak immuno-labelling in the anterior midgut, in contrast to the strong immuno-labelling in the posterior midgut (Fig 4D). Moreover, although we were able to detect DH31-expressing EECs in the R1 region (see <http://flygut.epfl.ch/histology> for the description of the midgut regions [39]), most of DH31-expressing EECs were scattered in the R2 region, with grouped cells in the R2b region (Fig 4D). We also noticed that among the R2b DH31-positive EECs there were two populations: one displaying a weak DH31 labeling (dark green arrow in Fig 4E) and one displaying a strongest labelling (bright green arrow in Fig 4E; compare Fig 4H to 4L).

We then considered whether TRPA1 might control DH31 release in response to ROS binding. Interestingly, we did observe more anterior EECs accumulating DH31 in *TrpA1*¹ mutant intestines (Fig 4E, 4F and 4H). We did not observe any change in DH31 labelling in the posterior midgut (S5A–S5D Fig). Feeding *TrpA1*¹ homozygous flies with *Btk* did not affect the accumulation of DH31 in anterior EECs (Fig 4G and 4H). In contrast, in a WT context, feeding flies with *Btk* or *Ecc15* promoted DH31 clearance from EECs, as DH31 became barely detectable in the anterior part of the midgut 1h PI (Fig 4I–4L and S1D and S1E Fig). Accurate observation of anterior DH31-positive EECs revealed that in absence of a stimulus (e.g. bacteria), EECs were fulfilled of DH31-containing vesicles (Fig 4M). Interestingly, we observed that the basal side of EECs were tightly intermingled with the underlying visceral muscle (Fig 4M) suggesting that DH31 could signal to the visceral muscle in a juxtacrine manner. Upon feeding with *Btk*, EECs were emptied of DH31-containing vesicles (Fig 4N). Unfortunately, we were

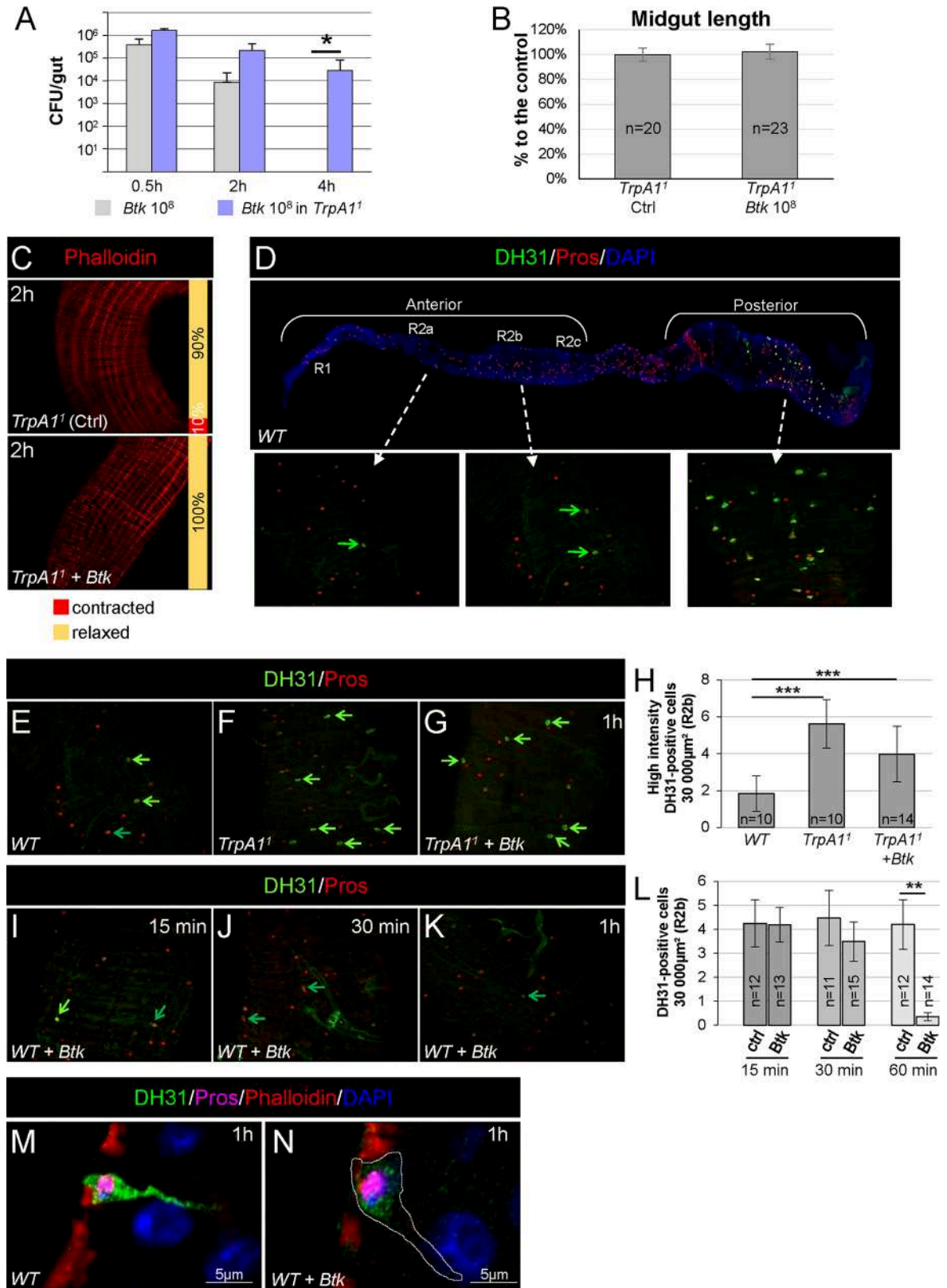


Fig 4. TRPA1 is involved in visceral spasms. (A) CFU counting in the midgut of WT (grey bars) or *TrpA1*¹ homozygote (blue bars) flies fed with 10⁸ CFU of *Btk*. (B) Measure of midgut length of *TrpA1*¹ homozygote flies 2 h post-intoxication with sucrose (Ctrl) or 10⁸ CFU of

Btk. (C) Phalloidin staining of posterior midgut of *TrpA1*¹ homozygote flies 2 h after feeding with 5% sucrose (Ctrl) or 10⁸ CFU of *Btk*. 20X objective. (D) Upper picture: reconstructed image of a WT midgut (10X objective). The midgut was stained for DH31 (Green) and Prospero (Red, Pros) that marks all the EECs. DAPI (blue) marks the nuclei. Anterior is to the left and posterior to the right. Lower insets: magnifications (40X objective) of the R2a (left), R2b (middle) and R4c (right) regions (<http://flygut.epfl.ch/>). (E-G and I-K) R2b anterior midgut region of WT flies (E and I-K) and *TrpA1*¹ homozygote flies (F and G) fed either with sucrose (E and F) or with 10⁸ CFU of *Btk* (G and I-K). (G and I-K) midguts were dissected and fixed 15 min, 30 min and 1 h PI as indicated on the pictures. Bright green arrows point EECs with a strong DH31 labelling and dark green arrows point EECs with a lower labelling. (H) Counting of high intensity DH31-positive EECs in the anterior R2b domain in conditions described in (E-G). (L) Counting of all DH31-positive EECs in the anterior R2b domain in conditions described in (I-K). (M and N) Fast AiryScan imaging of one representative EEC in the anterior R2b midgut domain of WT flies 1h PI of sucrose (M) or 10⁸ CFU of *Btk* (N).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g004>

unable to detect DH31 in neighboring cells or tissues. We assume that we reached the limit of the sensitivity of the anti-DH31 antibodies. Thus, altogether our data suggest that TRPA1 controls DH31 released from anterior EECs upon opportunistic bacterial ingestion.

DH31 peptide is required to promote visceral spasms

After activation, TRPA1 mediates a Ca²⁺ flux in EECs resulting in the release of neuro- and entero- peptides [20, 30]. To show that DH31-expressing EECs were indeed responding to the presence of bacteria, we monitored their activity by imaging calcium release. We used the *DH31-Gal4^{ts}* transgenic line to specifically drive the expression of the GCaMP6s calcium sensor [41, 42] in DH31-expressing EECs. We first established the expression pattern of *DH31-Gal4^{ts}* with GFP. GFP-positive EECs were mainly present in the R2b region of the midgut but we found in half of the midguts observed an EEC positive for DH31 immunolabelling that did not express the GFP (S6A and S6A' Fig), meaning that *DH31-Gal4^{ts}* did not perfectly mimic DH31 endogenous expression in the anterior midgut. In the posterior midgut, *DH31-Gal4^{ts}* perfectly reproduced DH31 endogenous expression (S6B and S6B' Fig). Next, we monitored Ca²⁺ release in *DH31-Gal4^{ts} UAS-GCaMP6s* flies between 15 and 60 min post *Btk* ingestion by counting GFP-positive EECs in the R2b region. We assumed that the downstream Ca²⁺ release that induces DH31 secretion, should occur before the onset of visceral spasms, i.e. less than 1 h after ingestion. In control flies fed with 5% sucrose, we only detected anterior GFP-positive EECs in 2/22 midgut samples at 15 min and 1/24 midgut samples at 45 min. We never detected anterior GFP-positive EECs at 30 min and 60 min (Fig 5A). Furthermore, posterior DH31-expressing EECs always displayed Ca²⁺ release (S7A Fig). On the contrary, upon ingestion of *Btk*, we frequently detected anterior GFP-positive EECs, but no obvious change was observed in the posterior compartment in comparison to control flies (Fig 5A and S7A Fig). Interestingly, the Ca²⁺ peak was rapidly induced post-*Btk* ingestion. Anterior GFP-positive DH31-expressing EECs were readily detected 15 min PI and the Ca²⁺ release progressively ceased after 30min (Fig 5A). Thus, our data suggest that anterior DH31-positive EECs are sensitive to the presence of opportunistic bacteria and trigger an intercellular release of Ca²⁺. On the contrary, posterior DH31-positive EECs do not seem to modify their activity in the presence of opportunistic bacteria.

To demonstrate that the release of DH31 was involved in strong visceral muscle contractions and bacteria eviction, we used homozygote-viable adult flies for the strong hypomorphic mutant allele *Dh31*^{KG09001} [31, 33]. Interestingly in *Dh31*^{KG09001} homozygote adults, we observed a longer persistence of *Btk* in the gut (Fig 5B), which was associated with the disappearance of both midgut shortening and visceral spasms (Fig 5C and 5D). We confirmed these results by silencing *DH31* expression in all EECs using the *voilà-Gal4^{ts}* driver [43]. We first verified that *DH31*^{RNAi} effectively down regulated DH31 production by quantifying both the *DH31* mRNA level by RT-qPCR and the DH31 protein level using anti-DH31 antibodies (S7B

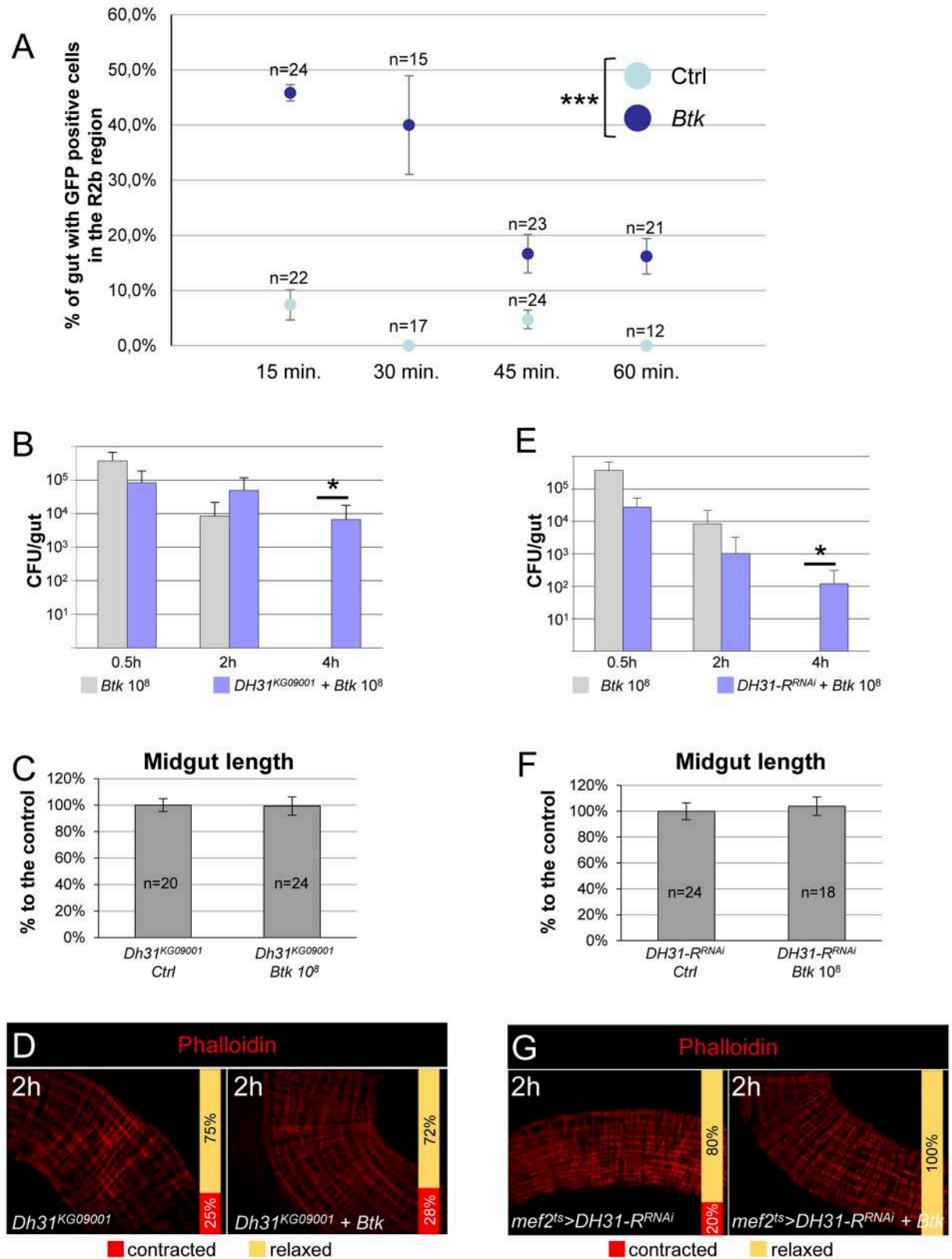


Fig 5. DH31 peptide is required to promote visceral contractions. (A) *DH31*^{ts}>*GCaMP6s* midguts were scored for GFP-positive EECs in the R2b region in control flies (light blue) or in flies fed with 10⁸ CFU of *Btk* (dark blue). Error bars correspond to the SEM. (B and E) CFU

counting in the midguts of WT (grey bars) or *DH31^{KG09001}* homozygote flies (B, blue bars) or *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* flies (E, blue bars) fed with 10^8 CFU of *Btk*. (C and F) Measure of midgut length of *DH31^{KG09001}* homozygote flies (C) or *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* flies (F) 2 h post-intoxication with sucrose (Ctrl) or 10^8 CFU of *Btk*. (D and G) Phalloidin staining of posterior midgut of *DH31^{KG09001}* homozygote flies (D) and *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* flies (G) 2 h after feeding with 5% sucrose (left) or 10^8 CFU of *Btk* (right). 20X objective.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g005>

and S7C Fig). As expected, down regulation of DH31 in EECs impaired bacterial eviction and prevented midgut shortening and visceral spasms (S7D–S7F Fig).

In addition, we down regulated the expression of the DH31 receptor (DH31-R) in visceral muscle using the specific *mef2-Gal4^{ts}* promoter to drive *DH31-R^{RNAi}* in the visceral muscle. Although the silencing was not total (S7B Fig; 64%), this was sufficient to impair *Btk* eviction, midgut shortening and muscle spasms (Fig 5E–5G). Therefore, our results show that the enter-oendocrine peptide DH31 expressed in anterior EECs is involved in the transmission of the HOCl-dependent signal from the lumen to the visceral muscle.

DH31 peptide is sufficient to promote strong visceral contractions

To confirm that DH31 was sufficient to promote strong visceral contractions, we forced DH31-expressing EECs to secrete their contents by over expressing Reggie/Flotillin, a major protein component of membrane microdomains that has been shown to promote morphogen secretion [44]. We specifically expressed Reggie in DH31-expressing EECs using the *DH31-Gal4^{ts}* driver [36, 45]. We observed shortening of the midgut length and strong visceral contractions scattered along the entire midgut (Fig 6A and 6B), confirming that at least one factor secreted by DH31-expressing EECs was involved. We were unable to promote any strong visceral contractions by expressing Reggie in all EECs using the *voila-Gal4^{ts}* driver, despite testing numerous conditions. This result suggests that one or several factors secreted by different EECs could be involved in the inhibition of strong visceral contractions to counteract DH31 activity.

Then, we overexpressed DH31 in DH31-expressing EECs. We noticed that 48 h of induction at 29°C was required before we could detect a substantial increase in DH31 immunolabelling in anterior EECs (S6C–S6D Fig). Under these conditions, we observed strong visceral contractions and a strong midgut shortening (Fig 6C and 6D). To further demonstrate that DH31 acts on its receptor at the level of the visceral mesoderm, we expressed a membrane anchored form of DH31 (t-DH31) in the visceral mesoderm using the *mef2-Gal4^{ts}* driver; t-DH31 has been shown to autonomously activate its receptor DH31-R [31, 46]. Again, we observed both strong visceral contractions and a midgut shortening (Fig 6E and 6F). Finally, we wondered whether loperamide could block visceral spasms through an inhibition of DH31 secretion. To investigate this possibility, we looked at DH31 accumulation in anterior EECs 1 h PI in midguts of flies fed with both loperamide and *Btk*. We did not observe any DH31 accumulation. Instead, we obtained a clearance of DH31 from anterior EECs similar to what we got by feeding flies with *Btk* alone (Fig 4K and 4L and S5E and S5F Fig). Altogether our data demonstrate that EECs-secreted DH31 is sufficient to trigger strong visceral contractions by directly acting on the longitudinal muscles through its DH31-R receptor.

The human DH31 homologue, CGRP, promotes strong visceral contractions

While DH31 and CGRP have only weak amino-acid sequence homology [21], DH31-R and its mammalian orthologue, CALCRL [47–49], display about 34% identity and 48% similarity (S8A and S8B Fig). Therefore, we wondered whether CGRP, the mammalian DH31 homolog, might also have an effect on visceral muscle contractions. Based on previous findings in

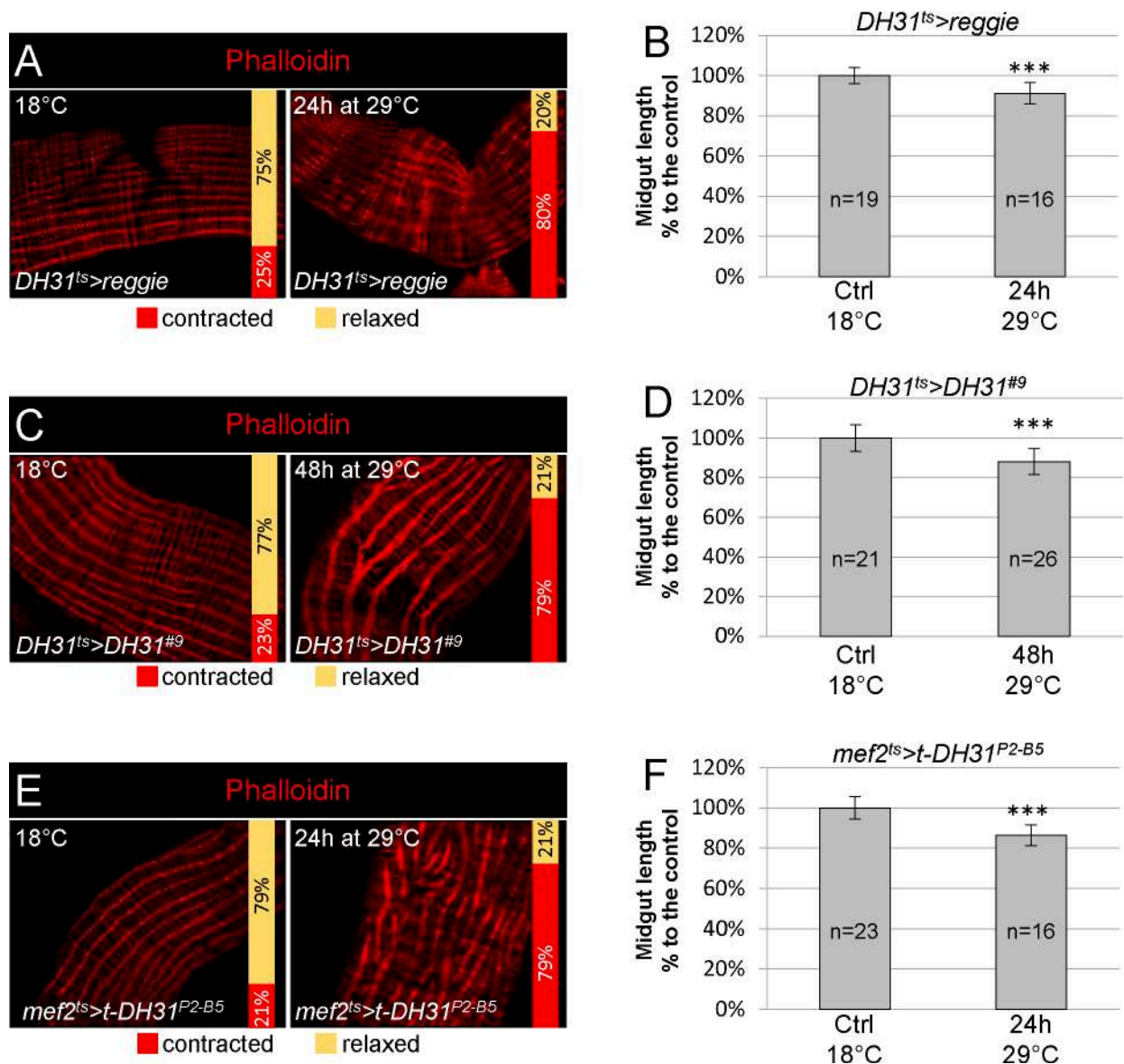


Fig 6. DH31 peptide is sufficient to promote visceral contractions. (A) Phalloidin labelling of posterior midgut of *DH31^{ts}>reggie* flies maintained at 18°C (control, left) or raised for 24 h at 29°C (right). 20X objective. (B) Measurement of midgut length in conditions described in (A). (C) *DH31^{ts}>DH31^{#9}* posterior midguts maintained at 18°C for control (left) or shifted for 48 h at 29°C (right) and stained with phalloidin. 20X objective. Overexpression of DH31 in all EECs induced strong visceral contractions. (D) Measurement of midgut length in the conditions described in (C). (E) *mef2^{ts}>t-DH31^{P2-B5}* posterior midguts maintained at 18°C for control (left) or shifted for 24h at 29°C (right) and stained with phalloidin. 20X objective. Ectopic expression of the membrane-tethered form of DH31 in the visceral muscle induced autonomous visceral contractions. (F) Measurement of midgut length in the conditions described in (E).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g006>

mammals [50], we fed flies with 40 µg/ml of the human αCGRP peptide. Interestingly, we observed gut shortening (Fig 7A) and strong visceral muscle contractions (Fig 7B) in a range comparable to what we observed upon ingestion of opportunistic bacteria (Fig 1) and upon overexpression of DH31 (Fig 6). To confirm that CGRP induced strong visceral contractions through binding to DH31-R, we fed *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* knock-down flies with CGRP. In this case, the αCGRP peptide was unable to promote midgut shortening and visceral contractions when the DH31-R was downregulated in visceral muscle (Fig 7C and 7D). Finally, to

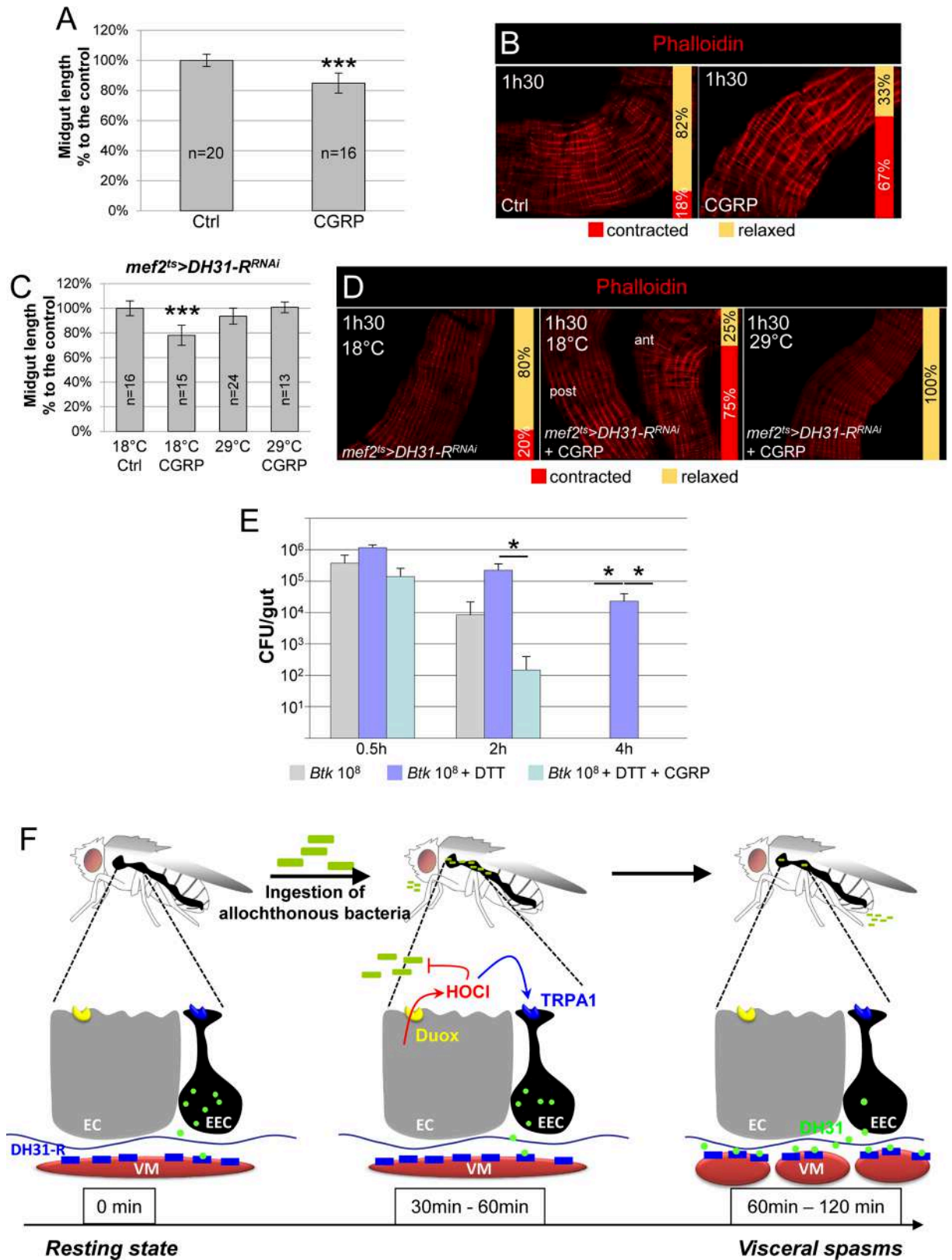


Fig 7. The human DH31 homolog CGRP promotes visceral contractions. (A) Midgut length of WT flies fed continuously either with sucrose (Ctrl) or with CGRP. (B) Phalloidin labelling of posterior midgut of WT flies fed continuously either with sucrose (Ctrl) or with CGRP. In (A

and B) flies were dissected 1h30 after the onset of feeding. (C) Midgut length of *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* flies raised at 18°C (the two left bars, Gal80^{ts} on/RNAi off) or shifted for 7 days at 29°C (the two right bars, Gal80^{ts} off/RNAi on) and fed with sucrose (first and third bars) only or with CGRP for 1h30 (second and fourth bars). The length is expressed in % to the control (Ctrl) (D) Phalloidin labelling of *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* midguts from flies fed with sucrose (left) or CGRP (middle and right) and maintained at 18°C (left and middle) or shifted for 7 days at 29°C (right). (E) CFU counting in the midgut of WT flies fed with 10⁸ CFU of *Btk* (grey bars) or 10⁸ CFU of *Btk* + DTT (blue bars) or 10⁸ CFU of *Btk* + DTT + CGRP (turquoise bars). Note that the ingestion of CGRP can rescue the absence bacterial eviction caused by the inhibition of ROS production. (F) Model summarizing the sequence of events following the ingestion of opportunistic bacteria. Left: In unchallenged flies, only a little DH31 is secreted by EECs, probably involved in peristalsis. Middle: Upon ingestion of opportunistic bacteria, enterocytes (EC) release immune ROS (HOCl) in a DUOX-dependent manner to damage the bacteria. EECs sense the presence of luminal HOCl thanks to the TRPA1 receptor. Right: large amounts of DH31 are secreted by EECs. DH31 reaches the visceral muscle where it binds its receptor DH-31R, promoting spasms of the visceral muscles (VM) to expel bacteria.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279.g007>

demonstrate that CGRP-induced spasms could accelerate the eviction of ingested opportunistic bacteria we designed an epistasis test by blocking ROS production with DTT and feeding flies with CGRP in presence of *Btk*. As expected, the ingestion of CGRP overcame ROS inhibition and promoted an accelerated bacterial eviction (Fig 7E). Altogether, our data demonstrate that the physiological function of DH31/CGRP is conserved across orders.

Discussion

In this study, we identified a new physiological circuit that is implicated in the local gut defense and participates in the elimination of ingested allochthonous bacteria (Fig 7F). We demonstrated that the production of immune ROS in response to the presence of allochthonous bacteria in the gut lumen leads to rapid and strong visceral contractions scattered along the midgut, which are involved in the elimination of the ingested bacteria. Most importantly, this quick and efficient response is enabled by a subset of anterior EECs that transmit the signal from the lumen to the visceral mesoderm by releasing DH31, a neuropeptide that presents a conserved function with CGRP in mammals (Fig 7F). This work reinforces the importance of EECs in the defense mechanisms of the gut, beyond the recent discovery of their involvement in innate immune response [38, 45, 51, 52] and in addition to their well-known functions in regulating feeding behavior and digestive physiology [30].

The control of DH31/CGRP secretion appears to be conserved not only in different tissues, but also across the animal kingdom. Indeed, in *Drosophila* brain, DH31 secretion is controlled by TRPA1 to promote awakening [31], and in mammals CGRP release is induced by TRPA1, for example, to control blood flow and blood pressure, and induces migraines [32, 49]. Moreover, TRPA1 belongs to the large family of pain-associated TRP receptors that act in sensitive neurons through the secretion of neuropeptides, including CGRP [19, 53]. In our study, we found that TRPA1 activation by immune ROS in a subset of anterior EECs is necessary to induce DH31 release. Surprisingly, while both immune ROS production and TRPA1 expression specifically occur in the anterior midgut (TRPA1 expression being absent from the posterior EECs [14]), the visceral spasms encompasses the whole midgut. Posterior DH31-positive EECs could contribute to the generation or propagation of spasms, although *DH31-R* is only weakly expressed in the posterior visceral mesoderm (<http://flygutseq.buchonlab.com/>). However, we did not observe any change in DH31 labelling in the posterior midgut upon ingestion of opportunistic bacteria. Similarly, Ca²⁺ release was differentially activated in the presence of opportunistic bacteria along the anterior-posterior axis, and was only fluctuating in anterior DH31-positive EECs. A source of DH31 from the central nervous system (CNS) is also unlikely since the *Drosophila* adult midgut is only innervated at its two extremities [39, 54]. Another possibility would be that the release of DH31 by anterior EECs (or the CNS) could enter the hemolymph and induce posterior midgut visceral contractions. Indeed, in mammals, enteroendocrine peptides can act at a very long distance after penetration in the

bloodstream, and consequent activity in many organs, including the brain [55]. However, here again, the low level of *DH31-R* expression in the posterior visceral muscle does not favor this hypothesis. Thus, the simplest explanation would be that binding of DH31 to its receptor in the anterior part of the midgut triggers a myogenic propagation of the signal (as seen with peristalsis in mammals [56]), generating spasms along the midgut.

The increased gut motility in response to the presence of pathogens appears to be a conserved response. Indeed, it has been shown in rodents that, upon ingestion of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*, the main mode of elimination is an enhanced propulsive activity of the intestine. Moreover, this physiological response is organ-autonomous since *ex-vivo* denervated intestine still responds to the presence *T. spiralis* [9, 57, 58]. This increased gut propulsive activity is linked to the thickening of both longitudinal and circular smooth muscle fibers [57, 59]. Recently, in *Drosophila*, it has also been shown that the opportunistic bacteria *Ecc15* induce accelerated defecation between 2 h and 8 h post-ingestion, although this was only observed in males [14]. Interestingly, this study also identified the requirement for both the immune ROS and the TRPA1 receptor to increase defecation. Blocking this accelerated defecation (i.e. in a *TrpA1* mutant) prolonged the persistence of the bacteria in the gut. Moreover, TRPA1 (isoform C in particular), expressed in a subset of anterior EECs was tissue-autonomously required [14]. These data, in rodents and in *Drosophila*, suggest a conserved function: increased gut motility that is autonomously controlled, as a means to evict pathogens from the gut. This increased gut motility occurs a long time after the ingestion of bacteria, is linked to accelerated gut peristalsis, and lasts from a few hours to a few days [14, 57]. Conversely, in our study, the visceral response occurs rapidly after bacteria ingestion, induces strong contractions of the longitudinal visceral muscle fibres and only lasts for a short period (about 1 h). Therefore, we can assume that these strong visceral contractions are the primary event evolving then towards accelerated intestinal motility/defecation until the pathogen is completely eliminated. Indeed, Du and colleagues (2016) fed flies for 2 h while we fed flies for only 30 min. When using their mode of oral intoxication (i.e. for 2 h), we also observed strong visceral contractions between 1 h and 2 h post ingestion, but we could still detect bacteria in the gut at 4 h. We believe that this likely due to the refill of the gut by newly ingested bacteria. Therefore, while the early massive visceral contractions are necessary to rapidly evict bacteria in response to a short period of intoxication, increased gut motility/defecation might be essential to expel pathogens upon prolonged ingestion or persistence in the gut. Interestingly the necessary elements are the same (i.e. ROS, EECs, TRPA1 and visceral muscles), but the switch from brief and violent visceral contractions to accelerated peristalsis may depend on the amount of DH31 that is secreted. Indeed, enteroendocrine peptides are stored in intracellular vesicles within EECs and are released as necessary [30]. We observed that upon the ingestion of bacteria, anterior EECs are almost cleared of DH31 in less than two hours, suggesting that large amounts of DH31 must initially be released to promote strong visceral contractions. Once secreted, the EECs have to refill their stock of DH31 through transcriptional activity, which takes time, therefore leaving little DH31 available for secretion. This low level of DH31 is probably insufficient to maintain strong visceral contractions, but might be sufficient to generate an accelerated, less deleterious peristalsis and consequently an increase in defecation. It is noteworthy that increased CGRP release in mammals has been associated with pain [49].

Similarly, the DH31 peptide and its CGRP orthologues in mammals have largely been implicated in gut motility/peristalsis in many different species, ranging from *Drosophila* larvae, to fish and mammals, and are always expressed in EECs [33, 34, 60–64]. Interestingly, in parallel to our observations, it has been shown that CGRP promotes a transient contraction of longitudinal muscle fibers followed by a longer phase of relaxation in the guinea pig ileum. In addition, increasing the doses of CGRP enhanced contraction at the expense of relaxation

[65]. Furthermore, intraperitoneal injection of CGRP in mice can induce diarrhea, which is in agreement with our *Drosophila* data [60]. Very interestingly Yoshikawa and colleagues showed that in mice that are deficient in RAMP1 (a subunit of the CGRP receptor), there is a suppression of anaphylactic diarrhea owing to a decrease in intestinal peristalsis. There is no difference in peristalsis in WT and RAMP1-deficient mice under normal conditions [62], suggesting that CGRP is dispensable for normal peristalsis. This observation is supported by data in *Drosophila* where the *DH31*^{KG09001} mutant (as used in this study) is homozygote viable [31, 33]. Therefore, all these data strongly suggest that the main function of the controlled release of DH31/CGRP from EECs is to induce increased gut contractility under pathogenic conditions, in order to evict the source of the trouble. This increased gut contractility has two phases: the first phase depends on high amounts of DH31/CGRP to trigger visceral spasms, followed by accelerated peristalsis that requires lower amounts of DH31/CGRP. Our results pave the way for a functional study of the very first molecular stages of food poisoning in vertebrates.

Finally, medical diagnosis empirically links intestinal pain to visceral spasms upon food poisoning and/or diarrhea. Consequently, most of time medical professionals prescribe drugs that inhibit the visceral spasms, to treat both diarrhea and pain. However, this practice should perhaps be reconsidered since our work suggests that blocking visceral spasms probably slows down the elimination of the pathogens that are responsible for the discomfort. Therefore, our work sheds light on, and deciphers, a physiological mechanism that will be helpful to design novel drugs and adapt medical practices to treat the visceral pain and diarrhea associated with bacteria.

Materials and methods

Fly strains

We used the following stocks: WT canton S (Bloomington #64349); *w*; *DH31-Gal4* (Bloomington #46389; gift from Jae Young Kwon); *w*; *tub-Gal80^{ts}*; *TM2/TM6b* (Bloomington #7019); *w*; *myo1A-Gal4*; *tubGal80^{ts} UAS-GFP* (gift from Nicolas Tapon); *y v*; *tubGal80^{ts}*; *voilà-Gal4/TM6b* (gift from Marcos Vidal, [43]); *UAS-dicer2*, *w*; *tub-Gal80^{ts}*; *mef2-Gal4* (Bloomington #25756); *y v*; *UAS-DUOX^{RNAi}* (Bloomington #38907 corresponding to the data presented in this article); *y v*; *UAS-DH31^{RNAi}/TM3* (Bloomington #41957); *y v*; *UAS-DH31-R^{RNAi}* (Bloomington #259257); *w*; *TrpA1¹* (Bloomington #26504); *y*; *DH31^{KG09001}* (Bloomington #16474); *UAS-DH31* and *UAS-t-DH31* lines were gift from Fukima Hamada and were created by Paul Taghert and Mike Nitabach respectively [46, 66]; *w*; *20XUAS-GCaMP6s* (Bloomington #42746, gift from N. Arquier and L. Kurz); *w*; *UAS-reggie-1* was obtained from Konrad Basler [44].

Bacterial strains

The *Btk* strain (identified under the code 4D22) was provided by the Bacillus Genetic Stock Center (www.gbasc.org) and described by [67]. *Ecc15* was provided by Bruno Lemaitre's laboratory (Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne, Switzerland). *L. plantarum* was kindly provided by Bernard Charroux (IDBM, Marseille, France). *Btk* and *Ecc15* were grown as described in Loudhaief et al. (2017). To concentrate bacteria and reach the requested OD at 600 nm, 300 mL overnight cultures were centrifuged for 10 min at 2500 rcf. The pellet of centrifuged bacteria was diluted in 5% sucrose in water to reach the desired concentrations.

Drosophila rearing and intoxication

Drosophila were reared on standard medium at 25°C. For the Gal80^{ts} experiments, F1 flies were reared at 18°C and then shifted to 29°C to alleviate Gal80^{ts} repression on Gal4. For oral

intoxication, after 2 h of starvation, 5- to 7-day-old females (at 25°C) were flipped onto fly medium covered with filter disks soaked in a mix of bacteria and 0.5% bromophenol blue for 30 min only. Concentrations of bacteria used: 1.10^4 CFU/5 cm²/fly, 1.10^6 CFU/5 cm²/fly and 1.10^8 CFU/5 cm²/fly.

RNAi experiments

For RNAi experiments newly hatched F1 females were reared at 18°C until they reached 10 days old. Then *myo1A^{ts}>DUOX^{RNAi}* females were shifted to 29° for 4 days before bacterial feeding, *viola^{ts}>DH31^{RNAi}* females were shifted to 29° for 4 days before bacterial feeding and *mef2^{ts}>DH31-R^{RNAi}* females were shifted to 29° for 7 days before bacterial feeding.

Overexpression experiments

DH31^{ts}>DH31, *DH31^{ts}>reggie*, *viola^{ts}>reggie* and *mef2^{ts}>t-DH31* F1 females were reared at 18°C and 10 day-old F1 females were shifted to 29° C for 24 h or 48 h before dissection. The *UAS-DH31* #9 and #18 were used. The data presented are those from line #9. The *UAS-t-DH31* #P2-B4 and #P2-B5 were used and the data presented are those from line #P2-B5.

Colony-forming unit (CFU) counting

Flies of different genotypes fed with *Btk*, *L. plantarum* or *Ecc15* were washed in 70% ethanol and PBS before dissection of guts in PBS. Guts were crushed in 200 µL of LB or MRS medium at various times after intoxication using a micropestle, and the homogenate was serially diluted in LB or MRS medium and incubated overnight at 30°C (*Btk*) or 37°C (*L.plantarum*) on LB (*Btk* and *Ecc15*) or MRS (*L. plantarum*) agar plates. Colony counting were performed the day after.

Loperamide, DTT and CGRP feeding

Loperamide (Sigma #L4762) was resuspended in distilled water and then diluted extemporaneously in 5% sucrose. We tested two different doses: 40 µg/ml and 0.4 µg/ml. We noticed that at 40 µg/ml, food intake was reduced. Therefore, we used the lower dose (0.4 µg/ml) that did not impair food intake. For intoxication, loperamide were added to the bacterial mixture in 5% sucrose. DTT was resuspended in distilled water. We used a dose of 10 mM in 5% sucrose. After 30 min of feeding with the mixture containing bacteria and DTT, flies were flipped onto media still containing 10 mM DTT, to allow a continuous neutralization of ROS. CGRP (Sigma #C0167) was resuspended in distilled water. 3 doses were tested: 400 µg/ml, 40 µg/ml and 0.4 µg/ml. We did not observe any effect with the lower dose. The two other doses (400 µg/ml and 40 µg/ml) displayed similar results. After 2 h of starvation, flies were continuously fed with 40 µg/ml of CGRP mixed in 5% sucrose. Dissections were performed 1.5h post-ingestion. Co-feeding with DTT and CGRP: Flies were first fed for 30 min with a mixture of 5% sucrose containing 10^8 CFU of *Btk*, 10 mM DTT and 40 µg/ml of CGRP. After 30min, flies were flipped onto media still containing 10 mM DTT and 40 µg/ml of CGRP in 5% sucrose but without *Btk*.

Measurement of gut length

Guts were dissected and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 min and immediately mounted in 80% glycerol/PBS. Guts were observed with a numeric Keyence VHX 2000 microscope. Images were analyzed using the VHX-2000 software. The intestine length is shown as a percentage relative to the control (at 100%).

HOCl staining with R19-S

R19-S was purchased from Futurechem (FC-8001, Seoul, South Korea). For microscope scanning of the R19-S fluorescence signal, 50 μ M of R19-S was added to the 5% sucrose solution (with or without bacteria) deposited on the filter disk. Flies were allowed to feed for 30 min on the mix (5% sucrose + bacteria + R19-S). Then flies were transferred to a new vial with a filter disk only soaked with R19-S in 5% sucrose. Flies were then dissected at the desired time points. The guts were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 50 min. Guts were mounted in 80% Glycerol/PBS and immediately observed on a Zeiss Axioplan Z1 with Apotome 2 microscope.

Dissection, immunostaining and image capture

Dissection, fixation and immunostaining were performed as described by [68]. The following antibodies were used: mouse anti-Prospero (MR1A-c, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)) at 1:200; mouse anti-Arm (N2 7A1-s, DSHB) at 1:50; rabbit anti-Caspase3 (Cell Signaling, #9661) at 1:300; rabbit anti-DH31 (gift from Jan Veenstra [40]) and Michael Nitsch [31]) at 1:500. The secondary antibodies used were anti-mouse Alexa647, anti-rabbit Alexa488, anti-rabbit Alexa546 (Invitrogen). All secondary antibodies were used at 1:1000. Phalloidin-Alexa555 (Molecular Probes, A34055) were used at 1:500 2h at room temperature or 1:2000 overnight at 4°C. Guts were mounted in Fluoroshield-DAPI medium (Sigma) and observed with a Zeiss Axioplan Z1 with Apotome 2 microscope. Pictures in Fig 4M and 4N were acquired using a Zeiss LSM 880 confocal equipped with a Fast AiryScan. Images were analyzed using ZEN (Zeiss) and Photoshop software. Image acquisition was performed at the Microscopy platform of the Institut Sophia Agrobiotech (INRA 1355-UNS-CNRS 7254-Sophia Antipolis).

Measurement of muscle fiber thickness

After dissection of the midgut, Phalloidin labelling and image capture, three independent longitudinal fibers were measured per intestine using Zen software. Fibers were chosen in the posterior midgut and in a domain displaying contractions.

Calcium release analysis

20XUAS-GCaMP6s/*tub-Gal80^{ts}*, *Dh31-Gal4/+* (GCaMP6s) F1 females were reared at 18°C for 10 days after hatching. Then GCaMP6s females were shifted to 29°C for 5 days before oral intoxication. After 2h of starvation GCaMP6s females were flipped onto fly medium covered with filter disks soaked in sucrose 5% + *Btk* at 1.10^8 CFU/5 cm²/fly. Control flies were deposited on a filter disk soaked in 5% sucrose. No bromophenol blue was added to avoid fluorescence attenuation. Flies were left in contact with the filter disks for 30 min, with the exception of the 15 min time point. Midguts were then quickly dissected in PBS 1X and fixed in 4% formaldehyde/PBS for 5 min (not more because a longer time of fixation induces GCaMP6s fading). The guts were rapidly mounted in 50% glycerol/PBS and immediately observed with a Zeiss Axioplan Z1 with Apotome 2. The R2b and the R4c regions were examined for green fluorescence emission.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from 10 midguts of *D. melanogaster* strains using TRIzol Reagent (Invitrogen Co., USA) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized from total RNA (500 ng) using the qScriptTM cDNA SuperMix Kit (Quanta BioSciences, Inc., USA) following the manufacturer's instructions. Quantitative real time PCR

was performed using specific primers for *DH31* (*DH31*forward *tctctcttctgcctcttg*, *DH31*reverse *gcacctctccagttcgtt*) and *DH31-R* (*DH31-R*forward *gatggctggcttctgttg*, *DH31-R*reverse *cgagaccgattcctgt*) genes. The amplification efficiency of each gene was estimated by using the equation $E = 10^{-1/\text{slope}}$, where the slope was derived from the plot of amplification critical time (Ct value) versus serially diluted template cDNA. The PCR master mix (20 μ l) contained cDNA (5 μ l) that had been diluted 10 fold, 5x HOT Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Euromedex, France) (5 μ l) and each gene specific primer (3.6 mM). The amplification conditions were 15 min at 95°C to activate the polymerase and denature the sample followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 20 sec and 72°C for 20 sec. Quantitative PCR was performed using a continuous fluorescence detector, Aria Mx Real Time PCR system (Agilent Technologies, USA). After each quantitative PCR reaction, a melting curve was performed in order to verify that the amplicon was at the correct T_m and therefore confirming the correct length of the predicted transcript. Results were normalized to the mRNA level of two housekeeping genes, RP49 ribosomal protein *L32* gene (GenBank accession nos. NM_079843: RP49forward *cgaccaagcactcatc*, RP49reverse *cactctgtgtcgcatacccttg*), *dp1* dodeca-satellite binding protein 1 gene (GenBank accession nos. NM_079057: *dp1*forward *acgggcagaattgagaagt*, *dp1*reverse *ggtagtgagggtcgaag*), and calculated according to the delta-delta Ct method [69]. Each experiment was repeated with three independent mRNA samples (biological replicates) and each reaction was repeated three times to minimize intra-experiment variation (technical replicates).

Frozen sections

The protocol is described in Loudhaief et al. (2017)[22].

DH31-positive EEC counting

EECs were double labelled with Pros and DH31. Counting was performed in the R2b region (<http://flygut.epfl.ch/histology>). As the surface of the R2b region differs from one gut to another, we normalized the counts relative to a defined surface (e.g. 30 000 μm^2).

Statistical analysis

For gut length, muscle fiber thickness and DH31-positive cell counting, statistical analysis were performed using a parametric T test (for pairwise comparison) or parametric Tukey Test (for multiple pairwise comparison) using Kypplot. For CFU counting analyses, we used the non-parametric pairwise comparisons of the Wilcoxon-Mann-Whitney test. *** ($P < 0.001$); ** ($P < 0.01$), * ($P < 0.05$). For calcium release analysis, the p value ($p = 0.0003625$) was calculated with the Exact Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test for two independent samples (control and *Btk*-treated, stratified by time) performed with the R software.

Supporting information

S1 Fig. *Ecc15* induces similar physiological responses as *Btk*. (A) Measure of midgut length upon intoxication by 108 CFU of *Ecc15*. The length is expressed in function of the control (Ctrl, 100%). Flies were fed for 30min and the measures were taken 1h30 after the beginning of feeding. We chose 1h30 because this correspond to the middle of the meantime of spasms. (B) Visceral muscle fibers were labelled by Phalloidin 1h30 after feeding with 5% sucrose (Ctrl) or *Ecc15* (108 CFU/fly were provided). The posterior midgut are shown here. (C) Monitoring of *Ecc15* persistence in the midgut of flies provided with 104 CFU of *Ecc15* and complemented (blue bars) or not (grey bars) with loperamide. Note that the loperamide increased the persistence of *Ecc15* (4h instead of 2h in absence of loperamide). For CFU estimation in the midgut,

we chose to provide only 104 CFU of *Ecc15* to flies because we noticed that providing higher amounts of *Ecc15* increased the variability of the number of CFU recovered in the gut at any time. We attributed this variability to the food repellent impact that increasing doses of *Ecc15* have on *Drosophila* feeding ([70]). (D) R2b anterior midgut region of WT flies fed either with sucrose (left panels) or with 108 CFU of *Ecc15* (right panels). Midguts were dissected and fixed 30min and 1h PI as indicated on the pictures. (E) Counting of DH31-positive EECs in the anterior R2b domain in conditions described in (D). Control experiments were pooled together. (TIF)

S2 Fig. Ingestion of opportunistic bacteria rapidly induces huge visceral muscle spasms.

(A) Monitoring of *L. plantarum* persistence in the midgut of flies fed with 108 CFU of *L. plantarum*. Flies were left in contact with *L. plantarum* for only 30min. Unlike *Btk* and *Ecc15*, *L. plantarum* persists at least 24h in the midgut. (B) Measure of midgut length upon continuous intoxication by 108 CFU of *Btk* (light grey bars) compared to the length of unchallenged control midguts (dark grey bars). (C) Phalloidin labelling of visceral muscle fibers of midguts from control unchallenged flies or from flies continuously fed with 108 CFU of *Btk*. (D and E) Measure of lumen (D) and midgut (E) widths 2h after intoxication by 108 CFU of *Btk*. The widths are expressed in function to the control (Ctrl, 100%). Flies were fed for 30min and the measures were taken 2h after the beginning of feeding. (TIF)

S3 Fig. Ingestion of opportunistic bacteria induces changes in epithelial cell shape.

(A) Transversal cross-section of 3 independent posterior midguts 2h post ingestion of 5% sucrose (Ctrl) or *Btk*. DAPI labels the nuclei (Blue), Arm marks the basolateral compartment (Red) and Dlg::GFP marks the apical compartment. Objective is 40X. Note the elongated shapes of enterocytes in *Btk*-fed conditions. (B) Reconstructed image of midguts (10X objective) labelled with Phalloidin. 2h after ingestion of *Btk* some longitudinal muscle fibers are contracted. These contractions are scattered all along the midgut (white arrowheads in right panel). Note also that the midgut is bent in the zones of strong visceral contractions (red arrows). (TIF)

S4 Fig. HOCl signaling is required to promote visceral contractions.

(A and B) Labelling of HOCl in anterior midgut by the R19S fluorescent probe (Orange) 1h after ingestion of sucrose 5% (Ctrl) or *Btk* (108 CFU were provided). *Btk* ingestion induces a production of ROS in the anterior part of the midgut (compared middle panels to left panels). Co-ingestion of DTT (A) or silencing *DUOX* expression in enterocytes (*myo1Ats>DUOXRNAI*) (B) neutralizes the production of ROS normally induced by *Btk* (right panels). Graphs on the right represent the proportion of R19S-positive midguts (orange). (C) Petri dishes plated with midgut lysates coming from flies co-fed with *Btk* (108 CFU) and DTT (left panel) or loperamide (middle and right panels). Note that the production ROS (loperamide condition) impairs bacterial growth as illustrated by the presence of small *Btk* colonies (red arrows). (TIF)

S5 Fig. Posterior DH31 accumulation is not affected by the ingestion of *Btk*.

(A-F) Immunolabelling against DH31 (green) and Pros (red). DAPI (blue) marks the nuclei. (A and B) Posterior midguts of WT flies 1h post ingestion of sucrose (A) or 108 CFU of *Btk* (B). (C and D) Posterior midguts of *TrpA1* homozygote flies 1h post ingestion of sucrose (C) or 108 CFU of *Btk* (D). (E and F) Anterior midguts of WT flies 1h post ingestion of loperamide (E) or 108 CFU of *Btk* in presence of loperamide (F). (TIF)

S6 Fig. DH31 peptide is sufficient to promote visceral contractions. (A-D') Anti-Pros (turquoise) and anti-DH31 (red) immunostaining in *DH31ts>GFP* (A-B) or *DH31ts>DH31* (C-D) midguts. Nuclei are marked with DAPI (blue). 40X objective. (A-A') R2b region in the anterior midgut. Note that in some GFP-expressing EECs, DH31 is below the threshold of detection (green arrow). There are also few EECs where DH31 is detectable without being marked by the GFP (red arrow) suggesting that the *DH31-Gal4* driver (Bloomington stock #46389) does not perfectly recapitulate endogenous DH31 expression in the anterior midgut. (B-B') R4 region in the posterior midgut. GFP expression perfectly overlaps DH31-positive EECs. (C-C') Notable DH31 overexpression in the R2b region relative to the level of endogenous expression (compare C' to A'). (D-D') Overexpression of DH31 in the R4 region compared with (B-B'). (TIF)

S7 Fig. DH31 peptide is required to promote visceral contractions. (A) Ca²⁺ release imaging (GFP) in *DH31Gal4ts>GCaMP6s* midguts. R2b and R4c regions were captured 15 min. and 1h post ingestion of *Btk*. Ctrl corresponds to flies fed with sucrose. (B) RT-qPCR on *voilats>DH31RNAi* or *mef2ts>DH31-RRNAi* whole midguts compared to RT-qPCR on their RNAi bearing parents. Normalized expression of *DH31* (left) and *DH31-R* (right) are shown. (C) DH31 (green) and Pros (red) double immuno-labelling in WT (left) or *voilats>DH31RNAi* (right) posterior midgut. After 4 days of silencing, DH31 peptide is barely detectable in posterior EECs. Blue (DAPI) marks the nuclei. 40X objective. (D) CFU counting in the midgut of control (grey bars) or *voilats>DH31RNAi* flies (blue bars) fed with 108 CFU of *Btk*. (E) Measure of midgut length 2h post-intoxication of *voilats>DH31RNAi* flies fed or not with 108 CFU of *Btk* and compared to midgut length of control flies fed with 5% sucrose. (F) Phalloidin staining of posterior midgut of *voilats>DH31RNAi* flies 2h after feeding with 5% sucrose (left) or 108 CFU of *Btk* (right). 20X objective. (TIF)

S8 Fig. Sequence alignments between DH31-R and human CALRL. (A) The DH31-R isoform A amino acids sequence was aligned with human CALCRL amino acids sequence using needle program (<http://emboss.toulouse.inra.fr/>) with the following parameters: Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 15.0; Extend penalty: 0.5. The two coding sequences present 34.5% of identity and 48.4% of similarity. (B) Alignment of the three DH31-R isoforms with human CALCRL (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). In red are shown the conserved amino acids. (TIF)

Acknowledgments

We are grateful to Fukima Hamada, Mike Nitabach, Paul Taghert, Jan Veenstra, Marcos Vidal, Jae Young Kwon, Leo Kurz and Nathalie Arquier for kindly providing flies and antibodies. We also thank Mourad Kacher for his contribution to the paper. Thank you to Raphaël Rousset for his corrections and suggestions on the manuscript, and his help in statistical analyses. We also thank all the members of our team for discussions. We thank the Microscopy Platform of the Institut Sophia Agrobiotech (INRA 1355- UNS—CNRS 7254, Sophia Antipolis) for access to instruments and Olivier Pierre for his help with the AiryScan. We also have a thought for Isabelle Jacovella, RIP.

Author Contributions

Conceptualization: Olivia Benguettat, Rouba Jneid, Julie Soltys, Rihab Loudhaief, Armel Gallet.

Formal analysis: Olivia Benguettat, Julie Soltys, Alexandra Brun-Barale, Armel Gallet.

Funding acquisition: Dani Osman, Armel Gallet.

Investigation: Olivia Benguettat, Rouba Jneid, Rihab Loudhaief, Alexandra Brun-Barale, Armel Gallet.

Methodology: Olivia Benguettat, Rouba Jneid, Julie Soltys, Alexandra Brun-Barale.

Project administration: Armel Gallet.

Resources: Olivia Benguettat, Alexandra Brun-Barale.

Supervision: Armel Gallet.

Validation: Rihab Loudhaief, Armel Gallet.

Visualization: Armel Gallet.

Writing – original draft: Armel Gallet.

Writing – review & editing: Dani Osman, Armel Gallet.

References

- Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(3):141–53. <https://doi.org/10.1038/nri3608> PMID: 24566914
- Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schutte A, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*. 2014; 260(1):8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182> PMID: 24942678
- Shibata T, Maki K, Hadano J, Fujikawa T, Kitazaki K, Koshiba T, et al. Crosslinking of a Peritrophic Matrix Protein Protects Gut Epithelia from Bacterial Exotoxins. *PLoS Pathog*. 2015; 11(10):e1005244. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005244> eCollection 2015 Oct. PMID: 26506243
- Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, Buchon N, Lemaitre B. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(38):15966–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105994108> Epub 2011 Sep 6. PMID: 21896728
- Kim SH, Lee WJ. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Front Infect Microbiol*. 2014; 3:116.
- Kim JM. Antimicrobial proteins in intestine and inflammatory bowel diseases. *Intest*. 2014; 12(1):20–33. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.1.20> Epub Jan 28. PMID: 25349560
- Capo F, Charroux B, Royet J. Bacteria sensing mechanisms in *Drosophila* gut: Local and systemic consequences. *Dev Comp Immunol*. 2016; 64:11–21. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.001> Epub Jan 8. PMID: 26778296
- Sun G, Irvine KD. Control of growth during regeneration. *Curr Top Dev Biol*. 2014; 108:95–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00003-6> PMID: 24512707
- Alizadeh H, Castro GA, Weems WA. Intrinsic jejunal propulsion in the guinea pig during parasitism with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*. 1987; 93(4):784–90. PMID: 3623022
- Grossi L, McHugh K, Collins SM. On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. *Gastroenterology*. 1993; 104(4):1049–56. PMID: 8462793
- Khan WI, Vallance BA, Blennerhassett PA, Deng Y, Verdu EF, Matthaei KI, et al. Critical role for signal transducer and activator of transcription factor 6 in mediating intestinal muscle hypercontractility and worm expulsion in *Trichinella spiralis*-infected mice. *Infect Immun*. 2001; 69(2):838–44. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.838-844.2001> PMID: 11159976
- Zhao A, McDermott J, Urban JF Jr., Gause W, Madden KB, Yeung KA, et al. Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol*. 2003; 171(2):948–54. PMID: 12847266
- Lee KA, Kim SH, Kim EK, Ha EM, You H, Kim B, et al. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*. 2013; 153(4):797–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009> PMID: 23663779

14. Du EJ, Ahn TJ, Kwon I, Lee JH, Park JH, Park SH, et al. TrpA1 Regulates Defecation of Food-Borne Pathogens under the Control of the Duox Pathway. *PLoS Genet.* 2016; 12(1):e1005773. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005773> eCollection 2016 Jan. PMID: [26726767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26726767/)
15. Lee KA, Kim B, Bhin J, Kim do H, You H, Kim EK, et al. Bacterial Uracil Modulates Drosophila DUOX-Dependent Gut Immunity via Hedgehog-Induced Signaling Endosomes. *Cell Host Microbe.* 2015; 17(2):191–204. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.012> Epub 5 Jan 29. PMID: [25639794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25639794/)
16. Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, et al. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. *Nat Immunol.* 2009; 10(9):949–57. <https://doi.org/10.1038/ni.1765> Epub 2009 Aug 9. PMID: [19668222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19668222/)
17. Ha EM, Oh CT, Ryu JH, Bae YS, Kang SW, Jang IH, et al. An antioxidant system required for host protection against gut infection in Drosophila. *Dev Cell.* 2005; 8(1):125–32. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.11.007> PMID: [15621536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15621536/)
18. Buchon N, Broderick NA, Chakrabarti S, Lemaitre B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in Drosophila. *Genes Dev.* 2009; 23(19):2333–44. <https://doi.org/10.1101/gad.1827009> PMID: [19797770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19797770/)
19. Lapointe TK, Altier C. The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain. *Channels.* 2011; 5(6):525–9. <https://doi.org/10.4161/chan.5.6.18016> Epub 2011 Nov 1. PMID: [21993194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21993194/)
20. Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium.* 2016; 60(2):115–22. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.009> Epub Mar 4. PMID: [26969190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26969190/)
21. Coast GM, Webster SG, Schegg KM, Tobe SS, Schooley DA. The Drosophila melanogaster homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. *J Exp Biol.* 2001; 204(Pt 10):1795–804. PMID: [11316500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11316500/)
22. Loudhaief R, Brun-Barale A, Benguetat O, Nawrot-Esposito MP, Pauron D, Amichot M, et al. Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the Drosophila midgut. *Development.* 2017; 144(5):808–19. <https://doi.org/10.1242/dev.142539> PMID: [28246211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246211/)
23. Buchon N, Broderick NA, Kuraishi T, Lemaitre B. Drosophila EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.* 2010; 8:152. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-152> PMID: [21176204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21176204/)
24. Kunze WA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61:117–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.117> PMID: [10099684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10099684/)
25. Lentle RG, de Loubens C. A review of mixing and propulsion of chyme in the small intestine: fresh insights from new methods. *J Comp Physiol B.* 2015; 185(4):369–87. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0889-5> Epub 2015 Feb 4. PMID: [25648621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25648621/)
26. Chen X, Lee KA, Ha EM, Lee KM, Seo YY, Choi HK, et al. A specific and sensitive method for detection of hypochlorous acid for the imaging of microbe-induced HOCl production. *Chem Commun (Camb).* 2011; 47(15):4373–5. <https://doi.org/10.1039/c1cc10589b> Epub 2011 Mar 14. PMID: [21399827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21399827/)
27. Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for dual oxidase in Drosophila gut immunity. *Science.* 2005; 310(5749):847–50. <https://doi.org/10.1126/science.1117311> PMID: [16272120](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16272120/)
28. McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila. *Science.* 2003; 302(5651):1765–8. <https://doi.org/10.1126/science.1089035> PMID: [14657498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14657498/)
29. Kwon Y, Shim HS, Wang X, Montell C. Control of the thermotactic behavior via coupling of a TRP channel to a phospholipase C signaling cascade. *Nat Neurosci.* 2008; 11(8):871–3. <https://doi.org/10.1038/nn.2170> PMID: [18660806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18660806/)
30. Mace OJ, Tehan B, Marshall F. Pharmacology and physiology of gastrointestinal enteroendocrine cells. *Pharmacol Res Perspect.* 2015; 3(4):e00155. <https://doi.org/10.1002/prp2.155> Epub 2015 Jul 7. PMID: [26213627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26213627/)
31. Kunst M, Hughes ME, Raccuglia D, Felix M, Li M, Barnett G, et al. Calcitonin gene-related peptide neurons mediate sleep-specific circadian output in Drosophila. *Curr Biol.* 2014; 24(22):2652–64. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.077> PMID: [25455031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25455031/); PubMed Central PMCID: [PMC4255360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4255360/).
32. Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P. The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol.* 2014; 171(10):2552–67. <https://doi.org/10.1111/bph.12512> PMID: [24206166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24206166/)
33. LaJeunesse DR, Johnson B, Presnell JS, Catignas KK, Zapotoczny G. Peristalsis in the junction region of the Drosophila larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. *BMC Physiol.* 2010; 10:14. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-14> PMID: [20698983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20698983/)
34. Vanderveken M, O'Donnell MJ. Effects of diuretic hormone 31, drosokinin, and allatostatin A on transepithelial K(+) transport and contraction frequency in the midgut and hindgut of larval Drosophila

- melanogaster. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2014; 85(2):76–93. <https://doi.org/10.1002/arch.21144> Epub 2014 Jan 9. PMID: [24408875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24408875/)
35. Chen J, Kim SM, Kwon JY. A Systematic Analysis of *Drosophila* Regulatory Peptide Expression in Enteroendocrine Cells. 2016: <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0014> PMID: [27025390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27025390/)
 36. Beehler-Evans R, Micchelli CA. Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development.* 2015; 142(4):654–64. <https://doi.org/10.1242/dev.114959> PMID: [25670792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25670792/)
 37. Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, et al. A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *J Exp Biol.* 2005; 208(Pt 7):1239–46. <https://doi.org/10.1242/jeb.01529> PMID: [15781884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15781884/)
 38. Dutta D, Dobson AJ, Houtz PL, Glasser C, Revah J, Korzelius J, et al. Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult *Drosophila* Midgut. *Cell Rep.* 2015; 12(2):346–58. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.009> Epub Jul 2. PMID: [26146076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26146076/)
 39. Buchon N, Osman D, David FP, Fang HY, Boquete JP, Deplancke B, et al. Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2013; 3(5):1725–38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.001> Epub May 2. PMID: [23643535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23643535/)
 40. Park D, Veenstra JA, Park JH, Taghert PH. Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PLoS One.* 2008; 3(3):e1896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001896> PMID: [18365028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18365028/)
 41. de Juan-Sanz J, Holt GT, Schreiter ER, de Juan F, Kim DS, Ryan TA. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron.* 2017; 93(4):867–81.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.010> Epub Feb 2. PMID: [28162809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28162809/)
 42. Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.* 2013; 499(7458):295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354> PMID: [23868258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23868258/)
 43. Scopelliti A, Cordero JB, Diao F, Strathdee K, White BH, Sansom OJ, et al. Local control of intestinal stem cell homeostasis by enteroendocrine cells in the adult *Drosophila* midgut. *Curr Biol.* 2014; 24(11):1199–211. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.007> Epub May 8. PMID: [24814146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24814146/)
 44. Katanaev VL, Solis GP, Hausmann G, Buestorf S, Katanayeva N, Schrock Y, et al. Reggie-1/flotillin-2 promotes secretion of the long-range signalling forms of Wingless and Hedgehog in *Drosophila*. *EMBO J.* 2008; 27(3):509–21. Epub 2008 Jan 24. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601981> PMID: [18219274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18219274/)
 45. Park JH, Chen J, Jang S, Ahn TJ, Kang K, Choi MS, et al. A subset of enteroendocrine cells is activated by amino acids in the *Drosophila* midgut. *FEBS Lett.* 2016; 590(4):493–500. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12073> Epub 2016 Feb 7. PMID: [26801353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26801353/)
 46. Choi C, Fortin JP, McCarthy E, Oksman L, Kopin AS, Nitabach MN. Cellular dissection of circadian peptide signals with genetically encoded membrane-tethered ligands. *Curr Biol.* 2009; 19(14):1167–75. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.029> Epub Jul 9. PMID: [19592252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19592252/)
 47. Chang CP, Pearse RV 2nd, O'Connell S, Rosenfeld MG. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron.* 1993; 11(6):1187–95. PMID: [8274282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8274282/)
 48. Fluhmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer JA, Born W. A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 206(1):341–7. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1047> PMID: [7818539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7818539/)
 49. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014; 94(4):1099–142. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2013> PMID: [25287861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25287861/)
 50. Mason BN, Kaiser EA, Kuburas A, Loomis MM, Latham JA, Garcia-Martinez LF, et al. Induction of Migraine-Like Photophobic Behavior in Mice by Both Peripheral and Central CGRP Mechanisms. *J Neurosci.* 2017; 37(1):204–16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2967-16.2016> PMID: [28053042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053042/)
 51. Beebe K, Park D, Taghert PH, Micchelli CA. The *Drosophila* Prosecretory Transcription Factor dimmed Is Dynamically Regulated in Adult Enteroendocrine Cells and Protects Against Gram-Negative Infection. *G3 (Bethesda).* 2015; 5(7):1517–24.
 52. Worthington JJ, Reimann F, Gribble FM. Enteroendocrine cells—sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2017; 30(10):73.
 53. Jardin I, Lopez JJ, Diez R, Sanchez-Collado J, Cantonero C, Albarran L, et al. TRPs in Pain Sensation. *Front Physiol.* 2017; 8:392. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00392> eCollection 2017. PMID: [28649203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28649203/)
 54. Lemaitre B, Miguel-Aliaga I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet.* 2013; 47:377–404. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133343> PMID: [24016187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24016187/)
 55. Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, Bravo DM, Callaghan B. The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10(12):729–40. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180> Epub Sep 24. PMID: [24061204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24061204/)

56. Bortoff A, Davis RS. Myogenic transmission of antral slow waves across the gastroduodenal junction in situ. *Am J Physiol.* 1968; 215(4):889–97. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1968.215.4.889> PMID: [4300166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4300166/)
57. Khan WI, Collins SM. Gut motor function: immunological control in enteric infection and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(3):389–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02979.x> PMID: [16487236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16487236/)
58. Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *Am J Physiol.* 1997; 272(2 Pt 1):G321–7.
59. Blennerhassett MG, Vignjevic P, Vermillion DL, Collins SM. Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. *Am J Physiol.* 1992; 262(6 Pt 1):G1041–6.
60. Kaiser EA, Rea BJ, Kuburas A, Kovacevich BR, Garcia-Martinez LF, Recober A, et al. Anti-CGRP antibodies block CGRP-induced diarrhea in mice. *Neuropeptides.* 2017; 64:95–99. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.11.004> Epub Nov 14. PMID: [27865545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27865545/)
61. Shahbazi F, Karila P, Olsson C, Holmgren S, Conlon JM, Jensen J. Primary structure, distribution, and effects on motility of CGRP in the intestine of the cod *Gadus morhua*. *Am J Physiol.* 1998; 275(1 Pt 2):R19–28.
62. Yoshikawa R, Mikami N, Otani I, Kishimoto T, Nishioka S, Hashimoto N, et al. Suppression of ovalbumin-induced allergic diarrhea by diminished intestinal peristalsis in RAMP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 410(3):389–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.141> Epub Jun 12. PMID: [21683059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21683059/)
63. Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L. Calcitonin gene-related peptide: brain and spinal action on intestinal motility. *Peptides.* 1985; 6(6):1167–71. PMID: [3879635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3879635/)
64. Plourde V, St-Pierre S, Quirion R. Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am J Physiol.* 1997; 273(1 Pt 1):G191–6.
65. Sun YD, Benishin CG. Effects of calcitonin gene-related peptide on longitudinal muscle and myenteric plexus of guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259(3):947–52. PMID: [1762087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1762087/)
66. Goda T, Tang X, Umezaki Y, Chu ML, Kunst M, Nitabach MN, et al. Drosophila DH31 Neuropeptide and PDF Receptor Regulate Night-Onset Temperature Preference. *J Neurosci.* 2016; 36(46):11739–54. Epub 2016/11/18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0964-16.2016> PMID: [27852781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27852781/); PubMed Central PMCID: [PMC5125228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5125228/).
67. Gonzalez JM Jr., Brown BJ, Carlton BC. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(22):6951–5. PMID: [6294667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6294667/)
68. Micchelli CA. Whole-mount immunostaining of the adult *Drosophila* gastrointestinal tract. *Methods.* 2014; 68(1):273–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.022> Epub Mar 27. PMID: [24680702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24680702/)
69. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res.* 2001; 29:2002–7.
70. Keita S, Masuzzo A, Royet J, Kurz CL. *Drosophila* larvae food intake cessation following exposure to *Erwinia* contaminated media requires odor perception, *Trpa1* channel and *evf* virulence factor. *J Insect Physiol.* 2017; 99:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.02.004> Epub Feb 21. PMID: [28232220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28232220/)

Chapitre 2 : Impact des bioinsecticides *Btk* sur l'homéostasie cellulaire intestinale

2.1 Résumé

De nombreuses incitations institutionnelles promeuvent l'utilisation des bioinsecticides comme alternative aux pesticides chimiques, parmi lesquels les bioinsecticides à base de spores et de toxines cristallines (Cry) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) sont largement utilisés en agriculture biologique et en agriculture conventionnelle (Fiuza & Crickmore.,2017). *Btk* est la souche la plus utilisée dans le domaine de la lutte contre les larves de lépidoptères ravageuses des cultures. Il faut donc considérer que les toxines *Btk* vont être de plus en plus présentes dans notre alimentation (par le biais des aliments issus de l'agriculture ou d'OGM) et dans l'environnement. Ces modes de contamination peuvent affecter la physiologie de notre tube digestif qui est la première barrière contre les agresseurs ingérés avec la nourriture. Il est donc nécessaire de cerner au mieux les effets non intentionnels associés à l'utilisation des bioinsecticides *Btk* sur le long terme.

L'intestin est constamment soumis à de nombreuses attaques par le biais des aliments, des agents pathogènes (virus, bactéries, champignons), des toxines ou des produits chimiques comme les médicaments et les pesticides. Le remplacement rapide des cellules endommagées est la façon la plus efficace pour rétablir l'équilibre cellulaire et physiologique (homéostasie) de l'épithélium intestinal tout en limitant le risque de développement d'un cancer. Les cellules souches intestinales (ISC) sont nécessaires pour maintenir la composition cellulaire appropriée dans l'intestin adulte. Pour assurer le recrutement permanent de cellules nouvellement différenciées, les ISC subissent une division cellulaire asymétrique qui génère un ISC et une cellule progénitrice. Les cellules progénitrices vont elles-mêmes se différencier soit en entéroblastes (EB) qui deviennent à leur tour des entérocytes (EC), soit en cellules précurseurs (EEP) qui donneront les cellules entéroendocrines (EEC). Le taux de prolifération des ISC et les besoins du tissu à un moment donné sont fortement liés. Par exemple, leur prolifération est stimulée lors d'infections bactériennes ou d'agressions physiques afin de renouveler les EC abimés ou morts.

En partant du modèle de laboratoire *Drosophila melanogaster* (diptère non ciblée par *Btk* et dont les principaux processus morphogénétiques et physiologiques sont bien conservés chez les vertébrés), j'ai donc effectué une étude de l'impact potentiel des spores et des toxines de *Btk* ingérées avec la nourriture sur l'homéostasie des cellules intestinales. Je vous résume ci-dessous

les résultats obtenus au cours de ma thèse. Ces travaux ont été réalisés en utilisant le mélange spores de *Btk* et cristaux de toxines Cry (correspondant à la forme utilisée dans les produits bioinsecticides *Btk*) et en utilisant les cristaux purifiés (isolés) de toxines Cry. Toutes mes expérimentations ont été effectuées en utilisant la dose agricole de *Btk*, c'est-à-dire équivalente à la quantité de spores retrouvées sur les légumes après un unique traitement.

Mes résultats montrent une apoptose modérée des EC 24 heures après l'ingestion de bioinsecticides *Btk* par des drosophiles adultes. L'ingestion des cristaux purifiés de toxines Cry est suffisante pour induire la mort des EC. Cette mort cellulaire est associée à une diminution du nombre d'EC dans les premiers jours, suggérant que le processus de régénération cellulaire n'est pas assez efficace pour remplacer rapidement les cellules mourantes. Il est clairement établi que l'apoptose des EC induit la mise en route du processus de remplacement cellulaire via la production de cytokines qui stimule la prolifération cellulaire et la différenciation des progéniteurs afin de remplacer les cellules mourante (Vriz et al., 2014). J'ai donc estimé le taux de prolifération des ISC en utilisant un marqueur de mitose (un anticorps anti-Phospho-Histone 3). Comme attendu, le bioinsecticide *Btk* ou les cristaux purifiés induisent une forte prolifération des ISC. Je me suis ensuite attaché à suivre la variation du nombre des différents types de cellules progénitrices (ISC, EB, EEP) afin de comprendre ce déficit en EC suite à l'ingestion de bioinsecticides *Btk* ou de cristaux purifiés. Mes analyses montrent une augmentation significative du nombre des ISC (par division symétrique) et des EB suite au traitement par le bioinsecticide *Btk* ou les cristaux par rapport au contrôle. De manière plus surprenante, j'ai aussi constaté une forte augmentation (d'au moins 50%) du nombre d'EEP et d'EEC après ingestion de bioinsecticide *Btk* ou de cristaux purifiés. En effectuant un lignage cellulaire j'ai pu démontrer que ces EEP et ces EEC provenaient bien de la prolifération des ISC induite par l'ingestion des cristaux. J'ai aussi pu observer l'apparition timide de nouveaux EC mais leur nombre restant insuffisant pour assurer le remplacement de ceux mourants.

La souche *Btk* composant les produits commerciaux produit 5 toxines Cry différentes (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, et Cry2Ab) ciblant les larves de lépidoptères. J'ai ensuite voulu identifier quelle(s) toxine(s) parmi les toxines produites par *Btk* est/sont responsable(s) de l'augmentation du nombre des EEP/EEC. Pour cela, nous avons profité de la souche de *Btk* (4D4 ou *Btk*^{Cry1Ac}), qui produit uniquement des cristaux de toxines Cry1Ac. J'ai observé une augmentation significative du nombre des EEP et EEC suite à l'ingestion de spores de *Btk*^{Cry1Ac}, suggérant que la toxine Cry1Ac pouvait être responsable de cette augmentation. Comme attendu, l'ingestion de cristaux purifiés de Cry1Ac aboutissait à une augmentation du nombre

des EEP et EEC confirmant l'implication de cette toxine dans le phénotype observé. Les toxines de la famille Cry1A présentant 85% de similitudes, mes résultats suggèrent que les trois toxines, Cry1Aa, Cry1Ab et Cry1Ac produites par le bioinsecticide *Btk* puissent être responsables de l'augmentation du nombre d'EEP et d'EEC.

Nos résultats suggèrent que cet effet est associé à **une diminution de l'adhésion intercellulaire** entre les ISC et les progéniteurs car, par analyse de l'intensité des jonctions adhérentes entre ISC et progéniteur, nous avons observé que celles-ci étaient fortement diminuées en présence de bioinsecticides *Btk*. Il a été montré qu'une interaction prolongée entre ISC et progéniteur permet une forte activation de la voie de signalisation Notch dans le progéniteur (Pasco et al., 2015 ; Joly & Rousset., 2020) ce qui induit sa différenciation en EB puis en EC. Une interaction de courte durée, plus faible, entre ISC et progéniteur induit faiblement la voie Notch, poussant le progéniteur vers le destin EEP puis EEC. Notre hypothèse est que l'interaction ISC-progéniteur est réduite via une interférence des toxines Cry avec les cadhérines, modifiant le devenir cellulaire des progéniteurs. Cette hypothèse est appuyée (1) par le fait que les récepteurs principaux aux toxines Cry chez les organismes cibles (les larves de lépidoptères) sont des cadhérines (Adang & Crickmore, 2014) et (2) l'adhésion intercellulaire entre ISC et progéniteur est dépendante de la E-Cadhérine (Maeda et al., 2008; Zhai et al., 2017). Mais pour confirmer ces résultats, il est nécessaire de vérifier si les E-cadhérines de la drosophile sont affectés par les toxines Cry produites par le bioinsecticide *Btk*. Pour tester cette hypothèse j'ai augmenté le niveau de l'adhésion cellulaire entre ISC et progéniteur en sur-exprimant la Cadhérine-E dans ces cellules. Comme espéré, j'ai pu contrecarrer l'augmentation du nombre des EEP et EEC en compensant le déficit d'adhésion causé par les toxines de *Btk*.

Jusqu'à présent, je vous ai résumé l'étude des effets des toxines Cry sur le comportement des progéniteurs grâce à l'utilisation des cristaux, constitués de protoxines Cry (Mendoza-Almanza et al., 2020). Pour découvrir si l'entité cristal est responsable des effets détectés ou bien si ce sont les différentes toxines contenues dans le cristal qui en sont responsables après dissolution du cristal et libération des protoxines, j'ai tout d'abord suivi par Western Blot la possible apparition des formes activées des toxines de la famille Cry1A (nous ne possédons pas d'anticorps contre les Cry2A) dans l'intestin moyen de mouches nourries avec les bioinsecticides *Btk*. J'ai donc utilisé un anticorps "maison" anti-Cry1A dirigé contre la forme activée des toxines (Babin et al, 2020). Dans la préparation de bioinsecticide *Btk* (un mélange de spores et de cristaux dans l'eau) incubé indépendamment à 25°C sur la même durée d'expérience qu'avec les mouches, comme attendu, ce sont les protoxines de Cry1A à 130 kD qui sont détectées. Lorsque le bioinsecticide *Btk* est donné à manger aux drosophiles, puis leurs

intestins disséqués à différent post-ingestion, les Western-blot anti-Cry1A révèle l'apparition des formes activées à 67 kD dès 4h. Plus aucune protoxines ou toxines n'est détectées 6 jours post-ingestion. Nous avons ensuite observé que les protoxines étaient déjà activées dans la partie antérieure de l'intestin moyen (apparition des formes à 65 kD) mais n'étaient associées qu'à la membrane. Dans l'intestin moyen postérieur, nous avons détecté la forme à 45kD des toxines Cry1A entièrement activées. Cette forme était aussi associée aux membranes. De plus, la forme 67kD était également présente dans le cytoplasme suggérant une internalisation par les cellules épithéliales. Ainsi, nos données suggèrent que les cristaux contenant des protoxines Cry1A sont effectivement dissouts le long de l'intestin moyen pour générer des toxines Cry1A entièrement activées dans l'intestin moyen postérieur, région où l'on observe le phénotype d'augmentation du nombre d'EEC.

Le modèle qui se dégage de mes travaux est que les toxines Cry insecticides produites par la souche *Btk* utilisées dans le commerce perturbe l'homéostasie cellulaire intestinal de la drosophile, un organisme non cible, en interférant avec l'adhésion cellulaire entre cellules souches et progéniteurs. Ceci détourne une partie des progéniteurs de leur destin initial, former des nouveaux entérocytes pour remplacer ceux tués par les toxines Cry. Ainsi, des cellules entéroendocrines apparaissent en lieu et place des entérocytes.

En conclusion, nos travaux montrent que la souche bioinsecticide *Btk* (produisant cinq toxines Cry et vendue sous les appellations commerciales Dipel et Delfin) a des effets non intentionnels sur la mouche (espèce non cible) en affectant l'homéostasie cellulaire intestinale. Les mécanismes contrôlant l'homéostasie cellulaire intestinale étant fortement conservés dans le règne animal, on peut supposer qu'une utilisation accrue des spores de *Btk* comme bioinsecticides puissent affecter de nombreuses espèces non-cibles.

2.2 Article: Jneid et al. en préparation: *Btk* toxins divert intestinal cell lineage fate by diminishing stem cell/daughter progenitor cell-cell adhesion

Rouba Jneid^{1,3}, Rihab Loudhaief^{1,2}, Fatima Tleiss^{1,3}, Nathalie Zucchini-Pascal¹, Marie-Paule Nawrot-Esposito¹, Dani Osman³ and Armel Gallet^{1*}

¹ Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, France

² Current address: Department of Biology, Faculty of Science, University of Copenhagen, Copenhagen O, Denmark

³ Faculty of Sciences III and Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, LBA3B, EDST, Lebanese University, Tripoli, Lebanon

*Corresponding author: A. Gallet, ISA, UMR CNRS 7254/INRAE 1355/UCA, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France. gallet@unice.fr

Abstract

Microbes, toxins and chemicals such as pesticides are harmful agents that could attack the gastrointestinal tract epithelium throughout organismal life. This triggers a rapid renewing of damaged intestinal cells to sustain a functional barrier to limit the risk of developing pathologies. The repair process involves a transient proliferation of intestinal stem cells (ISCs) and the differentiation of their progeny into enterocytes to replace the damaged ones. Among pesticides, the broadly used bioinsecticides composed of spores and crystalline (Cry) toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* (*Btk*) are expected to supplant synthetic chemical pesticides to specifically fight lepidopteran pests. We have investigated here the effects of spores and toxins of *Btk* ingested along with the food on intestinal cellular homeostasis of the non-target dipteran *Drosophila melanogaster*. We showed that *Btk* Cry toxins induce enterocyte death and ISC proliferation. Surprisingly, a high proportion of ISC's daughter cells differentiate into enteroendocrine cells instead of their initial enterocyte destiny. This imbalanced intestinal cell composition is due to Cry toxins which weakened cell adhesion between the ISC mother cell and its immediate daughter progenitor leading the latter to adopt an enteroendocrine cell fate. Our results further showed that Cry1A family of toxins is implicated in this intestinal cell fate diversion, suggesting that *Btk* bioinsecticides induce non-negligible deleterious effects on gut physiology.

Introduction

The gut lining is undergoing constant damages caused by environmental aggressors (pesticides, drugs, virus, bacteria and toxins) ingested along with the food. The gut quickly responds to these aggressions by accelerating its epithelium renewal to replace damaged cells. Resident intestinal stem cells (ISCs) are the guarantors of this cell renewing. Upon division, ISCs give rise to new daughter progenitor cells that will commit to two different paths of differentiation. The enteroblasts (EBs) and enteroendocrine precursors (EEPs) are respectively the progenitors of enterocytes (ECs) and enteroendocrine cells (EECs). ECs are the main intestinal epithelial bricks constituting an efficient barrier against aggressors but unfortunately, they are their first victims. The damaged or dying ECs emit cytokines which stimulate the proliferation of ISCs. ISCs divide asymmetrically to give one ISC and an adjacent EB that will differentiate into an EC to replace the damaged one (Buchon et al., 2009). Two mechanisms underlying intestinal regeneration have been described. The first one is the "cell renewal" model which occurs under weak aggression conditions that does not induce EC apoptosis. In this case, ISC proliferation is low and the neo-EBs differentiate into ECs. However, this provokes a transient excess of ECs due to the absence of prior EC death. The cellular homeostasis is further reestablished by removing old ECs (Loudhaief et al., 2017). The second mechanisms, called "cell replenishment" or "regenerative cell death", occurs after a strong aggression inducing massive EC apoptosis. Thus, an acute ISC proliferation is followed by the differentiation of EBs into ECs to replace dying ones (Vriz et al., 2014; Loudhaief et al., 2017) without producing supernumerary ECs.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) bacteria are used worldwide as bioinsecticides to fight crop pests. *Bt* are spread in organic farming but also in conventional agriculture (Fiuza et al., 2017). *Bt* is a Gram-positive sporulating bacterium belonging to the *Bacillus cereus* (*Bc*) group (Ehling-Schulz et al., 2019). It was first identified and characterized for its specific entomopathogenic properties due to the presence of a crystal containing specific Cry protoxins, which are produced during the bacteria sporulation (Rabinovitch et al., 2017). Among all the subspecies of *Bt* inventoried (<http://www.bgsc.org/>), spores of *Bt* subsp. *Kurstaki* (*Btk*) are used to specifically kill lepidopteran larvae that threat crops. Indeed, the cocktail of Cry toxins produced by *Btk* (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa and Cry2Ab (Caballero et al., 2020) binds to different receptors present in the midgut. Importantly, among those receptors, the ones that belong to the Cadherin transmembrane cell adhesion molecules are primordial for many families of Cry toxins allowing them to bind to enterocyte brush borders. The other receptors

such as the Alkaline phosphatases, the Aminopeptidases N, and the ABC transporters appear to account for the specific cytotoxicity the Cry exert toward target organisms (Mendoza-Almanza et al., 2020). In target insects, upon ingestion of spores and crystals, the basic midgut pH dissolves the crystals, releasing the Cry protoxins. Then, digestive enzymes cleave Cry protoxins into active Cry toxins that can bind their midgut receptors. Thereby, Cry toxins form pores in the ECs plasma membrane, ultimately leading to their death. An alternative mode of action of Cry toxins suggested that Cry binding to Cadherin induced an intracellular flux of Mg^{2+} resulting in EC apoptosis. In both models, toxins-induced breaches within the gut lining allow the bacteria (spores and vegetative cells) to reach the internal body cavity generating a septicemia and then lepidopteran larvae death within 2 or 3 days post toxins ingestion (Mendoza-Almanza et al., 2020). Noteworthy, Cry toxins produced by *Btk* are also used in genetically modified crops (GMC) (ISAA, 2017). It is assumed that *Btk* bioinsecticides (made of spores and Cry protoxin-containing Crystals) do not harm non-target organisms because first, the midgut pH is not adapted for the solubilization of the crystal and second, the Cry receptors are absent from their gut epithelium (Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016).

Nevertheless, recent studies suggest that *Btk* bioinsecticides may have adverse effects on non-target organisms. First, we have shown that *Btk* spores and toxins at concentrations close to those recovered on vegetables after spraying induce growth defects and developmental delay in *Drosophila* larvae (Nawrot-Esposito et al., 2020). Increasing spore and toxin doses ultimately lead to larval lethality (Babin et al., 2020). In Human, *Bt* has been implicated in foodborne outbreaks events and the strain identified was indistinguishable from the commercial one (Johler et al., 2018). Regarding *Btk* Cry toxin adverse effects, studies have reported that the Cry1Ab toxin produced by GMC is found in agricultural water stream networks at abnormally high doses, and may affect the survival rate of non-target insects (Rosi-Marshall et al., 2007). In addition, laboratory studies have demonstrated a genotoxicity of Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A in zebrafish rearing water (Grisolia et al., 2009). Considering the 180 millions of hectares of GMC, the 32 000 tons of *Bt* bioinsecticides sold per years (Casida & Bryant, 2017) and the agricultural changes that promote the use of biopesticides instead of conventional pesticides, *Btk* spores and toxins will be increasingly present in the food, the feed and in the environment. Consequently, *Btk* spores and toxins can affect the physiology of the digestive tract of many non-target organisms.

In this study, we have characterized the impacts of the ingestion of *Btk* bioinsecticides (spores and crystals) on the maintenance of intestinal cell homeostasis of the non-target

organism *Drosophila melanogaster* using environmental doses (i.e. the amount of spores recovered on the vegetables after one treatment). First, we have shown that crystal of *Btk* Cry protoxins induced moderate enterocyte death that triggers a quick cell replenishment by favoring symmetric ISC division. We have then demonstrated that the crystals diverted a higher number of progenitor cells from their initial EC fate toward an EEC, generating an excess of EECs. We further showed that this effect was due to a weakening of cell-cell interaction between ISC mother cells and progenitor daughter cells. Importantly, we were able to rescue the *Btk*-dependent excess of EECs by increasing the strength of adherens junction between ISCs and progenitors. Moreover, we showed that the Cry1Ac toxin alone was sufficient to induce this excess of EECs. Unexpectedly, we observed that *Btk* crystals are processed in the midgut of adult *Drosophila* as they do in that of target-organisms, releasing activated Cry1A toxins.

Results

***Btk* bioinsecticides induce EC death and stimulate proliferation of intestinal stem cells**

Btk bioinsecticides are composed of spores and crystals containing five different protoxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab). We used the commercial preparation named Delfin to study the impacts of *Btk* bioinsecticides on the cellular homeostasis of the adult *D. melanogaster* midgut. To unravel the impact on the gut of the spores alone, we used a *Btk* strain devoid of crystal (*Btk^{ΔCry}*) obtained from BGSC (Bacillus Genetic stock center, <http://www.bgsc.org>). A suspension of spores/crystals/water was deposited on the fly medium corresponding to 10⁶ CFU of spores per 5 cm² and per individual *Drosophila*. This dose of bioinsecticide is equivalent to the amount of spores preconized by the manufacturers for one spraying (Nawrot-Esposito et al., 2020; Loudhaief et al., 2017).

We first monitored EC apoptosis by expressing the Caspase 3 sensor (Casp::GFP; Schott et al., 2017) using the *myo1A-Gal4* EC driver (*myo1A>Casp::GFP*). With this transgenic combination, the GFP is detectable only when the Caspase 3 is activated in ECs. As a negative control, we fed other flies with water instead of the spores/crystals/water suspension. In all our experiments, we focused our observations on the posterior midgut (R4, <https://flygut.epfl.ch/overview>) because this is the region where we observed the strongest phenotypes. One day post ingestion, *Btk* bioinsecticides induced moderate apoptosis of the ECs compared to the control (Figure 1A). However, the treatment with the spores alone that do not produce Cry toxins (*Btk^{ΔCry}*) did not induce EC death. This result suggests that *Btk* crystal ingestion triggers EC death.

It has been previously shown that at a low dose (10^6 CFU per *Drosophila*) of *Btk* vegetative cells (that do not produce and contain crystals of Cry protoxins) weakly activates ISC proliferation without inducing EC apoptosis (Loudhaief et al., 2017). On the contrary, higher doses of *Btk* vegetative cells (10^8 CFU per *Drosophila*) or the pathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* induced EC apoptosis and strongly stimulated ISC proliferation to replace dying cells. This gut response is called "regenerative cell death" (Vriz et al., 2014) to promote cell replenishment. In both cases, damaged or dying ECs activated JNK signaling pathway which induce the production and secretion of Unpaired (Upd) cytokines that in turn activate the JAK/STAT pathway in ISCs leading to their proliferation (Loudhaief et al., 2017). We therefore hypothesized that *Btk*^{ΔCry} spores weakly damage the ECs that moderately activate the JNK signaling pathway. Thus, the production of Upd cytokines would be mild as well as the proliferation of ISCs. We also hypothesized that EC apoptosis caused by the *Btk* bioinsecticide strongly stimulates the JNK signaling pathway, the production of Upd and *in fine* the ISC proliferation. As expected, *Btk* bioinsecticides strongly stimulated JNK signaling in ECs and JAK/STAT signaling in ISCs with as consequence a strong proliferation of ISCs compared to *Btk*^{ΔCry} spores (SupFigure 1 and Figure 1B). We confirmed this increase in ISC proliferation by counting the number of ISC in the posterior midgut (R4 region). To specifically marked ISCs, we expressed the GFP under the control of the *Dl-Gal4* driver that is expressed in ISCs and EEPs (Joly & Rousset, 2020) and we co-stained with an anti-Prospero (Pros), an EEP and EEC marker (ISCs were therefore GFP+, Pros-). While we observed an increase in ISC number with the bioinsecticide, the *Btk*^{ΔCry} spores did not increase their number (Figure 1C). This could be that the weak stimulation of ISC proliferation by *Btk*^{ΔCry} spores is not sufficient to promote a detectable increase in ISC number. Another possibility could be that *Btk*^{ΔCry} spores favor ISC asymmetric division giving rise to one ISC and one EB (or EEP) while *Btk* bioinsecticide promotes ISC symmetric division giving rise to two ISCs. Indeed, numerous observations show that in the *Drosophila* midgut during intestinal homeostasis, the main mode of ISC division is asymmetric representing about 80% of the mitosis. On the contrary following an urgent need such as bacterial infection, ISCs divide symmetrically to allow faster regeneration of the tissue (Joly & Rousset, 2020). To assess the mode of ISC division, we used the ReDDM *Drosophila* genetic tools (Antonello et al., 2015) under the control of the *Dl-Gal4* driver (*Dl-ReDDM*). This tool allows to follow the progeny of the ISCs because they express a stable RFP (H2B::RFP) while the mother cells (the ISCs) express a labile GFP that disappears in less than 24 hours. The *Dl-ReDDM* tool is off at 25°C but active at 29°C. After shifting the

flies at 29°C, the GFP was only stably expressed in D1+ cells (i.e. the ISCs and EEPs) while the H2B::RFP was expressed in D1+ cells but also stably transmitted in the progeny. When two cells in direct close contact were GFP+ and H2B::RFP+ (ISC/ISC) or GFP+, H2B::RFP+ and Pros+ (EEP/EEP) or only RFP+ (EB/EB), we considered they were coming from a symmetric division. When two neighboring cells displayed different combination of immunolabelling, we considered the division as asymmetric. Interestingly while we observed a 33%/67% distribution of symmetric/asymmetric division in the control conditions, the mode of division trended in favor to the symmetric one with *Btk*^{ACry} spores and was completely reversed with the *Btk* bioinsecticide (Figure 1D and E). Therefore, the mode of ISC division appeared to reflect the degree of intestinal damages, the symmetric mode being preferentially adopted when the damages are greater (e.g. with *Btk* bioinsecticides).

To complete our understanding of what is happening upon ingestion of *Btk*^{ACry} spores and *Btk* bioinsecticides, we monitored the number of ECs using the fly strain *myo1A>GFP* (*w/w; myo1A-Gal4, UAS-GFP/+*) allowing the expression of the GFP in all ECs. Ingestion of *Btk*^{ACry} spores induced an excess of ECs at days 1 and 3 post-ingestion. The right number of ECs was recovered 5 days after ingestion (Figure 1F and SupFigure 1). Along with the absence of EC apoptosis (Figure 1A) and the moderate induction of ISC proliferation (Figure 1B), our data strongly suggest that *Btk*^{ACry} spores weakly damage the intestinal epithelium, reminiscent of the process of "cell renewal" previously identified for poorly virulent bacteria (Loudhaief et al., 2017). On the contrary, ingestion of the *Btk* bioinsecticide provoked a decrease in EC number 3 days post-ingestion (Figure 1F and SupFigure 1) that we attributed to EC apoptosis (Figure 1A). The right number of ECs was restored 5 days post-ingestion (Figure 1F and SupFigure 1). Hence, it seems that *Btk* bioinsecticides launch a process of regenerative cell death, inducing a strong proliferation of ISCs to quickly replenish the gut lining as previously described for strong pathogens (Vriz et al., 2014). However, this mechanism apparently displays limited efficiency since the apparition of new ECs is slower than the disappearance of old ones (likely due to the *Btk* bioinsecticide-dependent apoptosis) as illustrated by the decrease of the whole EC number 3 days post-ingestion (Figure 1F).

Purified crystals recapitulate all *Btk* bioinsecticide -induced phenotypes in the midgut

Btk^{ACry} spores and *Btk* bioinsecticide (made of *Btk* spores and Cry protoxin-containing crystals) exhibited differential effects on gut homeostasis, suggesting that *Btk* crystals is involved in this process. To test this hypothesis, we fed flies with an amount of crystals

corresponding to 30% of the dry weight of 10^6 CFU spores (Agaisse & Lereclus, 1995; MONRO, 1961; Murty et al., 1994) those crystals were purified from the commercial Delfin bioinsecticide (see Nawrot-Esposito et al., 2020) for detailed protocol of purification). Although the crystals were sufficient to induce moderate EC apoptosis, the level of EC apoptosis did not reach that observed with the bioinsecticide (Figure 1A). These data suggest that both spores and crystals synergized to induce high EC death. It would be necessary to monitor EC death at a later time to exclude whether apoptosis is not delayed after crystal administration alone. However, we did observe that crystals strongly stimulated ISC proliferation (Figure 1B) and was responsible for an increase in ISC number in a range similar to that with the *Btk* bioinsecticide (Figure 1C). The number of ECs was reduced 3 days post-ingestion as for the *Btk* bioinsecticide (Figure 1F and SupFigure 1).

Altogether, our data demonstrate that ingestion of *Btk* bioinsecticide at doses close to what it can be recovered on vegetable after one treatment transiently affects the cellular homeostasis of the midgut of the non-target organisms *Drosophila melanogaster*. Interestingly, the ingestion of purified crystals containing the Cry-prototoxins recapitulates the midgut phenotypes caused by the bioinsecticide.

Delfin induced an increase in EB, EEP, and EEC numbers

Surprisingly, during the course of our experiments, we observed that when flies ingested the *Btk* bioinsecticide, many EECs were apparently present (Figure 1E, pink cells in the Delfin condition). As ECs derive from EBs and EECs from EEPs, we assessed the amounts and identity of the precursors in the different conditions of infection (H₂O; *Btk*^{ΔCry} spores, *Btk* bioinsecticide and purified crystals). To count the EBs we used a strain of *Drosophila* expressing GFP specifically in EBs (*w/w*; *Su(H)-Gal4*, *UAS-CD8::GFP/+*). As expected, a significant increase in the number of EBs was observed between the first and the fifth day after ingestion of *Btk*^{ΔCry}, *Btk* bioinsecticide or crystals (Figure 2A). The EEP number was assessed using two markers: the GFP expressed in ISCs and progenitors (EBs and EEPs) and the anti-Pros antibody expressed in EEPs and EECs (genotype *w/w*⁺; *esg-Gal4*, *UAS-GFP/+*). In fact, cells expressing both GFP and Pros corresponded to EEPs. We noticed that while *Btk*^{ΔCry} spores did not modify the number of EEPs, ingestion of either the *Btk* bioinsecticide or the purified crystals resulted in an increase in EEPs from day one onwards (Figure 2B and D). Since EEPs must differentiate into EECs, we then counted the differentiated EECs that were GFP- Pros⁺. No difference in EEC number were obtained with *Btk*^{ΔCry} spores comparing to control, whereas

there was a net increase with either the *Btk* bioinsecticide or purified crystals (Figure 2C, D and SupFigure 2). Interestingly, though this event was rare, we also observed that EEPs could undergo a cycle of mitosis that could participate to the increase in EEPs and EECs (Figure 2E) (Zeng & Hou, 2015; Li et al., 2014). Altogether, our results showed that the crystals of *Btk* bioinsecticide were responsible for the excess of EECs.

EEC excess arises from newborn EEPs after ingestion of *Btk* bioinsecticide

To demonstrate that the excess of EEPs and EECs arose from proliferating ISCs caused by the ingestion of *Btk* bioinsecticide, we used the ReDDM cell lineage tracing system (Antonello et al., 2015) (genotype: *w/w*⁺; *esg-Gal4 UAS-GFP/+*; *UAS-H2B::RFP, tub-Gal80^{ts}/+*). The scheme of the experimental design is shown in (Figure 3A). We have chosen to analyze the progeny at day 3 post-ingestion because the increase in EECs reached its peak (Figure 2C). Noteworthy, because crystal purification was time consuming and technically difficult to carry out, we chose to use the *Btk* bioinsecticide (the mix of spores and crystals) that displayed similar phenotypes to that of purified crystals and that was easier to prepare.

According to the expression of specific cell marker and nucleus size, we could identify different cell type either which existed before the ingestion or that appeared after the ingestion of *Btk*^{ΔCry} spores or *Btk* bioinsecticide. ISCs were GFP+ RFP+ DAPI+ with small nuclei; EBs were GFP+ RFP+ DAPI+ with bigger nuclei; EEPs were GFP+ RFP+ Pros+ DAPI+; new EECs were RFP+, Pros+ DAPI+; old EECs were Pros+ DAPI+, new ECs were RFP+ DAPI+ with polyploid big nuclei and old ECs were DAPI+ with very big nuclei (Figure 3 B-D"). In the control experiments (water ingestion), few newborn ECs (red arrow in Figure 3B and B') and rare newborn EEPs (Figure 3B-B" and E) appeared 3 days post-ingestion, reflecting the relative steady state of the cellular homeostasis. As expected for poorly virulent bacteria, *Btk*^{ΔCry} spores ingestion induced the apparition of few newborn ECs (red arrows in Figure 3C and C') and only rare newborn EECs came out (pink arrows in Figure 3C-C"). Interestingly, *Btk* bioinsecticide ingestion promoted first the appearance of many newborn ECs (red arrows in Figure 3D and D') as well as newborn EECs (pink arrows in Figure 3D-D" and E). However, we could not rule out the possibility that the *Btk* bioinsecticide altered EB behavior, pushing them toward and EEC fate. To verify this possibility, we carried out a lineage tracing using the *Su(H)-Gal 4* driver that is specifically expressed in EBs (genotype: *w/w*; *Su(H)-Gal4/+*; *tub-Gal80^{ts} UAS-GFP/UAS-H2B::RFP*). In this case, no newborn EECs were detectable upon ingestion of the *Btk* bioinsecticide while many newborn ECs were present (Figure 3F and G, red arrows).

Altogether, our data demonstrate that the ingestion of *Btk* bioinsecticides damages the intestinal epithelium, strongly stimulating symmetric ISC proliferation. However, part of the precursors make the choice to engage toward an EEP/EEC fate and not toward an EB/EC fate. Consequently, there is a lack of new ECs to replace the dying ones while there is an excess of EECs. Interestingly, the crystals containing the Cry protoxins can recapitulate all the *Btk* bioinsecticide effects. On the contrary, *Btk*^{ACry} spores are poorly aggressive for the gut epithelium. ISC proliferation is hence only weakly stimulated and the precursor make the choice to engage toward the EB/EC fate to replace the damages ones.

***Btk* bioinsecticide decreases ISC-Progenitor cell-cell adhesion**

It is well established that Notch signaling pathway govern progenitor differentiation and cell lineage choice in the adult *Drosophila* midgut (Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007; Pasco et al., 2015). Indeed, the transmembrane ligand Delta (Dl) expressed in ISCs binds to its Notch (N) receptor present on the surface of progenitors. This induces the cleavage of the intracellular domain of N and its relocation into the nucleus to activate its target genes (Perdigoto & Bardin, 2013). Depending on the level of N activation, progenitors differentiate either into EBs and then ECs (in response to a strong activation of N signaling) or into EEPs and then EECs (in response to a weak activation of N signaling) (Beebe et al., 2010; Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007; Perdigoto & Bardin, 2013). A prolonged interaction between the ISC and its progenitor allows a strong activation of the N signaling pathway in the progenitor (Pasco et al., 2015; Joly & Rousset, 2020). A shorter and/or weaker interaction between ISC and its progenitor weakly induces the N pathway, pushing the progenitor towards the EEC fate. The adherens junctions between ISCs and progenitors formed by E-Cadherins and Connectins intervene to prolong the contact between Dl and N, favoring EB/EC fate (Choi et al., 2011; Maeda et al., 2008; Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007; Zhai et al., 2017). By the fact that the conserved receptors for Cry toxins in the target organisms are members of the Cadherin family (Adang & Crickmore, 2014), we wondered whether the *Btk* bioinsecticide could interfere with adherens junctions. Our hypothesis were that the ISC-progenitor interaction was reduced via interference of Cry toxins with Cadherins, modifying the cell fate of progenitors which could explain the excess in EEC number seen after *Btk* bioinsecticide ingestion. To verify this hypothesis, we marked the intestines of *Drosophila* fed with *Btk*^{ACry} spores or *Btk* bioinsecticide by the anti-Armadillo (Arm)/ β -catenin antibody that strongly marks the adherens junctions. We observed an intense labeling at the level of the ISC-progenitor junctions in the control (Figure

4A and A') or following intoxication by *Btk*^{ΔCry} spores (Figure 4B and B'). Strikingly, this labeling became less intense following ingestion of the *Btk* bioinsecticide or Crystals (Figure 4C-D"). Our results, therefore, suggested that the Crystals of Cry protoxins present in the *Btk* bioinsecticide were responsible for the increase in the number of EEPs/EECs, this effect being associated with a decrease in intercellular adhesion between ISC and EB progenitors.

Increasing adherens junction strength rescues *Btk* bioinsecticide-dependent cell fate diversion.

To confirm that the *Btk* bioinsecticide interfered with progenitor fate by disturbing adherens junctions, we increased the level of cell adhesion between ISCs and progenitors by overexpressing the DE-Cadherin in these cells (genotype: *w/w*; *esg-Gal4 UAS-CD8::GFP/UAS-E-Cad*; *UAS-H2B::RFP, tubGal80^{ts/+}*). We analyzed the identity of newborn cells 3 days after the ingestion of water (control) or the *Btk* bioinsecticide. Interestingly, in flies overexpressing the DE-Cadherin in ISCs and progenitors fed with the *Btk* bioinsecticide, we no longer observed an increase in the number of EECs (Figure 5A-C, blue arrows point old EECs). Furthermore, as expected we observed the appearance of newborn ECs (red arrows in Figure 5B and B'), strongly suggesting that increasing the cell adhesion between ISCs and progenitors rescued the progenitor fate disturbance generated by the *Btk* bioinsecticide. Because Cry toxins bind to Cadherins in target insects, our data support the idea that in non-target organisms such as *Drosophila*, Cry toxins also interact with Cadherins, interfering with cell-cell adhesion. ISCs and progenitors would be the first affected because the levels of DE-Cadherin are higher between those cells compared to EC (Maeda et al., 2008; Choi et al., 2011; Zhai et al., 2017). It would be interesting to overexpress another cell adhesion molecule such as the Connectin, which is also present in adherens junction between the ISCs and the progenitors (Zhai et al., 2017), to test the affinity of Cry toxins toward Cadherins of non-target animals.

Cry1Ac Crystals mimic *Btk* bioinsecticide effects

The *Btk* strains used as bioinsecticide produce 5 different Cry toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, and Cry2Ab) targeting lepidopteran larvae, a major crop pest. Our aim was to identify which family(ies) of toxins produced by *Btk* was/were responsible of the increased number of EEPs/EECs. To achieve this, we took advantage of the *Btk* strain called *Btk*^{Cry1Ac} (referred as 4D4 in <http://www.bgsc.org/>) which produces only crystals of the Cry1Ac protoxin. We fed flies (genotype: *w/w*⁺: *esg-Gal4 UASGFP/+*) either with spores of *Btk*^{Cry1Ac} or with purified crystals containing only the Cry1Ac protoxin. We then looked at 3 days post-ingestion

the number of EEPs (GFP+ Pros+) and EECs (GFP- Pros+). Interestingly, we observed a significant increase in the number of EEPs and EECs following ingestion of either *Btk*^{Cry1Ac} spores or Cry1Ac protoxin-containing crystals compared to controls (Figure 6A-D). We plan to perform similar experiments using the Cry2A toxins. However, the *Btk* strain producing only Cry2A toxins have not been yet generated. Our team is currently making such a strain. Nonetheless, because the three different Cry1A toxins produced by the *Btk* bioinsecticide share 85% of identity and 93% of similarity (<https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu/>), the same target organisms and the same host receptors (Mendoza-Almanza et al., 2020), we can assume that at least the family of Cry1A toxins are involved in the excess of EEPs/EECs we observed.

Cry1A Protoxins are activated in the posterior midgut

So far, we used crystals to study the impacts of Cry toxins on progenitor behaviors, however, crystals are made of Cry protoxins (Mendoza-Almanza et al., 2020). We therefore wondered whether the effects we observed were due to the crystal on its own or to its processing in the *Drosophila* midgut leading to the release of activated Cry toxins. We first monitored by Western Blot the processing of Cry1A toxin family in the midgut of flies fed with the *Btk* bioinsecticide. We used an anti-Cry1A antibody raised against the activated form of the toxins (Babin et al., 2020). In the *Btk* bioinsecticide preparation (a mix of spores and crystals in water) that we incubated at 25°C for the period of the experiment, we mainly detected the protoxin forms of Cry1A at 130kD. Protoxins were stable at least 3 days but then disappeared (control in Figure 7A, right part of the blot). Our observation were in agreement with the fact that the half-life of Cry1A crystals has been estimated at about 1 week in the soil (Hung et al., 2016). We used the same initial *Btk* bioinsecticide preparation (0h) to fed flies. We further dissected intestines and extracted total proteins at different time post-ingestion. Interestingly as soon as 4h post-ingestion we observed the 67kD activated form of the Cry1A toxins (Figure 7A left part). Later on, a 45kD form was present highlighting the full processing of the protoxins. Six days after ingestion, no more protoxins or toxins were detectable (Figure 7A).

We then aimed to detect *in vivo* in the midgut the localization of the Cry toxins. Unfortunately, despite many attempts using plenty of different protocols for immunohistolabeling, we failed to detect *in vivo* the protoxins and/or the toxins. To overcome this difficulty, we again chose an approach using Western Blot. We fed flies with purified *Btk* crystals, dissected the intestines by separating the anterior from the posterior midgut (indeed the excess of EEPs/EECs we observed was in the posterior R4 region). Furthermore, we performed subcellular fractioning by separating the cytoplasm (Cyto) and the membranes (Mb).

Interestingly, we observed that protoxins were already activated in the anterior part of the midgut (the 65kD form) but were only associated with the membrane (Figure 7B). In the posterior midgut, we detected the 45kD form of the fully activated Cry1A toxins. This form was associated with the membranes. Moreover, the 67kD form of the activated Cry1A toxins were also present in the cytoplasm suggesting an internalization by epithelial cells. Thus, our data suggest that Crystals containing Cry protoxins are processed along the intestinal midgut to generate fully activated Cry1A toxins in the posterior midgut, the midgut site where progenitor fate behavior is affected.

Conclusion

Through our experiments, we wanted to emphasize the putative unanticipated effects of the use of *Btk* bioinsecticides on non-target insects. No one denies the importance of the *Btk* bioinsecticide strain producing five Cry toxins and that it is found in the market under two names Dipel or Delfin, but unfortunately, its ingestion has unintentional impacts on the fly (a non-target species). Our results show that the *Btk* bioinsecticide disrupts the physiological balance of the intestine by affecting its cellular homeostasis. We have seen during the 24 hours following ingestion of environmental doses of the *Btk* bioinsecticide by adult fruit flies that ECs undergo moderate apoptosis. We clearly showed that this effect due to the Cry toxins of *Btk*. Consequently to the ECs death, an accelerated cell replenishment program is launched involving symmetrical ISC division.

We then demonstrated that the crystals diverted the progenitors from their initial EC fate toward EEC fate, which generate abnormal excess of EECs. Among the five Cry toxins contained in *Btk* crystals, the Cry1Ac toxin is at least sufficient to promote this EEC excess. This effect is associated with a decrease in intercellular adhesion between ISCs and daughter cells. We were able to rescue excess *Btk*-dependent EECs by increasing the strength of the adherent junction between ISCs and progenitors. Finally, we observed that the processing of the Cry1A toxins in the midgut of *Drosophila* occurs in the same way as in the midgut of target organisms (i.e. lepidopteran larvae), resulting in the release of activated Cry1A toxins. Our model is summarized in Figure 7C.

The opportunistic virulence of *Btk* should never be overlooked for many organisms and especially those suffering from nutritional stress, dysbiosis or whose innate immunity is compromised. The use and efficacy of *Btk* spores and toxins should not be hampered by unintended effects. For their use to become as safe as possible for handlers, consumers and the

environment, is then a necessity to characterize as best we can all the impacts. Through this work and many others that will follow up, one should be able to accurately assess the consequent risks due to exposure to *Btk* bioinsecticides and preventive and curative measures should be obtained for users and consumers alike.

Funding

This work was supported by Région Provence Alpes Côte d'Azur, Département des Alpes-Maritimes, the Institut Olga Triballat (PR2016-19) and the ANSES PNR-EST & ECOPHYTO II (EST-2017-2021). RJ was funded by the association AZM & SAADE (Lebanon) and the Université Côte d'Azur (ATER). RL was funded by a grant from the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) and the MESR (Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). FT was funded by the Lebanese Association for Scientific Research (LAsER).

Bibliography

- Adang, M., & Crickmore, N. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism. In *Insect Midgut and Insecticidal Proteins* (Vol. 47). https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=E2ZzAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA39&dq=Cry1Ab+mammalian+OR+human&ots=VZzaEGriTe&sig=YwEfEubWCH44E_TQX_sotRao6bE
- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, *177*(21), 6027–6032. <https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6027-6032.1995>
- Antonello, Z. A., Reiff, T., Ballesta-Illan, E., & Dominguez, M. (2015). Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8–Escargot switch. *The EMBO Journal*, *34*(15), 2025–2041. <https://doi.org/10.15252/embj.201591517>
- Babin, A., Nawrot-Esposito, M. P., Gallet, A., Gatti, J. L., & Poirié, M. (2020). Differential side-effects of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide on non-target *Drosophila* flies. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73145-6>
- Beebe, K., Lee, W. C., & Micchelli, C. A. (2010). JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Developmental Biology*, *338*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.045>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host and Microbe*, *5*(2), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Caballero, J., Jiménez-Moreno, N., Orera, I., Williams, T., Fernández, A. B., Villanueva, M., Ferré, J., Caballero, P., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020). Unraveling the composition of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*: A proteomics approach. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(12), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00476-20>
- Casida, J. E., & Bryant, R. J. (2017). The ABCs of pesticide toxicology: Amounts, biology, and chemistry. *Toxicology Research*, *6*(6), 755–763. <https://doi.org/10.1039/c7tx00198c>
- Choi, N. H., Lucchetta, E., & Ohlstein, B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(46), 18702–18707.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1109348108>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 1–35.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
- Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A., & Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. In *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: Characterization and use in the Field of Biocontrol*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8>
- Grisolia, C. K., Oliveira, R., Domingues, I., Oliveira-Filho, E. C., Monerat, R. G., & Soares, A. M. V. M. (2009). Genotoxic evaluation of different δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.017>
- Hung et al (2016)-Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil differences between purified toxin and biopesticide formulation. (2016). 2016.
- ISAA. (2017). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 years. *Isaaa, Brief 53*, 127.
- Johler, S., Kalbhenn, E. M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., & Ehling-Schulz, M. (2018). Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01915>
- Joly, A., & Rousset, R. (2020). Tissue adaptation to environmental cues by symmetric and asymmetric division modes of intestinal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176362>
- Li, Q., Li, S., Mana-Capelli, S., RothFlach, R. J., Danai, L. V., Amcheslavsky, A., Nie, Y., Kaneko, S., Yao, X., Chen, X., Cotton, J. L., Mao, J., McCollum, D., Jiang, J., Czech, M. P., Xu, L., & Ip, Y. T. (2014). The conserved misshapen-warts-yorkie pathway acts in enteroblasts to regulate intestinal stem cells in drosophila. *Developmental Cell*, 31(3), 291–304.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.012>
- Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Benguettat, O., Nawrot-Esposito, M. P., Pauron, D., Amichot, M., & Gallet, A. (2017). Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development (Cambridge)*, 144(5), 808–819. <https://doi.org/10.1242/dev.142539>
- Maeda, K., Takemura, M., Umemori, M., & Adachi-Yamada, T. (2008). E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes to Cells*, 13(12), 1219–1227.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01239.x>
- Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. *Toxins*, 12(5), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/toxins12050301>
- Micchelli, C. A., & Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*, 439(7075), 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature04371>
- MONRO, R. E. (1961). Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *The Biochemical Journal*, 81, 225–232.
<https://doi.org/10.1042/bj0810225>
- Murty, M. G., Srinivas, G., Bora, R. S., & Sekar, V. (1994). A simple method for separation of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* using carboxymethyl cellulose column chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 19(2), 103–110.
[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)90041-8)
- Nawrot-Esposito, M. P., Babin, A., Pasco, M., Poirié, M., Gatti, J. L., & Gallet, A. (2020). *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides induce developmental defects in non-target drosophila melanogaster larvae. *Insects*, 11(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/insects11100697>

- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*, *439*(7075), 470–474. <https://doi.org/10.1038/nature04333>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2007). Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science*, *315*(5814), 988–992. <https://doi.org/10.1126/science.1136606>
- Pasco, M. Y., Loudhaief, R., & Gallet, A. (2015). *Pasco-30-277-292-2015*. 277–292.
- Perdigoto, C. N., & Bardin, A. J. (2013). Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(2), 2307–2322. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.009>
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A. and Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus*, (ed. L. M. Fiuza R. A. Polanczyk and N. Crickmore), pp. 1-18: Springer International Publishing. (2017). 2017.
- Rosi-Marshall, E. J., Tank, J. L., Royer, T. V., Whiles, M. R., Evans-White, M., Chambers, C., Griffiths, N. A., Pokelsek, J., & Stephen, M. L. (2007). Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(41), 16204–16208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707177104>
- Rubio-Infante, N., & Moreno-Fierros, L. (2016). An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *Journal of Applied Toxicology*, *36*(5), 630–648. <https://doi.org/10.1002/jat.3252>
- Schott, S., Ambrosini, A., Barbaste, A., Benassayag, C., Gracia, M., Proag, A., Rayer, M., Monier, B., & Suzanne, M. (2017). A fluorescent toolkit for spatiotemporal tracking of apoptotic cells in living *Drosophila* tissues. *Development (Cambridge)*, *144*(20), 3840–3846. <https://doi.org/10.1242/dev.149807>
- Vriz, S., Reiter, S., & Galliot, B. (2014). Cell Death. A Program to Regenerate. *Current Topics in Developmental Biology*, *108*, 121–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00002-4>
- Zeng, X., & Hou, S. X. (2015). Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *Drosophila* posterior midgut. *Development (Cambridge)*, *142*(4), 644–653. <https://doi.org/10.1242/dev.113357>
- Zhai, Z., Boquete, J. P., & Lemaitre, B. (2017). A genetic framework controlling the differentiation of intestinal stem cells during regeneration in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *13*(6), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006854>

FIGURES

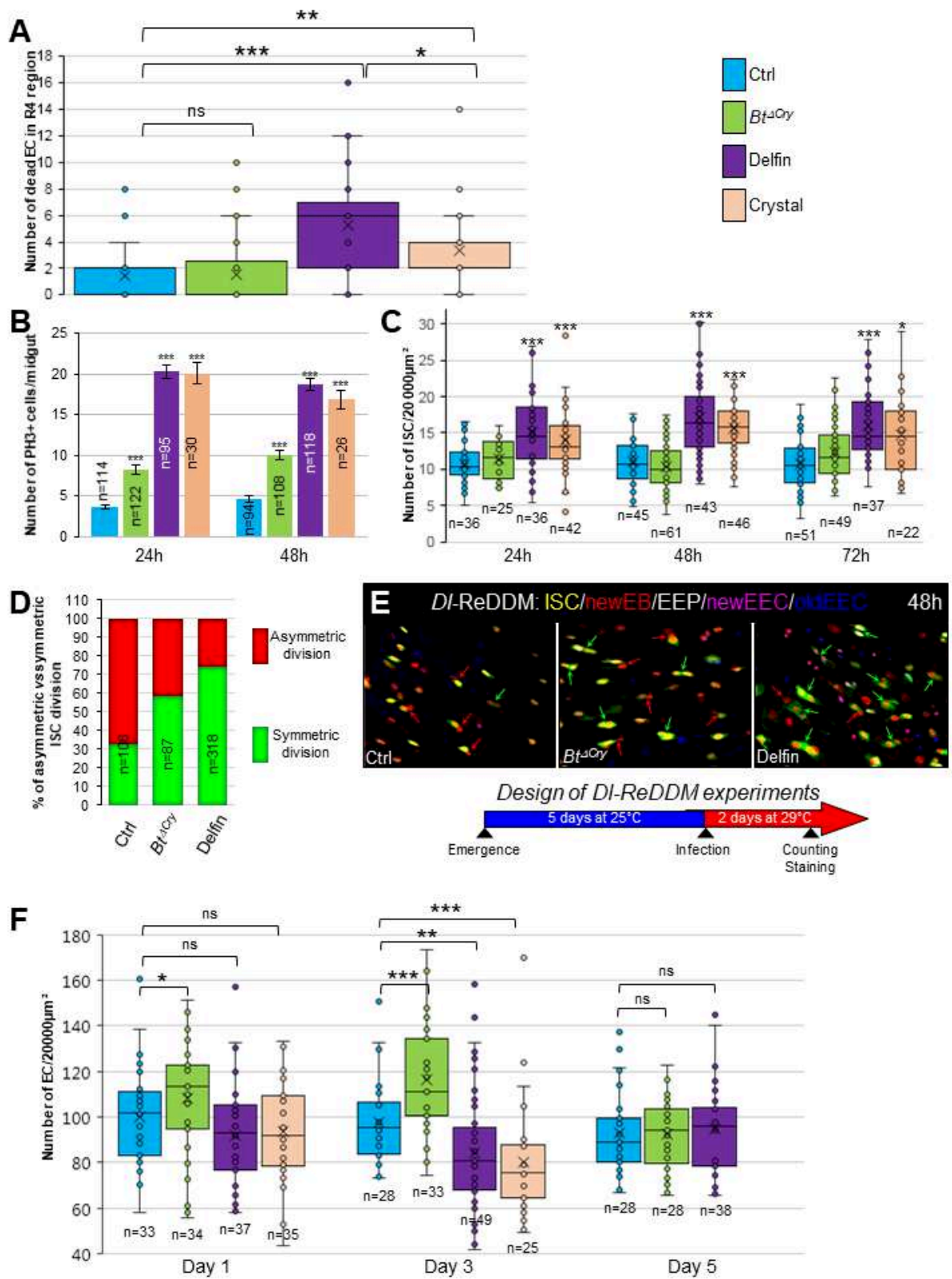


Figure 1: *Btk* bioinsecticides induce EC death and stimulate proliferation of intestinal stem cells

(A) Quantification of dead ECs 24h post ingestion (PI) in the posterior midgut (R4 region) of flies fed with water (blue, control-ctrl), *Btk*^{ΔCry} spores (Green), Delfin (mauve) or Crystal (pink). The initial dose provided with the food to flies was 10⁶ CFU fly/5 cm² (this dose is used in all the following experiments presented in this article). We monitored EC apoptosis by expressing the Caspase 3 sensor (Casp::GFP) using the *myo1A-Gal4* EC driver (*myo1A-Gal4;UAS-Casp::GFP*). With this transgenic combination, the GFP is detectable only when the Caspase 3 is activated in ECs. (B) Quantification of mitoses (using the Phospho-Histone 3 antibody-PH3) in the whole midgut 24h and 48h PI of water (blue), *Btk*^{ΔCry} spores (green), Delfin (mauve) or Crystal (pink). (C) ISC Number in the R4 region of *esgGal4 UAS-GFP/+* flies 24, 48, and 72h PI of water (blue), *Btk*^{ΔCry} spores (green), Delfin (mauve) or Crystal (pink). (D and E) Evaluation of the division mode of ISCs in *tub-Gal80^{ts}/UAS-GFP::CD8; Df-Gal4, UAS-GFP/UAS-H2B::RFP* flies (*Df-ReDDM*) *Drosophila* fed with water, *Btk*^{ΔCry} spores or Delfin. The experimental design is shown below the panels in (E). In (D) red bars correspond to asymmetric divisions and green bars to symmetric divisions. In (E) anti-Pros (blue) marks the EEP and EEC. Red arrows point asymmetric divisions and green arrows point symmetric divisions. (F) Number of ECs in the R4 region 24, 48, and 72h PI of flies whose ECs express GFP (*myo1A-Gal4, UAS-GFP/+*) and fed with water (blue), *Btk*^{ΔCry} spores (green), Delfin (mauve) or Crystal (pink). n=number of samples; ns=not significant; * ($P \leq 0.05$); ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$).

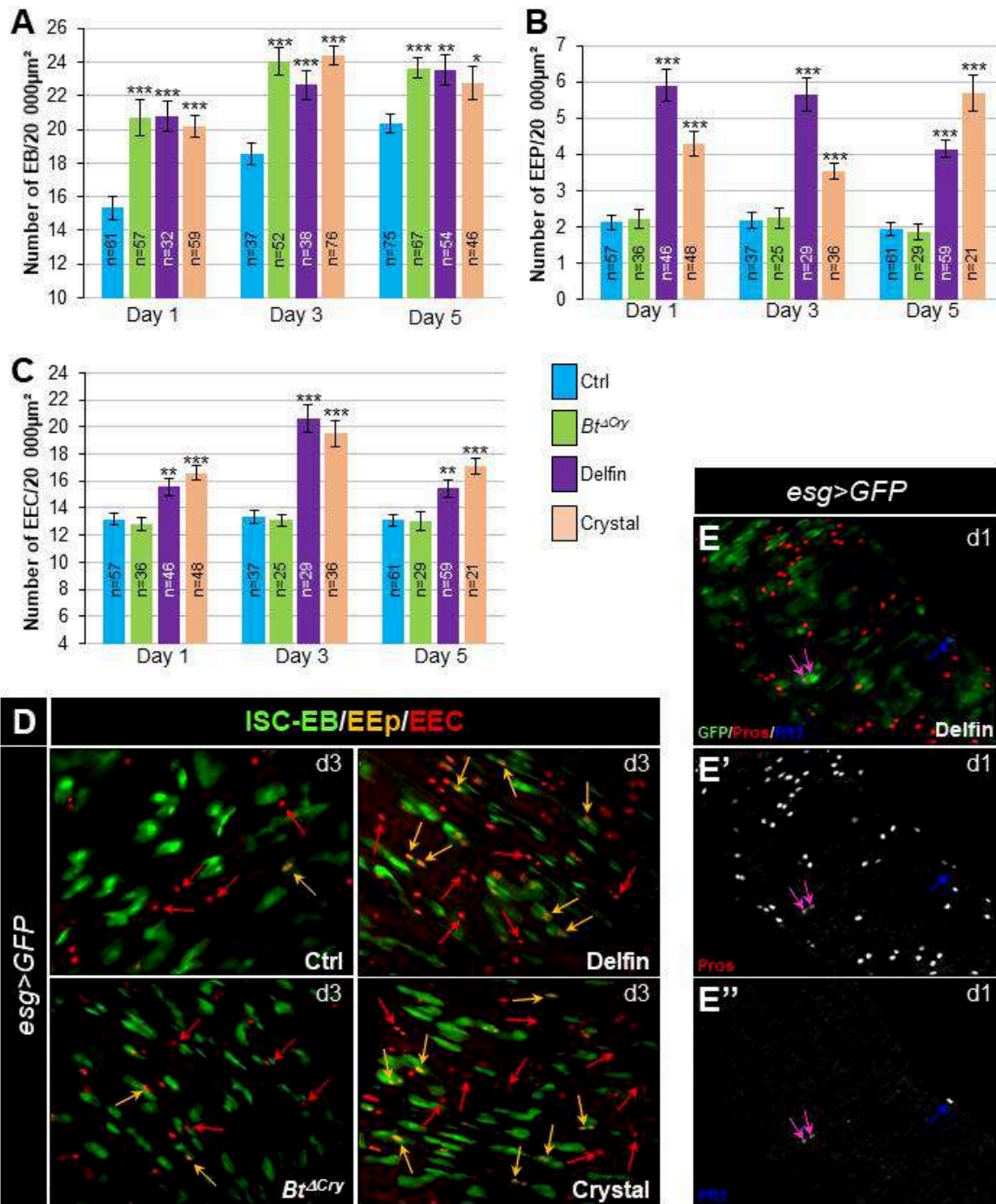


Figure 2: Delfin induced an increase in EB, EEP, and EEC numbers

(A) Number of EBs in the R4 region 24, 48, and 72h PI of water (blue), *Btk^{ΔCry}* spores (green), Delfin (mauve) or Crystal (pink) in *Drosophila* expressing the GFP specifically in EBs (*w/w⁺*; *Su(H)-Gal4, UAS-CD8::GFP/+*). (B, C, D and E-E'') R4 region of *w/w⁺*; *esg-Gal4, UAS-GFP/+* flies labeled with anti-Pros antibody (Red in D, 3 days PI). GFP is expressed in ISCs, EBs and EEPs and Pros is expressed in EEPs and EECs. Flies were fed with water (blue), *Btk^{ΔCry}* spores (green), Delfin (mauve) or Crystal (pink). (B and C). Number of EEPs and EECs were assessed 24, 48, and 72h PI. (E-E'') PH3 staining (blue) to mark mitosis. Pink arrows point dividing EEPs and blue arrow point dividing ISC. n=number of samples; * ($P \leq 0.05$); ** ($P \leq 0.01$), *** ($P \leq 0.001$).

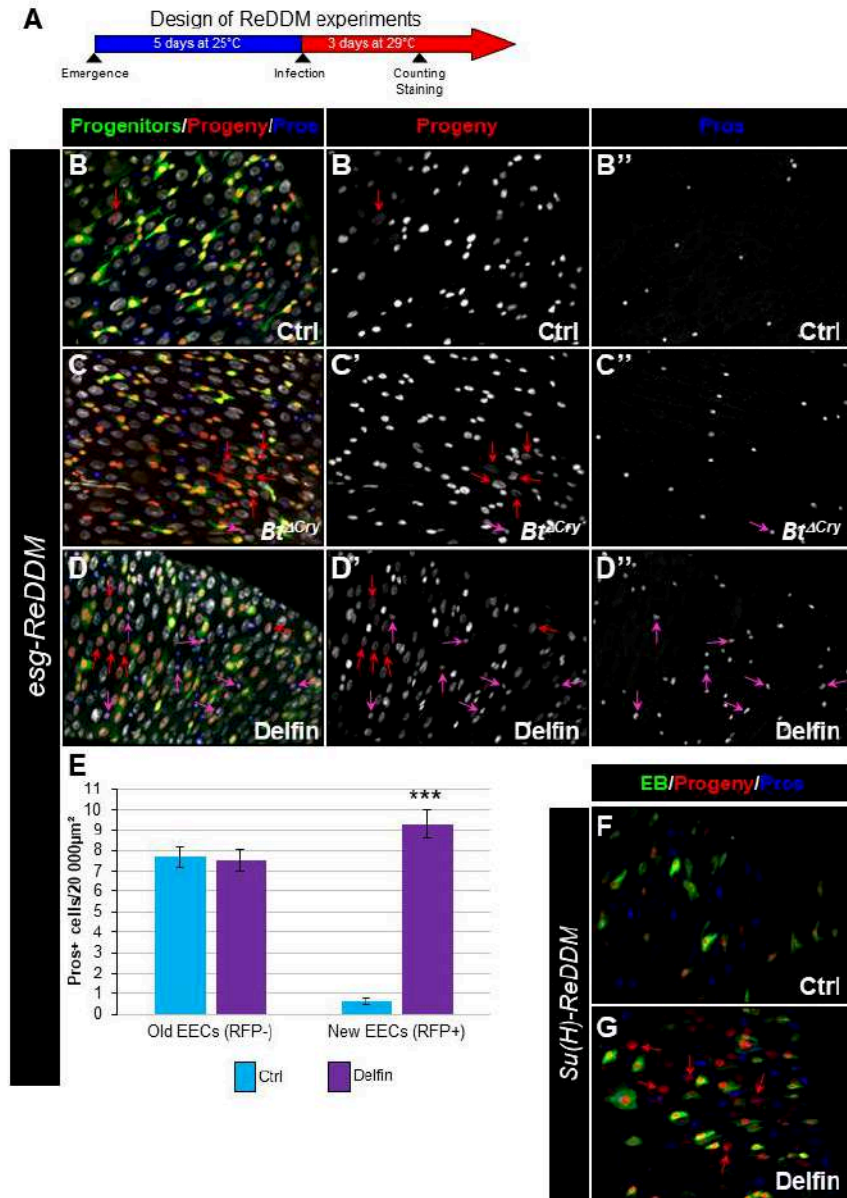


Figure 3: EEC excess arises from newborn EEPs after ingestion of *Btk* bioinsecticide

(A) Schema of the experimental design used in all this figure for the ReDDM cell lineage tracing system. (B-E) R4 region of *w/w⁺; esg-Gal4, UAS-GFP/+; UAS-H2B::RFP, tub-Gal80^{ts}/+* flies (*esg-ReDDM*). Midgut were stained for Pros (blue) and DAPI, which marks nuclei (white in B, C and D). (B-D'') show the different cell types which either existed before the ingestion of water (B-B'' Ctrl), *Btk^{ΔCry}* spores (C-C'') or *Btk* bioinsecticide (D-D'', Delfin). ISCs were GFP+ RFP+ DAPI+ with small nuclei; EBs were GFP+ RFP+ DAPI+ with bigger nuclei; EEPs were GFP+ RFP+ Pros+ DAPI+; new EECs were RFP+, Pros+ DAPI+; old EECs were Pros+ DAPI+, new ECs were RFP+ DAPI+ with polyploid big nuclei and old ECs were DAPI+ with very big nuclei. (E) Counting old EECs (Pros+ RFP-) and new EECs (Pros+ RFP+) in the conditions described in (A, B and D). (F and G) *w/w; Su(H)-Gal4/UAS-GFP::CD8; tub-Gal80^{ts}, UAS-GFP/UAS-H2B::RFP* (*Su(H)-ReDDM*). The driver *Su(H)-Gal4* is specifically expressed in EBs. Flies were fed with either water (F, Ctrl) or Delfin (G) and midgut were labelled for Pros (blue). Midgut R4 region is shown. *** ($P \leq 0.001$).

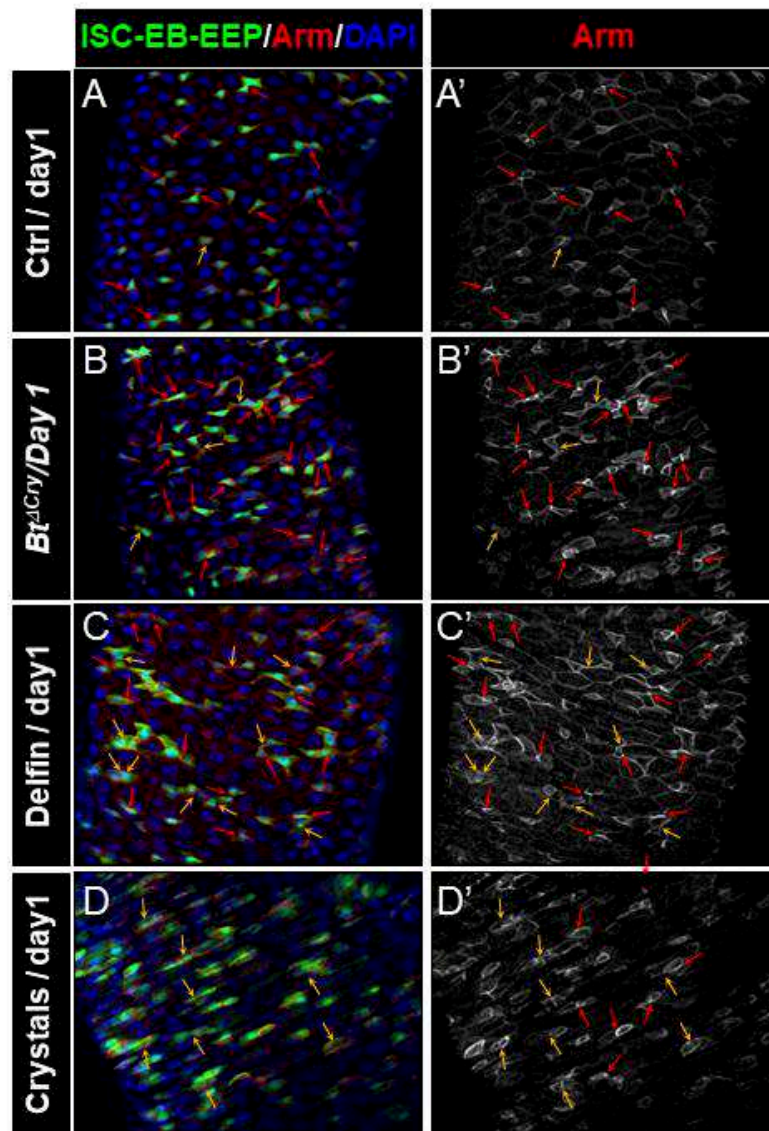


Figure 4: *Btk* bioinsecticide decreases ISC-Progenitor cell-cell adhesion

(A-D') *w/w+*; *esg-Gal4 UAS-GFP/+* *Drosophila* midgut R4 region 24h PI of water (A and A', Ctrl), *Btk*^{ΔCry} spores (B and B'), Delfin (C and C') or crystals (D and labeled with anti-Armadillo (Arm) β-catenin (red) which strongly marks the adherent junctions between ISC and progenitors (green). In blue Dapi marks the nuclei. Red arrows point the intense staining of adherens junctions between ISC and progenitors. Yellow arrows point the weak intensity of adherens junction staining.

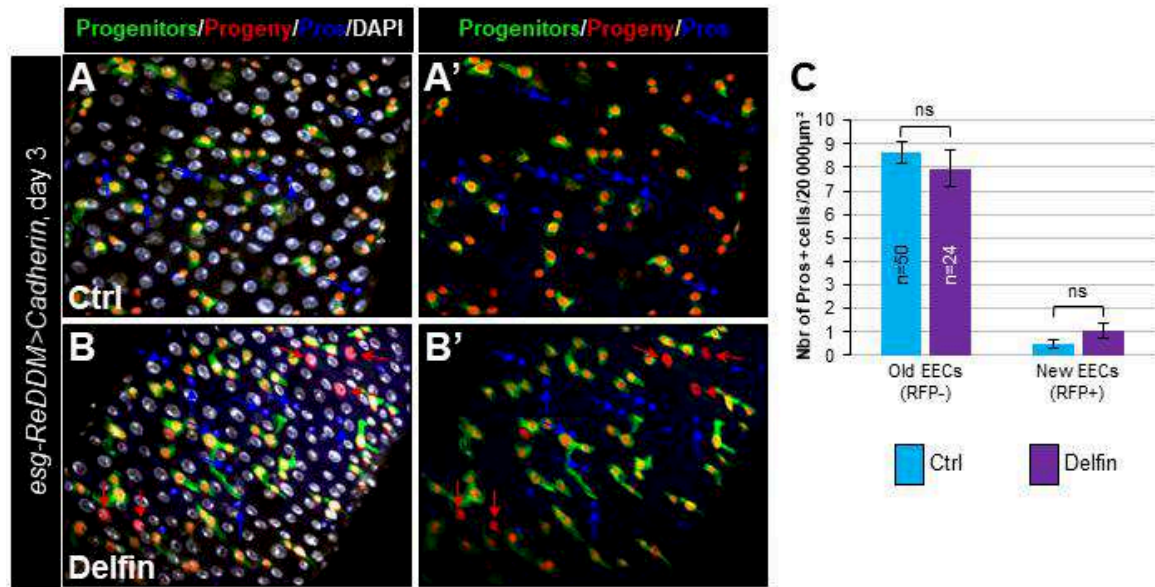


Figure 5: Increasing adherens junction strength rescues *Btk* bioinsecticide-dependent cell fate diversion.

(A-C) *w/w; esg-Gal4, UAS-CD8::GFP/UAS-DE-Cad; UAS-H2B::RFP, tubGal80^{ts}/+* *Drosophila* midgut R4 region. Those flies specifically overexpress DE-Cad in ISCs and progenitors. Flies were fed with water (A-A', and blue in C, Ctrl) or with Delfin (B-B' and violet in C) and observed 72h PI. In (A-B') blue arrows point old EECs and red arrows newborn EECs. (C) Number of old EECs (Pros+ RFP-) and new EECs (Pros+ RFP+). n=number of samples. ns=not significant.

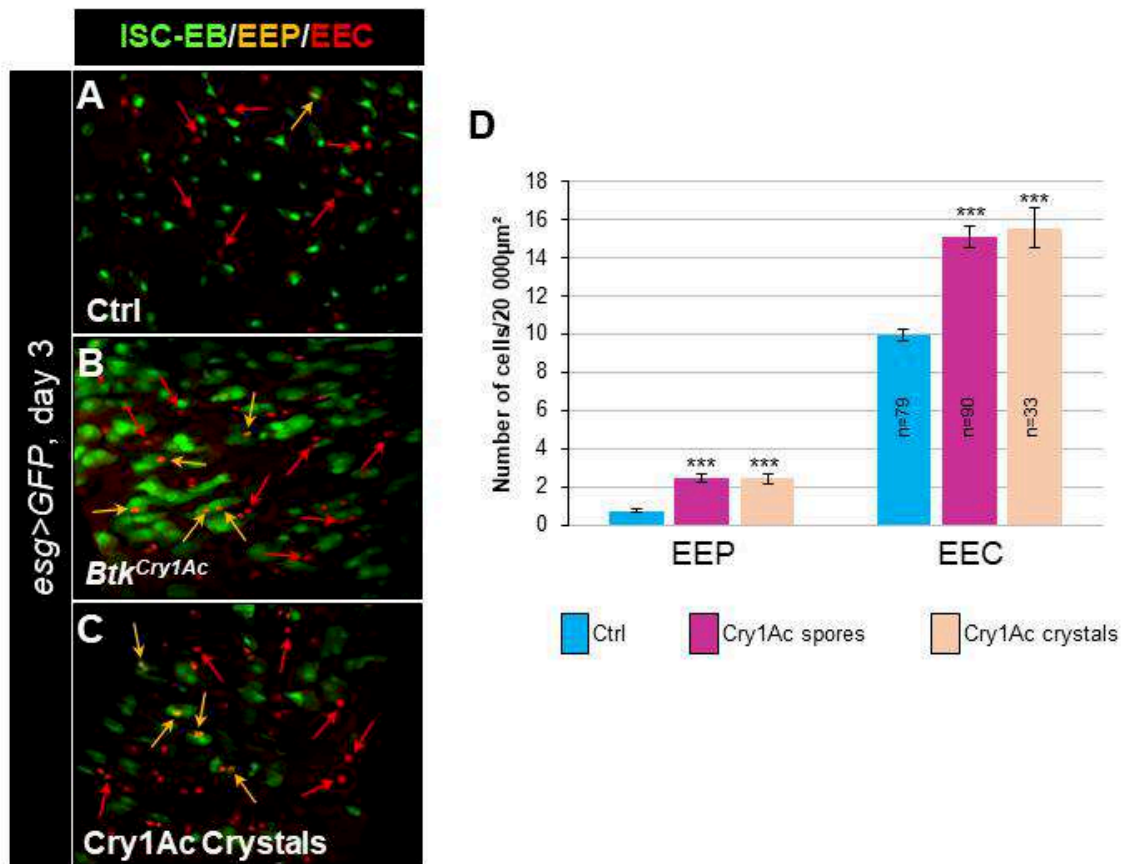


Figure 6: Cry1Ac Crystals mimic *Btk* bioinsecticide effects

(A-D) *w/w+*; *esg-Gal4 UAS-GFP/+ Drosophila* midgut R4 region 72h PI of water (A and blue bars in D, Ctrl), *Btk^{Cry1Ac}* spores (B and pink bars in D), or Cry1Ac crystals (C and beige bars in D). (A-C) Pros labeling in red. Orange arrows point EEPs and red arrows points the EECs. (D) Number of EEPs and EECs in the different experimental conditions described above. n=number of samples. *** ($P \leq 0.001$).

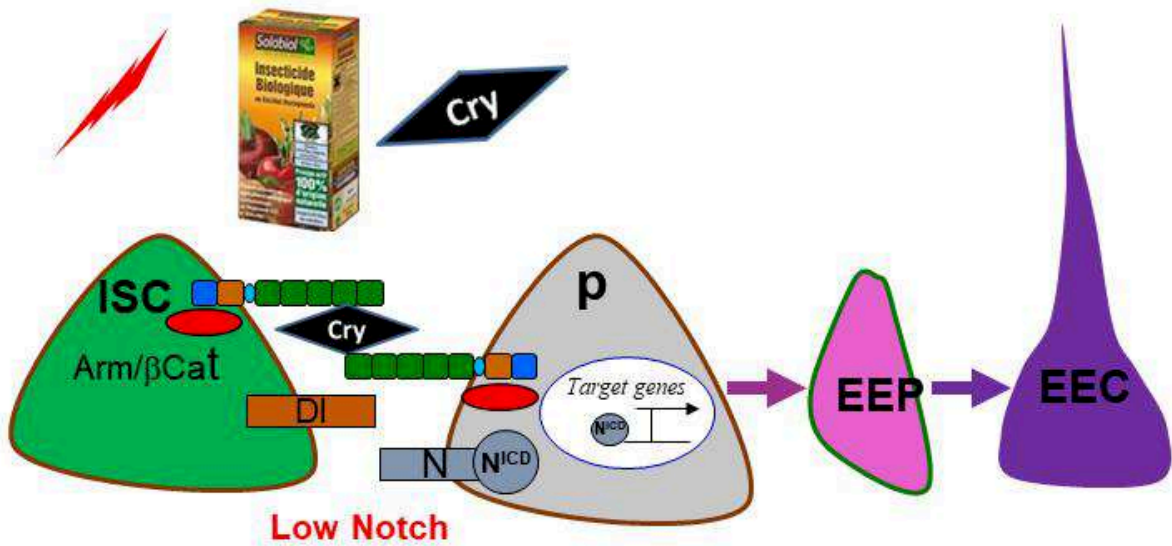
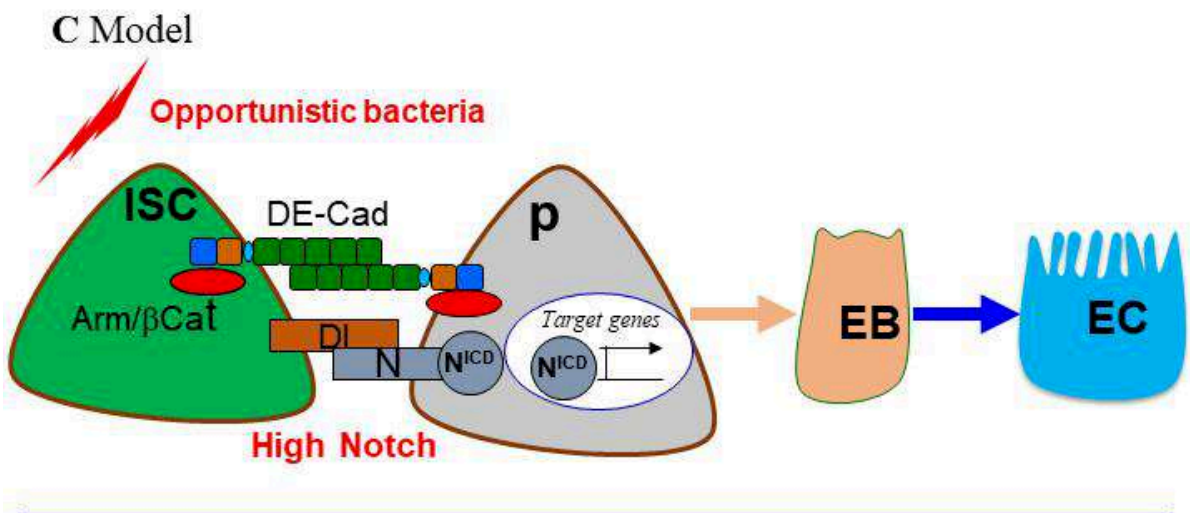
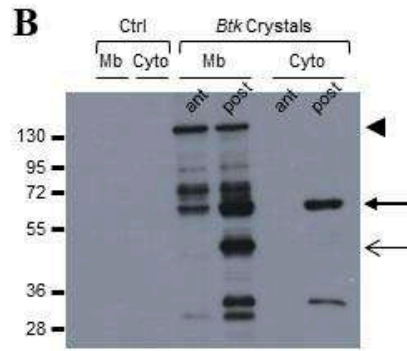
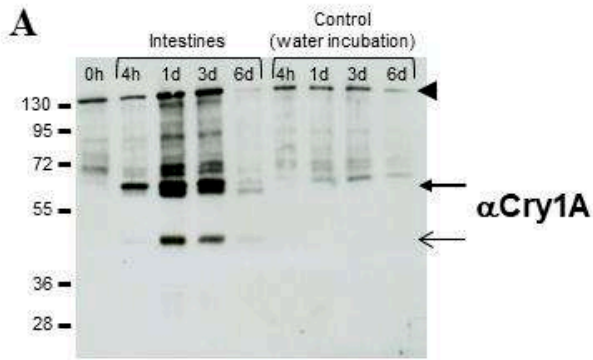
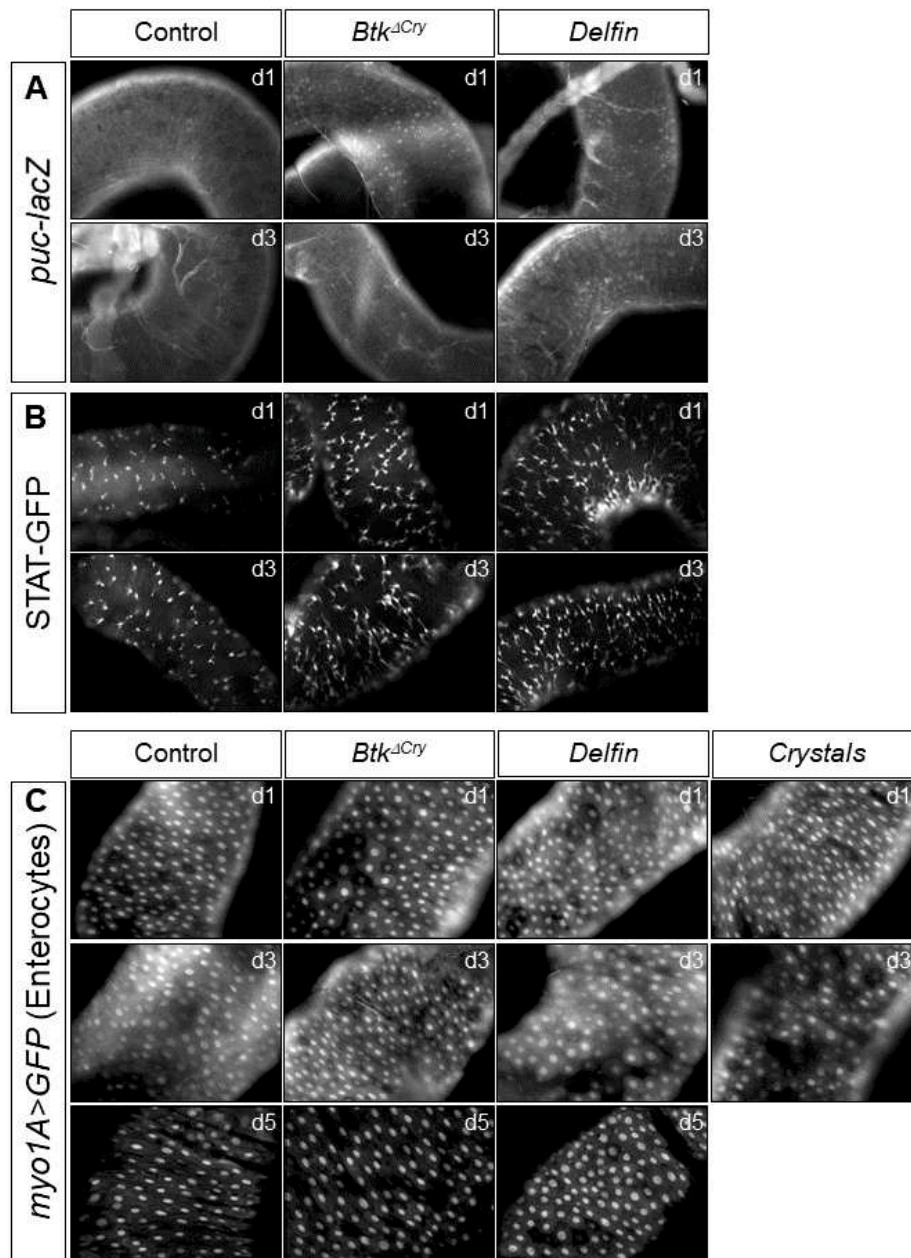


Figure 7: Cry1A Protoxins are activated in the posterior midgut

(A and B) Western Blot using a polyclonal Anti-Cry1A antibody raised against the protoxin form of the Cry1A family of toxins. (A right part of the blot) *Btk* bioinsecticide preparation in water incubated at 25°C for the period of the experiment. We mainly detect the protoxin forms of Cry1A at 130kDa (arrowhead). (A left part of the blot) Proteins extract from midgut of flies intoxicated by the same *Btk* bioinsecticide preparation used for the Left panel at 4h and 1, 3 and 6 days PI. The 130kDa protoxins are still visible. The 67kDa activated forms appear as soon as 4h (thick arrow) and are then processed into the fully activated 44kDa forms (thin arrow). 6 days PI no more toxins are detected in the midgut. (B) Western blot Anti-Cry1A antibody of protein extracts from midgut. Control (Ctrl, left part) corresponds to intestine of flies fed with water. *Btk* crystals (right part) corresponds to intestine of flies fed with purified crystals. Protoxins (130kDa) are present in the membrane fraction (Mb) in both the anterior (ant) and the posterior (post) midgut. The 67kDa activated forms are present the membrane fraction of both the anterior and posterior midgut (thick arrow) and in the cytoplasm (Cyto) of the posterior midgut. The fully activated 44kDa forms are only associated with the membrane fraction of the posterior midgut (thin arrow). (C) Model. Upper panel: in *Drosophila*, the ingestion of opportunistic bacteria induces apoptosis of ECs. This apoptosis stimulates the proliferation of ISCs that stimulate a strong activation of the Notch pathway in the progenitors, the latter will differentiate into EBs, which will then give ECs. Lower panel: ingestion of *Btk* bioinsecticides also triggers EC apoptosis and ISC proliferation but the binding of Cry toxins to the adherent junctions (DE-Cad) causes a weak activation of the Notch pathway in the progenitors and pushing the progenitor toward an EEP/EEC fate.

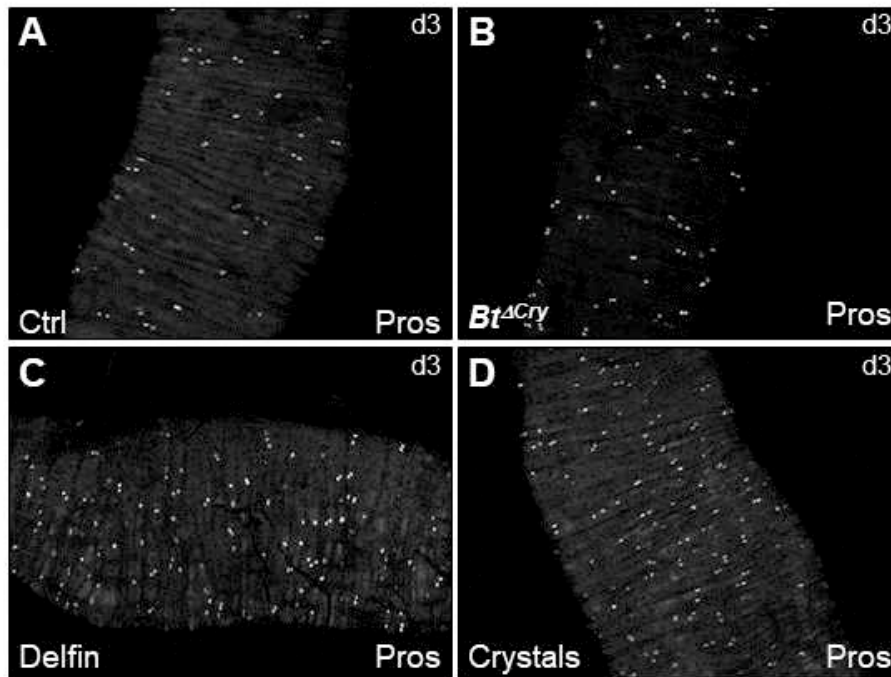


Supfigure 1:

A- *puc-lacZ* expression using an anti- β Gal antibody in the posterior midgut of *Drosophila*, fed with water (control), *Btk^{ΔCry}* spores or by Delfin at 1 and 3 days PI. *puc-lacZ* expression reflects the JNK signaling activation.

B- STAT-GFP reporter gene expression in the posterior midgut of *Drosophila* fed with water (control), *Btk^{ΔCry}* spores or by Delfin at 1 and 3 days PI. STAT-GFP expression reflects the JAK/STAT/Upd signaling activation.

C- *w/w; myo1A, UAS-GFP/+* posterior midgut of *Drosophila* fed with water (control), *Btk^{ΔCry}* spores, Delfin or crystals of Delfin at 1, 3 and 5 days PI. GFP marks the ECs.



Supfigure 2:

(A-D)- *w/w+*; *esg-Gal4*, *UAS-GFP/+* midgut R4 region 72h PI of water (A), *Btk^{Cry1Ac}* spores (B), Delfin (C) or crystals (D). An anti-Pros was used to mark the EECs.

Partie.3 : Discussion et Conclusion

Chapitre 1 : Discussion

3.1 Mécanismes de défenses intestinales

Dans le règne animal le tube digestif est un organe vital requis pour l'absorption des nutriments. Il est soumis à de nombreuses agressions tout au long de la vie. Il constitue également la première barrière contre les agents pathogènes (virus, bactéries, toxines) ou les produits chimiques (médicaments, pesticides) ingérés avec de la nourriture. Chez les vertébrés et les invertébrés la muqueuse intestinale est dotée de plusieurs **systèmes de défense** pour se protéger des agents nocifs (1) une barrière physique recouvrant la muqueuse intestinale soit **le mucus** chez les vertèbres ou la **membrane péritrophique** chez les invertébrés qui la protègent des agresseurs (Kuraishi et al.,2011 ; Shibata et al.,2015); (2) suite à l'intoxication par les bactéries opportunistes ou virulentes, le système immunitaire inné local est induit dans l'épithélium intestinal, principalement dans la partie antérieure de l'intestin moyen (**dans la région R1 et R2**) et se traduit par la production rapide d'espèces réactives à l'oxygène (**ROS**) et qui ont un effet bactériostatique (Du et al.,2016). La production de ROS est activée par la libération d'uracile par les bactéries allochtones et qui agit comme un facteur de croissance bactérien. L'enzyme responsable de la production de ROS de type HOCl est la Dual oxidase (DUOX); (3) la production de ROS semble aussi être nécessaire pour l'expulsion de l'intestin des bactéries ingérées en augmentant la **défécation** (Du et al., 2016); (4) en plus de la production des ROS, la réponse immunitaire locale est renforcée par la production des peptides antimicrobiens (**PAMs**) pour combattre les bactéries ingérées (Buchon, Broderick, Chakrabarti, et al., 2009; K. A. Lee et al., 2013; Capo et al.,2016); (5) l'intestin accélère son renouvellement cellulaire pour assurer le remplacement efficace des cellules abimées (endommagées).

Récemment les travaux de mon équipe, en utilisant le modèle de laboratoire *Drosophila melanogaster*, et la forme végétative de *Btk*, afin d'éviter l'effet additif/ synergique des toxines Cry qui sont produites uniquement pendant la sporulation, ont montré que *Btk* est éliminé au bout de 4 heures (Loudhaeif et al., 2017). Ces données suggèrent que les mécanismes de défense de l'intestin ont été mis en place peu après l'ingestion de *Btk*. Nous avons donc étudié les premières étapes des mécanismes de signalisation induits par la présence de bactéries opportunistes. Nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de défense indépendant du système immunitaire, caractérisé par l'apparition de **spasmes viscéraux** pour éliminer plus rapidement les bactéries opportunistes. Par ailleurs il est connu que, chez la drosophile comme chez les mammifères, l'épithélium intestinal est entouré de muscles lisses qui permettent sa

contraction de façon végétative lors de la prise alimentaire. Ces contractions autonomes et involontaires, appelées péristaltisme, poussent la nourriture ingérée à travers l'intestin pour permettre la digestion et l'absorption des nutriments puis l'excrétion des fèces (Farré & Tack, 2013). Dans notre étude, nous avons observé une forte contraction des fibres musculaires longitudinales au cours des 2 premières heures après l'ingestion de bactéries. Nous avons montré que cette contraction est induite par l'accumulation de ROS dans la lumière intestinale qui stimule le récepteur TrpA1 dans les EEC. Une autre étude menée chez la souris a montré une induction d'une contraction intestinale différente de la contraction péristaltique après ingestion de nématodes pathogènes. Cette contraction pathologique a été aussi observée chez la drosophile après ingestion de fortes doses d'Ecc (Buchon et al., 2010).

Il a été démontré que l'uracile produit par les bactéries allochtones agit comme un ligand indirect activant la DUOX dans l'immunité intestinale de la drosophile (K. A. Lee et al., 2013 ; E. K. Kim et al., 2020) Lee et al ont montré que les bactéries produisant beaucoup d'uracile induisaient un niveau élevé de ROS intestinaux, tandis que les bactéries avec des capacités réduites de production d'uracile présentaient un faible niveau basal de ROS. Dans nos expériences, nous n'avons jamais réussi à reproduire l'induction de la production de ROS par l'uracile malgré la multitude d'essais tentés. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette incohérence entre nos équipes. (1) Nos conditions d'alimentation et/ou d'élevage de nos drosophiles influenceraient ou modifieraient la détection de l'uracile par l'intestin. (2) Le fond génétique de notre souche de drosophile sauvage (Canton S) avec laquelle nous avons fait nos expériences est différent de celui des lignées de drosophiles utilisées dans les expériences de Lee et al (2013). Cette différence rendrait nos drosophiles "insensibles" à l'uracile. (3) Lee et al (2013) ont utilisé des femelles âgées de 5-6 jours pour leurs expériences comme nous l'avons fait. Cependant Du et al. (2016) ont uniquement pu détecter un effet de l'uracile chez les mâles. Il y donc peut-être une différence de perception de l'uracile entre les sexes. (4) C'est peut-être un ensemble de ces différences.

Chez la drosophile comme chez les mammifères, TRPA1 est impliqué dans la sécrétion de DH31/CGRP au niveau du système nerveux central (Benemei et al., 2014). En ce qui concerne la drosophile, TRPA1, dans le but d'assurer le réveil, contrôle la sécrétion de DH31. Chez les mammifères, il est responsable de la libération de CGRP afin de favoriser le contrôle du flux sanguin et de la pression artérielle et est impliqué dans l'induction des migraines (Benemei et al., 2014). Au cours de nos expériences nous avons montré que, dans l'intestin, les ROS immunitaires se fixent sur TRPA1 aboutissant à son activation et *in fine* à la libération du

neuropeptide DH31. Et on sait auparavant que les ROS sont produits seulement dans la partie antérieure de l'intestin (K. A. Lee et al., 2013) et TRPA1 est aussi uniquement exprimé dans cette région (Du et al., 2016). Cependant, ce qui attire l'attention c'est que les spasmes apparaissent dans tout l'intestin moyen. Comment ce phénomène s'explique-t-il ? Les spasmes se propagent-ils de l'anérieur vers le postérieur grâce aux EEC postérieures exprimant DH31 ? Sans doute pas. En effet, après ingestion de *Btk*, ce qui se passe dans la partie antérieure est différent de ce qui se passe dans la partie postérieure. Alors que les EECs postérieures DH31+ présentent un flux de calcium constitutif indépendant de la présence de bactéries, les EEC antérieures deviennent positives au flux de calcium uniquement après ingestion de *Btk*. Cela s'explique par le fait que les EEC DH31+ antérieures possèdent une sensibilité à la présence des bactéries opportunistes sans doute due à l'expression de *TrpA1*. Une explication pour la propagation de spasmes de l'anérieur vers le postérieur pourrait être la libération de DH31 dans l'hémolymph qui agirait à distance sur la partie postérieure. En effet, chez les mammifères, les peptides entéroendocrines peuvent agir à très longue distance après pénétration dans la circulation sanguine et avoir une activité consécutive dans de nombreux organes, y compris le cerveau (Furness et al., 2013).

Des données obtenues chez le rat et la drosophile montrent que la présence d'agents pathogènes augmente la motilité intestinale se traduisant par une diarrhée. Effectivement, chez les rongeurs infectés par le nématode parasite *Trichinella spiralis*, un accroissement de la contractilité de l'intestin survient, évoquant un signal intrinsèque, et est indispensable pour l'élimination du parasite (Alizadeh et al., 1987). Cette augmentation de l'activité propulsive intestinale est liée à l'épaississement des fibres musculaires lisses longitudinales et circulaires. Plus récemment, les scientifiques ont montré que l'ingestion de la bactérie opportuniste *Ecc15* par la drosophile cause une défécation accélérée entre 2 h et 8 h après l'ingestion (Du et al., 2016). Une fois cette défécation accélérée bloquée (c'est-à-dire chez le mutant perte de fonction *TrpA1*), la durée de persistance des bactéries au sein de l'intestin devient plus longue. Les résultats obtenus suggèrent que chez les rongeurs et chez la drosophile l'expulsion des facteurs infectieux de l'intestin a recours à la motilité intestinale accrue contrôlée de manière autonome. Plusieurs informations concernant la motilité intestinale accrue sont à retenir : d'abord elle ne débute pas immédiatement après l'ingestion du pathogènes mais quelques heures après ; ensuite sa durée est estimée entre quelques heures et quelques jours (Du et al., 2016). A l'inverse, dans notre étude, la réponse viscérale que nous avons identifiés, les caractéristiques physiologiques sont un peu différentes (1) la réponse se produit rapidement suite à l'ingestion de bactéries (en 1h

environ); (2) seules les fibres musculaires viscérales longitudinales se contractent fortement (dans l'accroissement de la motilité intestinale, les fibres longitudinales et circulaires interviennent de façon similaire au péristaltisme); et (3) les spasmes disparaissent rapidement (en moins de 4h). Tout cela nous mène à une supposition que les spasmes viscéraux pourraient évoluer alors vers une motilité/défécation intestinale accélérée afin de pouvoir éliminer complètement le pathogène. Ce sont donc les mêmes acteurs qui interviennent dans les deux phénomènes physiologiques : les ROS et TrpA1. Ainsi, la réponse à une courte période d'intoxication (ou une faible intoxication) se fait à travers les spasmes viscéraux qui éliminent rapidement les bactéries, alors qu'une motilité/défécation intestinale accélérée pourrait être nécessaire pour expulsion des agents infectieux en cas d'ingestion prolongée ou de persistance du pathogène dans l'intestin.

Les résultats de nos expériences constituent le début de nouvelles investigations sur les fonctions des toutes premières étapes cellulaires et moléculaires de l'intoxication alimentaire chez les vertébrés. Lors d'intoxications alimentaires et/ou de diarrhées, le diagnostic médical assure qu'il existe un lien fort entre douleur intestinale et spasmes viscéraux. Ce qui pousse les professionnels de la santé aux recours aux médicaments qui inhibent les spasmes viscéraux afin de limiter la diarrhée et la douleur en même temps. Cependant, d'après nos recherches, le blocage des spasmes induit un ralentissement de l'élimination des pathogènes responsables de l'inconfort. Par conséquent nos travaux mettent en évidence l'utilité de ce mécanisme physiologique dans l'élimination des pathogènes ingérés. Il sera à l'avenir important de développer de nouveaux médicaments soignant les douleurs viscérales et la déshydratation liées aux diarrhées mais ne bloquant pas les spasmes nécessaires à l'élimination des bactéries pathogènes.

Nos travaux révèlent aussi l'importance des EECs dans de nouveaux mécanismes physiologiques. Elles ne s'impliquent pas seulement dans la réponse immunitaire innée ([Park et al., 2016](#) ; [Beebe et al., 2015](#)), le comportement alimentaire ou le métabolisme ([Mace et al., 2015](#)), les EEC jouent aussi un rôle important dans les mécanismes de défense de l'intestin.

3.2 Homéostasie cellulaire intestinale et *Bt*

Afin de mieux comprendre les effets non intentionnels associés à l'utilisation des bioinsecticides *Bt* sur le long terme, dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai étudié les impacts de l'ingestion de bioinsecticides *Btk* (faits d'un mélange de spores et cristaux de toxines Cry) sur l'homéostasie

cellulaire intestinale de l'organisme non cible *Drosophila melanogaster* à l'aide de doses environnementales. J'ai tout d'abord montré que **l'ingestion de faibles doses de bioinsecticides *Btk* induisait d'une part une apoptose modérée des entérocytes (EC) et, d'autre part** de manière frappante **une forte augmentation du nombre de cellules entéroendocrines (EEC)**. Ce résultat est inattendu car dans un contexte normal, le phénomène largement décrit est que, suite à une intoxication alimentaire bactérienne qui cause des lésions intestinales, les EC lésés sont immédiatement remplacés. Ceci grâce à la stimulation de la division des ISC qui donnent naissance à des progéniteurs (les EB) qui vont ensuite se différencier en EC pour remplacer les cellules endommagées. Prenons comme exemple les travaux précédents de mon équipe: ils ont montré que lors de l'ingestion de faibles quantités de bactéries (10^6 bactéries par drosophile à disposition, entre 10^2 et 10^3 effectivement ingérées), les cellules végétatives *Btk* (qui ne produisent pas et ne contiennent pas de cristaux de toxines Cry) stimulent le programme de renouvellement cellulaire intestinal malgré le fait que les bactéries ingérées sont rapidement éliminées de l'intestin sans induire la mort cellulaire (sans apoptose EC) (Loudhaief et al., 2017). En absence de mort cellulaire, la division des ISC est stimulée mais dans une moindre mesure (prolifération faible de ISC) comparé au programme de « mort cellulaire régénérative » déclenché par des doses plus élevées de cellules végétatives *Btk* ou de pathogène puissant (tel que *Pseudomonas entomophila*). Dans ce cas-là, la mort des EC stimule fortement la prolifération des ISC pour remplacer les EC mourants et favoriser la reconstitution cellulaire (Loudhaief et al., 2017 ; Vríz et al., 2014). Dans nos conditions d'alimentation avec le bioinsecticides *Btk*, nous avons montré par lignage cellulaire, que seulement très peu de nouveaux EC apparaissaient, en tous cas pas suffisamment pour remplacer tous ceux mourant. De fait, le nombre total d'EC dans l'intestin diminue alors qu'étonnamment le nombre d'EEC augmente fortement. Ce phénomène aboutit à l'impossibilité du remplacement efficace les EC mourants auquel vient potentiellement s'ajouter des perturbations physiologiques découlant de l'augmentation des EEC.

Comment expliquer que l'intestin produise plus d'EEC après intoxication par le bioinsecticides *Btk* alors qu'ils devraient produire plus d'EC pour remplacer tous ceux mourant ? Dans l'intestin moyen de la drosophile adulte, les ISC sont nécessaires pour maintenir la composition cellulaire appropriée. Pour assurer le recrutement permanent de cellules nouvellement différenciées, les ISC subissent une division cellulaire asymétrique qui génère une ISC elle-même et une cellule progénitrice. Ensuite, une interaction prolongée entre ISC et progéniteur permet une forte activation de la voie de signalisation Notch dans le progéniteur, ce qui promeut sa différenciation en EC. Une interaction de courte durée entre ISC et progéniteur induit faiblement

la voie Notch, poussant le progéniteur vers le destin EEC (Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007 ; Pasco et al., 2015). Ainsi il est connu que le renforcement du contact ISC-EB par les molécules d'adhésions est nécessaire pour activer fortement la voie Notch et finalement favoriser une différenciation des EB en EC (Maeda et al., 2008). Fait intéressant, les jonctions adhérentes dans l'interface liant les ISC et les progénitures sont enrichies en **E-cadhérines** et en **Connectines**. Ces molécules d'adhésions interviennent pour prolonger le contact entre les cellules souches intestinales et les progéniteurs. Ensuite une forte activation de la voie Notch en favorise le devenir EB/EC (Choi et al., 2011 ; Maeda et al., 2008 ; Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007 ; Zhai et al., 2017).

Quelle hypothèse pour expliquer ce phénomène ? Il a été démontré que (1) la toxicité des toxines Cry1 et Cry2 chez les larves de ravageurs ciblées (les larves de lépidoptères) passe par leur fixation sur des récepteurs de la familles des cadhérines (molécules d'adhésion universelle des épithélia) (Adang & Crickmore, 2014) ; (2) l'adhésion intercellulaire entre ISC et progéniteur est dépendante de la E-cadhérine (Maeda et al., 2008; Zhai et al., 2017); (3) une analyse de l'alignement des séquences des sites de fixation de la toxine Cry1Ab sur le récepteur cadhérine BT-R1 chez deux lépidoptères cibles, *Manduca sexta* et *Chrysomela tremula*, montre une identité de 20.2% entre les domaines des deux espèces cibles alors qu'ils présentent plus de 25% d'identité avec les cadhérines FAT de la drosophile ou de l'homme (deux espèces non cibles) et plus de 30% avec la Cad88C de drosophile. **Mon hypothèse est** donc que les toxines Cry1 *a minima* chez les organismes non-cibles (la drosophile, les mammifères) interagissent aussi avec des cadhérines intestinales. De fait, cette interaction Cry/Cadhérines pourrait être responsable de la diminution de l'adhésion intercellulaire ISC-progéniteur et finalement la différenciation des progéniteurs en EEC. Cette diminution modifierait le temps de contact entre cellule souche et progéniteur, donc la force d'activation de la voie Notch et *in fine*, le devenir cellulaire des progéniteurs.

Plusieurs données viennent étayer mon hypothèse. (1) Tout d'abord les jonctions adhérentes entre les ISC et les progéniteurs formés par les E-cadhérines et les connectines interviennent pour prolonger le contact entre ces cellules en favorisant le devenir EB/EC (Choi et al., 2011; Maeda et al., 2008; Micchelli & Perrimon, 2006 ; Ohlstein & Spradling, 2006, 2007 ; Zhai et al., 2017); (2) la régulation négative des molécules d'adhésions (cadhérine et connectine) dans les ISC et les progéniteurs supprime la différenciation rapide des EB et que la surexpression de la connectine dans les ISC et les progéniteurs est suffisante pour favoriser la différenciation des EB (Zhai et al., 2017). (3) Par exemple, la réduction de l'adhésion entre les ISC et les EB par ARNi contre le gene de la *E-cad* induit soit une accumulation de cellules non différenciées soit

une différenciation vers des EEC (Maeda et al., 2008). (3) Inversement, la surexpression de la cadhérine induit une diminution du nombre des EEC (Maeda et al., 2008). (4) Lors de l'inhibition de la E-cadhérine par ARNi dans l'intestin moyen postérieur chez les drosophiles adultes, le nombre d'ISC et progéniteurs en contact est très rare, ce qui renforce l'idée que la cadhérine est nécessaire pour un long contact entre les ISC et les progéniteurs (Maeda et al., 2008), et ce qui suggère qu'une diminution de la E-cad est essentielle pour la séparation des cellules. (5) Le niveau d'Armadillo est plus faible dans toutes les cellules (ISC, EB, EC) lors de l'inhibition de la cadhérine et le nombre d'EC est aussi plus faible suggérant que le niveau de Notch est insuffisant pour favoriser une différenciation des EB en EC (Maeda et al., 2008) (6) Mes travaux montrent que nous avons pu sauver l'excès d'EEC dépendant des toxines Cry en augmentant la force des jonctions adhérentes entre les ISC et les progéniteurs en surexprimant la DE-cadhérine dans ces cellules pour renforcer leur interaction en présence de toxines Cry. (7) Par Western Blot à partir d'intestin de mouches nourries avec des cristaux de Delfin, nous avons observé que les toxines Cry1A se lient à la membrane cellulaire (partie antérieure et postérieure de l'intestin), cela renforce notre hypothèse car les cadhérines sont des protéines transmembranaires. Cry1A se trouve aussi dans le cytosol des cellules de la partie postérieure de l'intestin moyen, ce qui indique une probable internalisation des toxines Cry1A par les EC. (8) Par la technique de ligand blot, nous avons déterminé que Cry1A interagit avec des protéines intestinales de 40 kD, 100 kD, 130 kD et 200 kD (données préliminaires non présentées) et comme la E-cadhérine fait environ 130 kDa, alors il se pourrait qu'elle soit l'une d'entre elle. (9) Pour identifier les protéines intestinales cibles des toxines, par une approche de co-immunoprécipitation des toxines Cry1A à partir de l'intestin de mouches empoisonnées par le bioinsecticide *Btk*, nous avons isolé des protéines intestinales interagissant avec Cry1A. Nos données d'analyses par spectrométrie de masse confirment que les interactants isolés appartiennent **aux complexes membranaires d'adhésion intercellulaire** (données préliminaires qui restent à être reproduites). Donc, l'ensemble de ses données suggèrent que les toxines Cry contenues dans le bioinsecticide *Btk* pourraient effectivement être responsables de l'augmentation du nombre EEC, cet effet étant associé à une diminution de l'adhésion intercellulaire entre ISC et progéniteurs.

Les connectines entrent aussi dans la composition des jonctions adhérentes entre les ISC et les progéniteurs (Zhai et al., 2017). Il serait intéressant de surexprimer la connectine dans les ISC et progéniteurs et de vérifier si dans ces conditions un nombre normal de EEC est restauré en présence des cristaux de toxines Cry. Ceci nous permettrait de vérifier la spécificité des toxines Cry vis-à-vis de la E-cadhérine ou si les Cry ont une action plus général sur les jonctions

adhérentes. Il faut aussi réaliser une immunolocalisation *in vivo* des toxines Cry1A suite à l'ingestion d'aliments contaminés par *Btk*. Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives utilisant de nombreux protocoles différents pour une immunolocalisation *in vivo*, je n'ai pas réussi à détecter les protoxines et/ou les toxines. D'abord peut être (1) parce que l'anticorps utilisé ne marche pas *in vivo*; (2) la liaison qui a lieu entre la toxine Cry et la cadhérine se déroule pendant une durée brève et nous avons réalisé les expériences après 6h et 24h post intoxications ne correspondant pas à la cinétique d'interaction Cry1A/E-cadhérine. En effet, nous avons observé que les nutriments atteignent la partie postérieure de l'intestin en 2 heures et demi, favorisant l'idée que l'expérience d'immunolocalisation doit avoir lieu très tôt, 3 heures ou maximum 4 heures post-intoxication ; (3) il est probable qu'il faille augmenter la dose de bioinsecticides *Btk* utilisé pour augmenter le seuil de détection par l'anticorps anti-Cry1A. Quoiqu'il en soit, nous allons poursuivre nos études pour localiser *in vivo* les toxines Cry et identifier avec quels composants des jonctions adhérentes les toxines Cry1A interagissent pour perturber l'adhésion.

La question qui se pose maintenant est comment les toxines Cry qui se trouvent dans le lumen après ingestion de bioinsecticides *Btk*, agissent-elles pour perturber les jonctions adhérentes entre les ISC et les progéniteurs localisés dans la partie basale de l'épithélium intestinal ? Les EC sont les premières cellules attaquées par n'importe quel agresseur ingéré avec la nourriture mais ce sont aussi des cellules absorbantes.

Je propose trois hypothèses qui peuvent expliquer l'effet de ces toxines Cry sur les jonctions entre ISC et progéniteurs. (1) D'abord, les EC se trouvent partout dans l'épithélium intestinale. C'est probable que suite à l'intoxication des mouches par les toxines Cry, ces dernières se fixent directement sur les jonctions adhérentes localisées entre les EC, les premières en contact avec les toxines. Le résultat de cette fixation, c'est la diminution d'interaction entre les EC (séparation intercellulaire), ce qui a comme conséquences la mort des EC à cause des pores provoquées par les toxines ou bien l'activation de la voie Hippo (qui perçoit les changements d'adhésion intercellulaire (Gaspar & Tapon, 2014) dans les EC qui aboutit à son tour à leur apoptose. De cette manière, les toxines traversent l'épithélium et interagissent avec les jonctions adhérentes qui se trouvent entre les ISC et les progéniteurs sur la face basale de l'épithélium intestinale (Fig.18). (2) Dans la deuxième hypothèse, suite à l'absorption des toxines Cry à l'instar des autres nutriments par les EC, le processus de transcytose permet aux toxines de passer dans l'hémolymphe et de se fixer ensuite sur les jonctions adhérentes entre ISC et progéniteurs (Fig.19). (3) La troisième hypothèse c'est que la fixation des toxines Cry sur des

cadhérines (pas obligatoirement la DE-cadhérine) localisées sur les EC, soit internalisées par endocytose par les EC, ensuite passent dans l'hémolymphe, et agissent ensuite sur les jonctions adhérentes entre les ISC et progéniteurs (Fig.20).

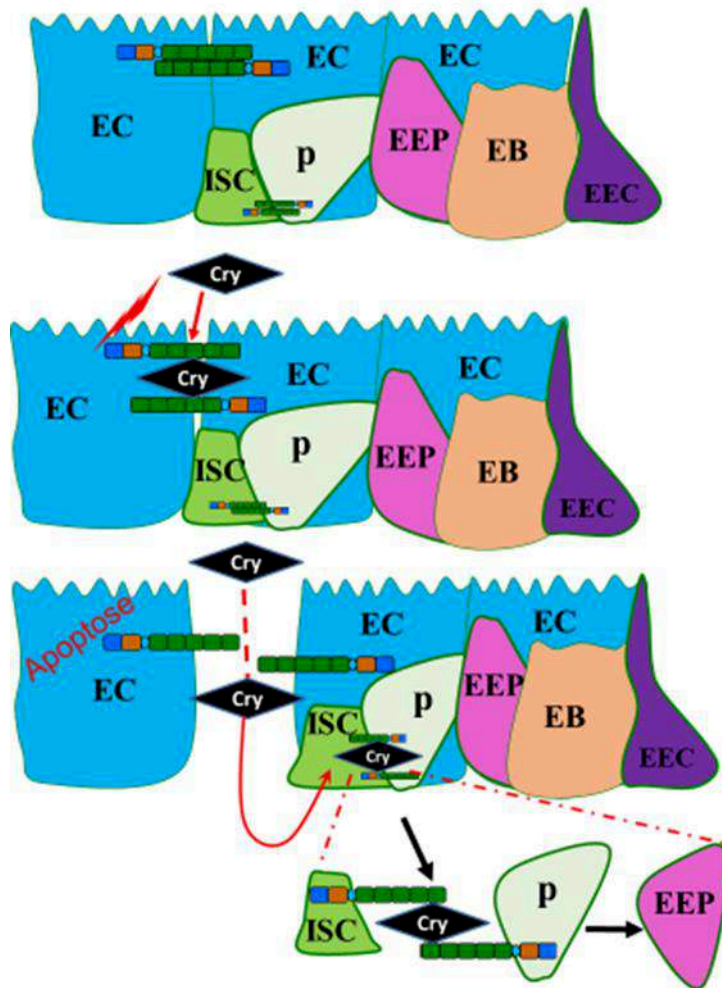


Figure 18: Toxine Cry et jonction adhérentes (Hypothèse 1).

La fixation de la toxine Cry sur les jonctions adhérentes (EC-EC), provoquent une séparation intercellulaire, l'apoptose des EC et une diminution du contact ISC-progéniteur(P).

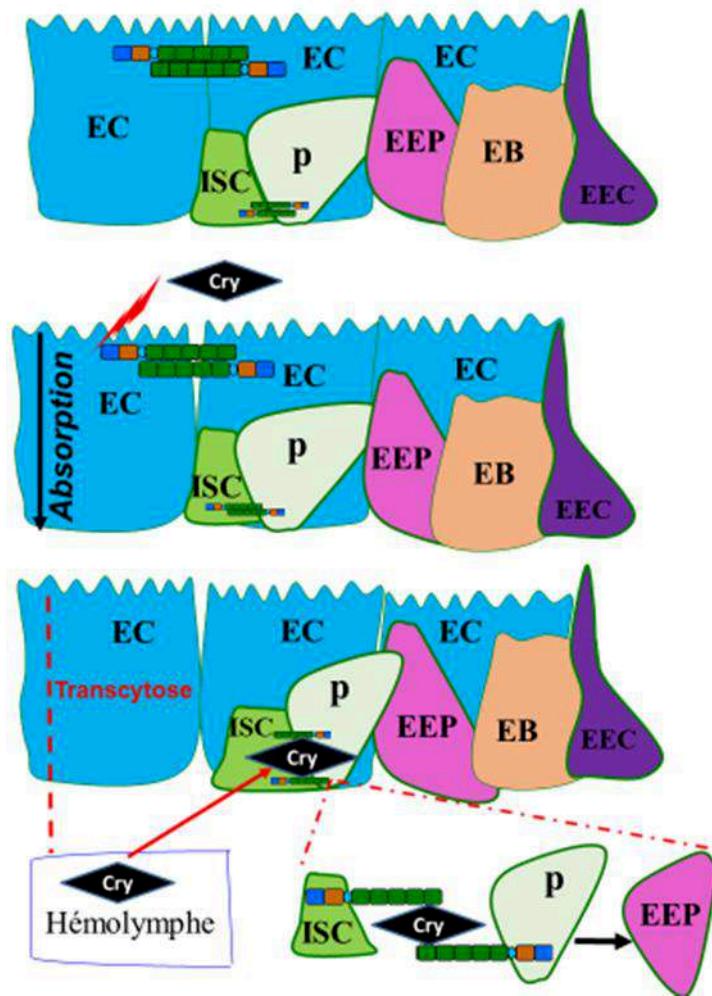


Figure 19: Toxine Cry et jonction adhérentes (Hypothèse2).

L'absorption de la toxine Cry par les EC, elle subit une transcytose, une libération de Cry dans l'hémolymphe qui agirait ensuite directement sur les jonctions adhérentes (ISC-P).

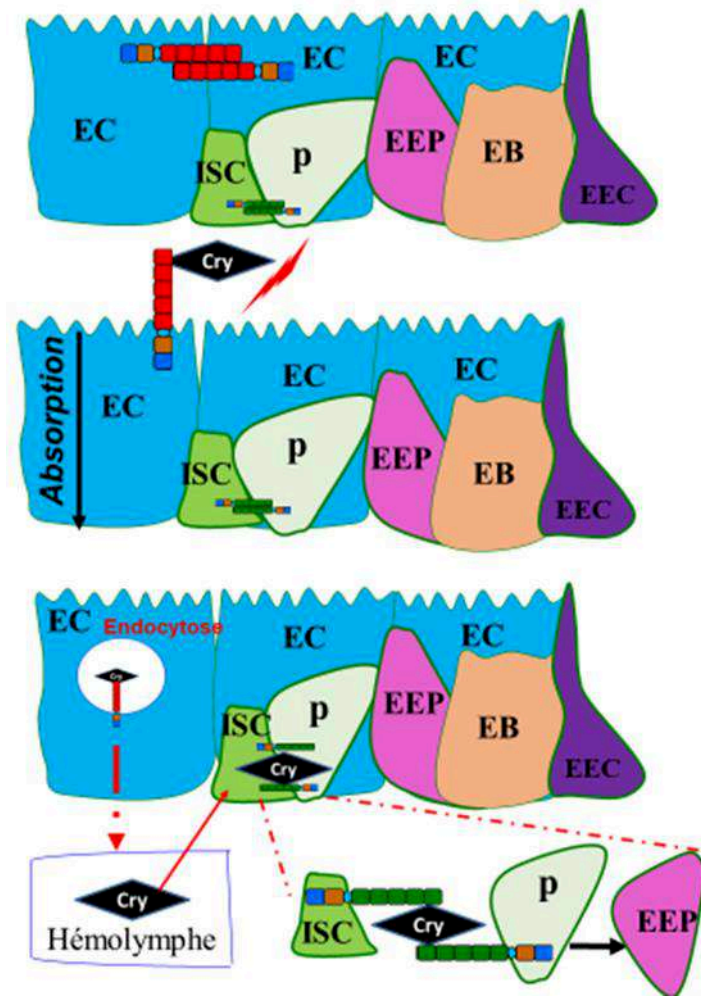


Figure 20: Toxine Cry et jonction adhérentes (Hypothèse3).

La fixation de la toxine Cry sur les jonctions adhérentes (EC-EC), une endocytose de la (cadhérine et Cry) par les EC, une libération de Cry dans l'hémolymph qui agirait ensuite directement sur les jonctions adhérentes (ISC-P).

Enfin, Rihab a montré en 2017 (Loudhaief et al.,2017), au sein de mon équipe, que l'ingestion de faible quantité de *Btk* végétative, induisait une diminution de l'activité digestive. Il apparaît nécessaire d'étudier l'impact des spores de *Btk* et des toxines Cry sur les grandes fonctions métaboliques ou comportementales des mouches. Nous pourrions par exemple faire des dosages métaboliques des lipides et des sucres circulants et stockés, des mesures de prise/perte de poids des drosophiles et des mesures de longévité/survie. En effet, il a été déjà montré par Rihab que l'ingestion répétée de *Btk* végétatif réduisait la longévité des drosophiles (Loudhaief et al.,2017). En plus de ses effets sur les drosophiles adultes, les résultats récents de mon équipe montrent que les larves de drosophile élevées en continu sur un milieu traité par des bioinsecticides *Btk* présentent une réduction significative de taille et un retard de développement. Fait intéressant, aucune mortalité, ni retard de développement et ni réduction de taille est observé post-ingestion de *Btk* Cry- ou de cristaux de toxines Cry. L'ensemble de ces données montrent donc que les effets constatés sur le développement et la croissance dépendent d'une synergie entre la bactérie *Btk* et les toxines Cry (Nawrot-Esposito et al., 2020). En plus ils ont aussi montré toujours chez la larve que les produits *Btk* induisaient la mort d'entérocytes et un défaut du métabolisme protéique et lipidique (le métabolisme glucidique n'est pas affecté) (Nawrot-Esposito et al., 2020). Ils ont aussi montré que ces impacts de Dipel ne concernent pas que l'espèce *Drosophila melanogaster* mais sont conservés parmi de nombreuses espèces de drosophiles (par exemple *D. hydei*, *D. yakuba*, *D. suzukii*) (Babin et al., 2020). Il est important de noter que nous avons utilisé un bioinsecticide *Btk* vendu pour cibler spécifiquement les larves de lépidoptères. La surprise est que ce bioinsecticide n'affecte pas seulement les larves ciblées mais il a un effet marquant sur les larves et les adultes d'organismes non cibles appartenant à l'ordre des Diptères. Nos données remettent donc en cause la notion de "spécificité" d'action des bioinsecticides *Btk* contre les ravageurs. Bien que la dose létale pour les larves de drosophile est supérieure à la dose létale pour tuer les larves de lépidoptères (Babin et al., 2020), nos travaux montrent que des doses tuant les larves de lépidoptères affectent la physiologie d'autres insectes. De plus, cela n'exclue pas la possibilité d'atteindre des doses bien supérieures lors de traitements multiples/répétés ou d'erreurs commises par les utilisateurs. De plus il faut considérer que les spores de *Btk*, la forme utilisée en bioinsecticide pour ses capacités de résistance et de persistance (Setlow, 2014), persistent plus d'un an dans le sol, et qu'elles vont donc s'accumuler au fil des années de traitement.

Mes résultats montrent que la souche bioinsecticide *Btk* (produisant cinq toxines Cry et vendue sous les appellations commerciales Dipel et Delfin) a des effets non intentionnels sur la mouche

(espèce non cible) en affectant l'homéostasie cellulaire intestinale. Les EEC sécrètent de nombreuses hormones, neuropeptides et facteurs de croissances essentiels pour réguler la physiologie intestinale dont certains sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie cellulaire intestinales en régulant la prolifération des ISC (Amcheslavsky et al., 2014 ; Scopelliti et al., 2014). Pour cela il faut étudier les effets physiologiques liés à l'augmentation du nombre d'EEC induite par les toxines Cry. On pourrait identifier par RT-qPCR le niveau d'expression des gènes codant pour les 10 peptides entéroendocrines (Ast-A, Ast-B (MIP), Ast-C, Bursicon alpha, CCHamide1, CCHamide2, DH31, NPF, Orcokinine B et Tachykinine) (Scopelliti et al., 2014) et les facteurs de croissances (des ligands EGF, des Insuline Growth Factor, Hedgehog, des ligands BMP...) exprimés par les EEC chez la drosophile en absence et en présence de bioinsecticide *Btk*. Ensuite pour valider les candidats identifiés par RT-qPCR, on pourra surexprimer spécifiquement dans les EEC les gènes candidats (génotype : *voilà-Gal4, tub-Gal80^{ts}, UAS-gène.candidat*). Cette approche nous permettra de savoir quels sont les grandes fonctions physiologiques, métaboliques ou comportementales potentiellement dérégulées par *Btk*. L'augmentation du nombre d'EEC peut aussi avoir des conséquences délétères (1) sur la prolifération des ISC et la différenciation des progéniteurs sur le long terme et (2) sur le maintien de l'homéostasie cellulaire intestinale surtout chez des individus prédisposés à développer des tumeurs ou ayant déjà des tumeurs. La production d'une quantité plus importante de facteurs de croissance pourrait accélérer le développement ou l'aggravation de la maladie car elle va se surimposer au processus de renouvellement cellulaire induit par la présence de *Btk* (bactéries opportunistes) et qui déclenche déjà une accélération de la division des ISC (induisant inflammation et prolifération des cellules souches). Il est en effet maintenant reconnu chez les mammifères, mais aussi chez les invertébrés, que la présence de bactéries non commensales (dites allochtones) dans l'intestin peut être à l'origine d'un état pro-inflammatoire, pouvant aboutir au développement de maladies inflammatoires intestinales chroniques de type Crohn ou colite ulcéreuse, et pouvant même dans certains cas dégénérer en cancers. Il faut aussi considérer le fait que les toxines Cry interfèrent avec l'adhésion intercellulaire, potentiel facteur aggravant des processus métastatiques. Cette présence accrue de *Btk* dans l'alimentation sous-entend que les consommateurs vont ingérer de manière régulière (chronique) cette bactérie et ses toxines, bien que sans doute à faibles doses

Puisque les mécanismes physiologiques et génétiques régissant les grandes fonctions intestinales sont bien conservés chez la drosophile, les invertébrés en général et les vertébrés (dont l'homme), on a choisi la drosophile comme système model pour comprendre où, quand et comment les toxines agissent au niveau du tube digestif. Les résultats obtenus chez la

drosophile permettront d'aborder plus rapidement et plus efficacement les effets des bioinsecticides *Btk* chez d'autres organismes comme la souris par exemple. A terme, ceci permettra d'anticiper les problèmes putatifs environnementaux et de santé liés à l'utilisation accrue des bioinsecticides *Btk* en agriculture et en sylviculture.

3.3 Pourquoi les bioinsecticides *Btk* tuent-ils les insectes cibles sans effets létaux sur les organismes non-cible ??

Les Cristaux produits par *Bt* sont les insecticides biologiques les plus utilisés dans l'agriculture pour tuer les ravageurs de cultures. Cependant, les cristaux sont constitués de protoxines Cry (Mendoza-Almanza et al., 2020). Une fois ingérés par les larves d'insectes cibles, les cristaux de *Bt* vont subir plusieurs étapes indispensables à leur activité toxique. En effet, pour devenir biologiquement actifs, ces cristaux doivent être solubilisés par le **pH alcalin** de l'intestin de l'insecte, ce qui provoque la destruction des ponts disulfures intermoléculaires et la libération des protoxines dans la lumière intestinale (Schnepf et al.,1998). Une fois solubilisées, les protoxines seront clivées grâce aux protéases intestinales qui sont généralement de type trypsine ou chymotrypsine, pour donner naissance à la toxine active résistante de taille 60-70 kDa. Ensuite les toxines Cry actives peuvent se lier à leurs récepteurs présents uniquement dans l'intestin moyen des larves de lépidoptères (Mendoza-Almanza et al., 2020). Ainsi, la spécificité d'action des Cry en termes de toxicité aiguë semble à la fois liée au **pH**, à la **présence de protéases digestives et à des récepteurs spécifiques à la surface de l'épithélium intestinal**. **La question qui se pose est : les éléments nécessaires pour l'activité létale de ce bioinsecticide chez les insectes cibles sont-ils présents chez les organismes non cibles ?**

3.3.1 Dissolution des Cristaux et activation des protoxines

les scientifiques ont démontré que le pH de l'intestin moyen des larves de drosophile couvre une large gamme, commençant par un segment antérieur relativement neutre ($\text{pH} > 7$ et < 8), puis un segment médian acide ($\text{pH} < 3$), suivi d'un deuxième région neutre et enfin très alcaline dans la partie postérieure ($\text{pH} > 10$) (Shanbhag & Tripathi, 2009). Cet environnement d'intestin moyen semble donc convenir pour dissoudre les cristaux et activer les protoxines en toxines. Dans nos expériences, nous avons montré que dès 4h après l'ingestion de bioinsecticides *Btk* par les mouches adultes, la forme activée à 67 kDa des toxines Cry1A est présente (Jneid et al en préparation). Plus tard, une forme de 45 kDa est présente mettant en évidence le traitement complet des protoxines en toxines activées. Six jours après l'ingestion, plus de protoxines ou de

toxines ne sont détectables (Jneid et al en préparation). Nous avons ensuite nourri des mouches avec des cristaux purifiés de *Btk*, puis disséqué les intestins en séparant les parties antérieure et postérieure (lieu de l'excès d'EEP/EEC). Nous avons également effectué un fractionnement subcellulaire en séparant le cytoplasme et les membranes. Nous avons observé que les protoxines étaient déjà activées dans la partie antérieure de l'intestin moyen (forme à 67 kDa) mais n'étaient associées qu'à la membrane (Jneid et al en préparation). Dans l'intestin moyen postérieur, nous avons détecté la forme à 45kDa des toxines Cry1A entièrement activées. Cette forme est associée aux membranes. De plus, la forme à 67kDa des toxines Cry1A activées est également présente dans le cytoplasme suggérant une internalisation par les cellules épithéliales. Nos données suggèrent donc que les cristaux contenant des protoxines Cry sont maturées le long de l'intestin moyen pour générer des toxines Cry1A entièrement activées dans l'intestin moyen postérieur. D'après ces résultats nous pouvons conclure que l'intestin des organismes non cibles est aussi un milieu favorable à l'activation des toxines Cry1A qui seront capables par la suite d'avoir des effets non-intentionnels. Cependant, pour tuer les insectes par septicémie la fixation des toxines Cry sur les récepteurs spécifiques est indispensable. Ceux-ci sont-ils présents chez les organismes non cibles ?

3.3.2 Notion de récepteurs spécifiques

Les spores de *Bt* subsp. *Kurstaki* (*Btk*) sont utilisés pour tuer spécifiquement les larves de lépidoptères qui menacent les cultures. En effet, le cocktail de toxines Cry produit par *Btk* (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa et Cry2Ab (Caballero et al., 2020) se lie à différents récepteurs présents dans l'intestin moyen. Pour les toxines Cry1A, au moins 4 types de récepteurs ont été décrits dans l'intestin des larves cibles : (1) la protéine de type cadhérine (appelée CaLP chez *Manduca sexta* et BT-R1 en général chez les lépidoptères). Ce fut le premier récepteur de Cry1Ac identifié chez les lépidoptères (Stevens et al., 2017) (2) la phosphatase alcaline (ALP) (Stevens et al., 2017), (3) l'aminopeptidase (APN) (Stevens et al., 2017) (4) le transporteur ABCC2. Chez les insectes cibles quel que soit le mode d'action (modèle de « Bravo » ou de « signalisation »), l'interaction **toxine – cadhérine** est considérée comme une étape essentielle pour exercer l'activité insecticide, les autres récepteurs semblent expliquer la cytotoxicité spécifique exercée par les Cry envers les organismes cibles (Mendoza-Almanza et al., 2020).

Il est à noter que les cadhérines sont très conservées chez les métazoaires. Par exemple chez la drosophile il existe 17 protéines de la famille des cadhérines (Hill et al., 2001). Une analyse de l'alignement des séquences des sites de fixation de la toxine Cry1Ab sur le récepteur cadhérine

BT-R1 chez deux lépidoptères cibles, *Manduca sexta* et *Chrysomela tremula*, montre une identité de 20.2% entre les domaines des deux espèces cibles alors qu'ils présentent plus de 25% d'identité avec les cadhérines FAT de la drosophile ou de l'homme (deux espèces non cibles) et plus de 30% avec la Cad88C de drosophile. Ces résultats renforcent l'hypothèse de la fixation possible des toxines Cry sur des cadhérines intestinales de la drosophile.

Nous pouvons donc imaginer que les bioinsecticides *Btk* (constitués de spores et de cristaux contenant des protoxines Cry1 et Cry2) n'induisent pas de létalité des organismes non cibles après ingestion aux doses agricoles car premièrement, dans mes expériences nous avons remarqué que la quantité d'EC morts est faible et que de nouveaux EC apparaissent et semblent suffisant pour maintenir la fonction de barrière de l'intestin. Deuxièmement, il semble que les récepteurs responsables de la toxicité chez les organismes cibles soient absent de l'intestin de drosophile (Gill & Ellar, 2002 ; Stevens et al., 2017). Ces bioinsecticides tueraient seulement les organismes cibles car les toxines Cry induisent la mort d'un grand nombre d'EC (grâce ou à cause de la présence de récepteurs spécifiques) et la régénération de l'intestin n'est pas suffisante pour remplacer toutes les cellules mortes. Ainsi, la barrière intestinale est rompue et les bactéries et/ou spores passent dans la cavité interne et provoque une septicémie. J'ai observé chez la drosophile que les cristaux de toxine Cry induise une modification du devenir cellulaire des progéniteurs (EEC à la place de EC). Chez les organismes cibles le même phénomène pourrait se dérouler s'ajoutant au déficit de production de nouveaux EC pour remplacer les dégâts causés par les toxines Cry. Cependant, l'augmentation de la quantité de bioinsecticides *Btk* fournie aux larves de drosophile conduit finalement à leur mort (Babin et al., 2020), suggérant que la nocivité des bioinsecticides *Btk* repose à la fois sur les quantités de *Btk* ingérées et sur l'affinité des toxines Cry pour des récepteurs plus ou moins spécifiques. (Fig. 21).

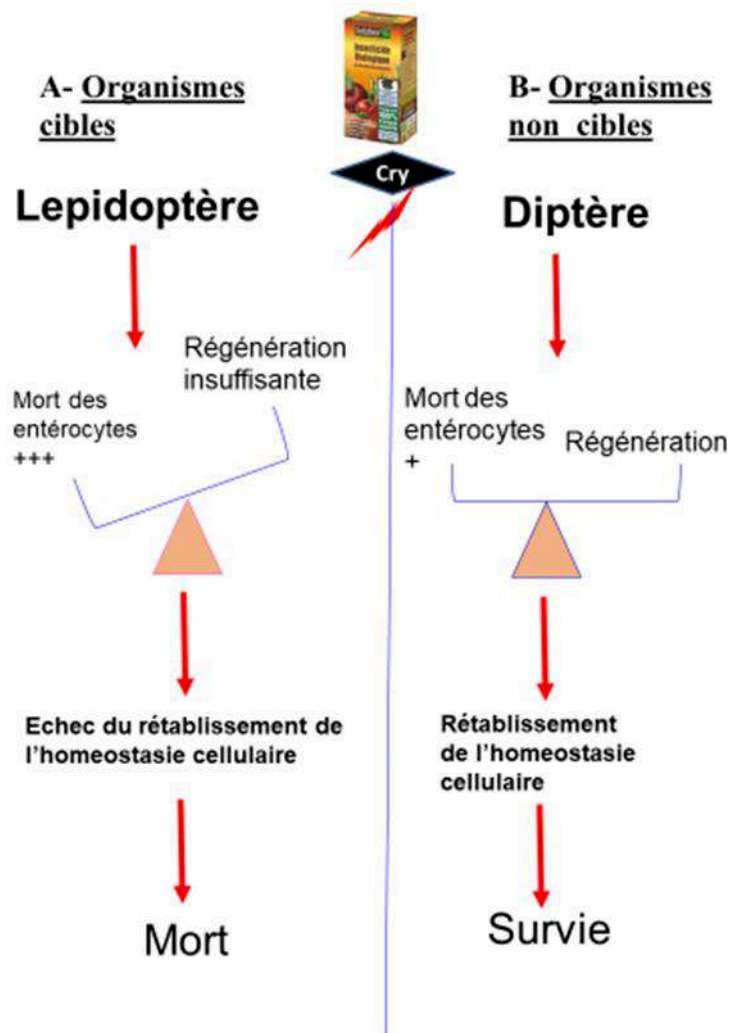


Figure 21: Schéma résumant les conséquences d'une intoxication par des toxines Cry sur l'homéostasie cellulaire intestinale.

A- L'intoxication des lépidoptères par le bioinsecticide *Btk* (Cry) induit une forte apoptose des entérocytes. L'accélération de la prolifération des ISC n'est pas suffisante pour assurer un remplacement des EC mourants. Ceci provoque un échec du rétablissement de l'homéostasie intestinale (régénération faible). B- L'intoxication des drosophiles (organismes non cibles) induit une faible apoptose des EC. La régénération cellulaire est suffisante pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale.

Chapitre 2 : Conclusion

A l'heure actuelle, nous n'avons pas d'informations certaines sur les effets indésirables de l'utilisation des produits *Bt* en agriculture sur l'environnement et la santé. Il est vrai que les doses actuelles retrouvées dans l'environnement sont encore faibles mais l'utilisation des biopesticides va croître suite aux changements de pratiques agricoles qui sont en cours. De plus, la résistance des spores de *Btk* aux conditions environnementales extrêmes fait qu'elles vont s'accumuler au fil des années de traitement dans l'environnement.

Il est donc indispensable de prévenir leurs effets indésirables éventuels sur le long terme pour éviter de revivre les déboires dus aux pesticides chimiques. Nombreux sont les individus qui seront exposés à ces bioinsecticides, parmi eux les professionnels (en agriculture et sylviculture) et les jardiniers amateurs utilisant les produits concernés, ainsi que toutes les espèces présentes dans les zones d'épandage. Ne négligeons pas non plus l'ingestion par l'homme d'aliments traités par les bioinsecticides *Bt*. Bien que la consommation d'aliments traités par *Bt* soit en augmentation continue, l'implication de ces produits dans la survenue d'intoxications alimentaires reste sporadique jusqu'à l'heure actuelle.

Cependant, si l'on a une vision à moyen terme, évaluer les risques liés à l'exposition aux produits *Bt* pour la santé et l'environnement est une nécessité majeure. Le but essentiel réside dans la hiérarchisation des mesures de gestion et de protection des utilisateurs et l'amélioration des conditions d'utilisation des produits *Bt* afin de pouvoir limiter leur ingestion, leur accumulation dans l'environnement et leurs effets indésirables sur la biodiversité. Les informations obtenues auront aussi un grand intérêt pour la mise en place de systèmes de surveillance dans les chaînes alimentaires.

En se basant sur tous les résultats résumés ci-dessus, prenant en considération que développement, immunité, homéostasie tissulaire et pathologies (tels les malformations développementales, les neuropathologies, les cancers...) sont fonctionnellement liés, et sachant que les mécanismes physiologiques fondamentaux sont conservés entre la drosophile, les invertébrés et les vertébrés (dont l'homme), comprendre dans quel lieu, à quel moment et de quelle manière les toxines Cry agissent au niveau du tube digestif est primordial. Toutes ces données fondamentales nous aideront à mieux prévenir les problèmes sanitaires et environnementaux putatifs liés à l'utilisation accrue des bioinsecticides *Bt*. Les études effectuées sur d'autres espèces d'intérêt agronomique, écosystémique ou clinique comme,

l'abeille (un auxiliaire de cultures), la coccinelle (un prédateur), la souris (un modèle mammifère), le porc (physiologiquement proche de l'homme...), garantissent la définition des espèces et populations à risques pouvant être touchés par l'ingestion de tels bioinsecticides et toxines. L'adaptation des traitements phytosanitaires en amont pour réduire tant que possible les risques et éviter les effets dommageables éventuels sur les deux niveaux écologique et sanitaire est une grande responsabilité. Finalement il est important de souligner que les toxines Cry de *Btk* sont aussi utilisés dans les OGM. Les effets que j'ai observé avec les toxines Cry issues de bioinsecticides peuvent être similaire avec les toxines Cry provenant des OGM. Il est donc très important de faire attention aux aliments que nous consommons !!

Notre santé est sacrée et qui jouit d'une bonne sante possède un trésor. Respectons notre environnement et toutes les règles de sécurité afin de diminuer les risques.

Références bibliographiques

- Adang, M., & Crickmore, N. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism. In *Insect Midgut and Insecticidal Proteins* (Vol. 47).
https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=E2ZzAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA39&dq=Cry1Ab+mammalian+OR+human&ots=VZzaEGrITe&sig=YwEfEubWCH44E_TQX_sotRao6bE
- Aerne, B. L., Gailite, I., Sims, D., & Tapon, N. (2015). Hippo stabilises its adaptor Salvador by antagonising the HECT ubiquitin ligase Herc4. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131113>
- Agaisse, H., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, *177*(21), 6027–6032.
<https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6027-6032.1995>
- Agaisse, Hervé, Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevo, B., & Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Developmental Cell*, *5*(3), 441–450. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00244-2)
- Alizadeh, H., Castro, G. A., & Weems, W. A. (1987). Intrinsic jejunal propulsion in the guinea pig during parasitism with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*, *93*(4), 784–790.
[https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90441-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90441-0)
- Amcheslavsky, A., Jiang, J., & Ip, Y. T. (2009). Tissue Damage-Induced Intestinal Stem Cell Division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*, *4*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.016>
- Amcheslavsky, A., Song, W., Li, Q., Nie, Y., Bragatto, I., Ferrandon, D., Perrimon, N., & Ip, Y. T. (2014). Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell Reports*, *9*(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.052>
- Apidianakis, Y., Pitsouli, C., Perrimon, N., & Rahme, L. (2009). Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(49), 20883–20888.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0911797106>
- Apidianakis, Y., & Rahme, L. G. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *4*(1), 21–30.
<https://doi.org/10.1242/dmm.003970>
- Asahina, K., Watanabe, K., Duistermars, B. J., Hoopfer, E., González, C. R., Eyjólfsson, E. A., Perona, P., & Anderson, D. J. (2014). Tachykinin-expressing neurons control male-specific aggressive arousal in *Drosophila*. *Cell*, *156*(1–2), 221–235. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.045>
- Athineos, D., & Sansom, O. J. (2010). Myc heterozygosity attenuates the phenotypes of APC deficiency in the small intestine. *Oncogene*, *29*(17), 2585–2590.
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.5>
- Babin, A., Nawrot-Esposito, M. P., Gallet, A., Gatti, J. L., & Poirié, M. (2020). Differential side-effects of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide on non-target *Drosophila* flies. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73145-6>
- Bardin, A. J., Perdogoto, C. N., Southall, T. D., Brand, A. H., & Schweisguth, F. (2010). Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine. *Development*, *137*(5), 705–714.
<https://doi.org/10.1242/dev.039404>

- Barfod, K. K., Poulsen, S. S., Hammer, M., & Larsen, S. T. (2010). Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to *Bacillus thuringiensis* biopesticides in mice. *BMC Microbiology*, *10*, 7–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-233>
- Barker, N., Van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, *449*(7165), 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., Van den Born, M. M. W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., Van de Wetering, M., Pawson, T., & Clevers, H. (2002). β -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell*, *111*(2), 251–263. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01015-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01015-2)
- Beebe, K., Lee, W. C., & Micchelli, C. A. (2010). JAK/STAT signaling coordinates stem cell proliferation and multilineage differentiation in the *Drosophila* intestinal stem cell lineage. *Developmental Biology*, *338*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.045>
- Beebe, K., Park, D., Taghert, P. H., & Micchelli, C. A. (2015). The *Drosophila* prosecretory transcription factor dimmed is dynamically regulated in adult enteroendocrine cells and protects against Gram-negative infection. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *5*(7), 1517–1524. <https://doi.org/10.1534/g3.115.019117>
- Beehler-Evans, R., & Micchelli, C. A. (2015). Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development (Cambridge)*, *142*(4), 654–664. <https://doi.org/10.1242/dev.114959>
- Benemei, S., Fusi, C., Trevisan, G., & Geppetti, P. (2014). The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *British Journal of Pharmacology*, *171*(10), 2552–2567. <https://doi.org/10.1111/bph.12512>
- Benguettat, O., Jneid, R., Soltys, J., Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Osman, D., & Gallet, A. (2018). The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *PLoS Pathogens*, *14*(9), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279>
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., & Garbowska, M. (2015). The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microbial Pathogenesis*, *82*, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.03.015>
- Bewick, G. A. (2012). Bowels control brain: Gut hormones and obesity. *Biochimica Medica*, *22*(3), 283–297. <https://doi.org/10.11613/bm.2012.032>
- Binari, R., & Perrimon, N. (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes and Development*, *8*(3), 300–312. <https://doi.org/10.1101/gad.8.3.300>
- Biteau, B., & Jasper, H. (2011). EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development*, *138*(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1242/dev.056671>
- Biteau, B., & Jasper, H. (2014). Slit/Robo Signaling Regulates Cell Fate Decisions in the Intestinal Stem Cell Lineage of *Drosophila*. *Cell Reports*, *7*(6), 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.024>
- Bizzarri, M. F., & Bishop, A. H. (2008). The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: Colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microbial Ecology*, *56*(1), 133–139. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9331-1>

- Bøhn, T., Rover, C. M., & Semenchuk, P. R. (2016). *Daphnia magna* negatively affected by chronic exposure to purified Cry-toxins. *Food and Chemical Toxicology*, *91*, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.009>
- Bonfini, A., Liu, X., & Buchon, N. (2016). From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Developmental and Comparative Immunology*, *64*, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.008>
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S., & Soberón, M. (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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>
- Bravo, Alejandra, Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, *49*(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bravo, Alejandra, Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, *6*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x>
- Bravo, Alejandra, Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(7), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Chakrabarti, S., & Lemaître, B. (2009). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes and Development*, *23*(19), 2333–2344. <https://doi.org/10.1101/gad.1827009>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Kuraishi, T., & Lemaître, B. (2010). *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-152>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaître, B. (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host and Microbe*, *5*(2), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Buchon, N., Osman, D., David, F. P. A., Yu Fang, H., Boquete, J. P., Deplancke, B., & Lemaître, B. (2013). Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Reports*, *3*(5), 1725–1738. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.001>
- Buczacki, S. J. A., Zecchini, H. I., Nicholson, A. M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., & Winton, D. J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Igr5. *Nature*, *495*(7439), 65–69. <https://doi.org/10.1038/nature11965>
- Caballero, J., Jiménez-Moreno, N., Orera, I., Williams, T., Fernández, A. B., Villanueva, M., Ferré, J., Caballero, P., & Ancín-Azpilicueta, C. (2020). Unraveling the composition of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis*: A proteomics approach. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(12), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00476-20>
- Capo, F., Charroux, B., & Royet, J. (2016). Bacteria sensing mechanisms in *Drosophila* gut: Local and systemic consequences. *Developmental and Comparative Immunology*, *64*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.001>

- Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S., & Koziel, M. G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(11), 3057–3061. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3057-3061.1991>
- Casida, J. E., & Bryant, R. J. (2017). The ABCs of pesticide toxicology: Amounts, biology, and chemistry. *Toxicology Research*, *6*(6), 755–763. <https://doi.org/10.1039/c7tx00198c>
- Celandroni, F., Salvetti, S., Senesi, S., & Ghelardi, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* membrane-damaging toxins acting on mammalian cells. *FEMS Microbiology Letters*, *361*(2), 95–103. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12615>
- Chattopadhyay, P., & Banerjee, G. (2018). Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. *3 Biotech*, *8*(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1223-1>
- Chen, Jiangtian, Reiher, W., Hermann-Luibl, C., Sellami, A., Cognigni, P., Kondo, S., Helfrich-Förster, C., Veenstra, J. A., & Wegener, C. (2016). Allatostatin A Signalling in *Drosophila* Regulates Feeding and Sleep and Is Modulated by PDF. *PLoS Genetics*, *12*(9), 1–33. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006346>
- Chen, Jun, Xu, N., Wang, C., Huang, P., Huang, H., Jin, Z., Yu, Z., Cai, T., Jiao, R., & Xi, R. (2018). Transient Scute activation via a self-stimulatory loop directs enteroendocrine cell pair specification from self-renewing intestinal stem cells. *Nature Cell Biology*, *20*(2), 152–161. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0020-0>
- Choi, N. H., Kim, J. G., Yang, D. J., Kim, Y. S., & Yoo, M. A. (2008). Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell*, *7*(3), 318–334. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00380.x>
- Choi, N. H., Lucchetta, E., & Ohlstein, B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(46), 18702–18707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109348108>
- Choma, C. T., & Kaplan, H. (1990). Folding and Unfolding of the Protoxin from *Bacillus thuringiensis*: Evidence That the Toxic Moiety Is Present in an Active Conformation. *Biochemistry*, *29*(49), 10971–10977. <https://doi.org/10.1021/bi00501a015>
- Chougule, N. P., Li, H., Liu, S., Linz, L. B., Narva, K. E., Meade, T., & Bonning, B. C. (2013). Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(21), 8465–8470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222144110>
- Chung, B. Y., Ro, J., Hutter, S. A., Miller, K. M., Guduguntla, L. S., Kondo, S., & Pletcher, S. D. (2017). *Drosophila* Neuropeptide F Signaling Independently Regulates Feeding and Sleep-Wake Behavior. *Cell Reports*, *19*(12), 2441–2450. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.085>
- Cordero, J. B., Stefanatos, R. K., Scopelliti, A., Vidal, M., & Sansom, O. J. (2012). Inducible progenitor-derived Wingless regulates adult midgut regeneration in *Drosophila*. *EMBO Journal*, *31*(19), 3901–3917. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.248>
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., & Dean, D. H. (1998). Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(3), 807–813.

<https://doi.org/10.1128/membr.62.3.807-813.1998>

- Crickmore, Neil, Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., & Bonning, B. C. (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, *May*, 107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J. and Jorgensen, K. (1996). Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett Appl Microbiol.* *23*, 146-50. (1996). 1996.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, *17*(4), 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F. F., Anders, R. A., Maitra, A., & Pan, D. (2007). Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals. *Cell*, *130*(6), 1120–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.019>
- Donlea, J. M., Alam, M. N., & Szymusiak, R. (2017). Neuronal substrates of sleep homeostasis; lessons from flies, rats and mice. *Current Opinion in Neurobiology*, *44*, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.003>
- Du, E. J., Ahn, T. J., Kwon, I., Lee, J. H., Park, J. H., Park, S. H., Kang, T. M., Cho, H., Kim, T. J., Kim, H. W., Jun, Y., Lee, H. J., Lee, Y. S., Kwon, J. Y., & Kang, K. J. (2016). TrpA1 Regulates Defecation of Food-Borne Pathogens under the Control of the Duox Pathway. *PLoS Genetics*, *12*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005773>
- Dubreuil, R. R. (2004). Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *36*(5), 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.07.004>
- Dutta, D., Dobson, A. J., Houtz, P. L., Gläßer, C., Revah, J., Korzelius, J., Patel, P. H., Edgar, B. A., & Buchon, N. (2015). Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult *Drosophila* Midgut. *Cell Reports*, *12*(2), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.009>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*, *7*(3), 1–35. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
- Farhan, A., Gulati, J., Groe-Wilde, E., Vogel, H., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2013). The CCHamide 1 receptor modulates sensory perception and olfactory behavior in starved *Drosophila*. *Scientific Reports*, *3*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep02765>
- Farré, R., & Tack, J. (2013). Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: Physiological aspects. *American Journal of Gastroenterology*, *108*(5), 698–706. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.24>
- Feng, X. H., & Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in TGF- β signaling through smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*, 659–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018>
- Finch, A. J., Soucek, L., Junttila, M. R., Swigart, L. B., & Evan, G. I. (2009). Acute Overexpression of Myc in Intestinal Epithelium Recapitulates Some but Not All the Changes Elicited by Wnt/ β -Catenin Pathway Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(19), 5306–5315. <https://doi.org/10.1128/mcb.01745-08>

- Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A. and Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus*: Springer International Publishing. (2017). 2017.
- Frankenhuyzen, K. van. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044), 964–968. <https://doi.org/10.1038/nature03589>
- Fujiwara, Y., Hermann-Luibl, C., Katsura, M., Sekiguchi, M., Ida, T., Helfrich-Förster, C., & Yoshii, T. (2018). The CCHamide1 neuropeptide expressed in the anterior dorsal neuron 1 conveys a circadian signal to the ventral lateral neurons in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 9(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01276>
- Furness, J. B., Rivera, L. R., Cho, H. J., Bravo, D. M., & Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(12), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180>
- Gaspar, P., & Tapon, N. (2014). Sensing the local environment: Actin architecture and Hippo signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 31, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.003>
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Fiscarelli, E., & Senesi, S. (2007). *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microbes and Infection*, 9(5), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.001>
- Gilbert, M. M., Weaver, B. K., Gergen, J. P., & Reich, N. C. (2005). A novel functional activator of the *Drosophila* JAK/STAT pathway, unpaired2, is revealed by an in vivo reporter of pathway activation. *Mechanisms of Development*, 122(7–8), 939–948. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.03.004>
- Gill, M., & Ellar, D. (2002). Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Molecular Biology*, 11(6), 619–625. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00373.x>
- Glare, T. R, O’Callaghan, M. (2000) “*Bacillus thuringiensis: Biology, ecology and safety*” Chichester; New York: John Wiley, U.S.A., pp. 2-80. (2000). 2000.
- Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A., & Soberón, M. (2003). Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry*, 42(35), 10482–10489. <https://doi.org/10.1021/bi034440p>
- Gómez, I., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2001). Mapping the Epitope in Cadherin-like Receptors Involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxin Interaction Using Phage Display. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 28906–28912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103007200>
- Goulas, S., Conder, R., & Knoblich, J. A. (2012). The par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell*, 11(4), 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.017>
- Grisolia, C. K., Oliveira, R., Domingues, I., Oliveira-Filho, E. C., Monerat, R. G., & Soares, A. M. V. M. (2009). Genotoxic evaluation of different δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.017>

- Guevara, A., Gates, H., Urbina, B., & French, R. (2018). Developmental ethanol exposure causes reduced feeding and reveals a critical role for neuropeptide F in survival. *Frontiers in Physiology*, *9*(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00237>
- Guisoni, N., Martinez-Corral, R., Garcia-Ojalvo, J., & de Navascués, J. (2017). Diversity of fate outcomes in cell pairs under lateral inhibition. *Development (Cambridge)*, *144*(7), 1177–1186. <https://doi.org/10.1242/dev.137950>
- Guo, X., Yin, C., Yang, F., Zhang, Y., Huang, H., Wang, J., Deng, B., Cai, T., Rao, Y., & Xi, R. (2019). The Cellular Diversity and Transcription Factor Code of Drosophila Enteroendocrine Cells. *Cell Reports*, *29*(12), 4172–4185.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.048>
- Guo, Z., Driver, I., & Ohlstein, B. (2013). Injury-induced BMP signaling negatively regulates Drosophila midgut homeostasis. *Journal of Cell Biology*, *201*(6), 945–961. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302049>
- Guo, Z., & Ohlstein, B. (2015). Bidirectional Notch signaling regulates Drosophila intestinal stem cell multipotency. *Science*, *350*(6263), 927. <https://doi.org/10.1126/science.aab0988>
- Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, *55*, 593–608. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085450>
- Hardwick, J. C. H., Van Den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Ballester, I., Van Den Brande, J. M. H., Keller, J. J., Offerhaus, G. J. A., Van Deventer, S. J. H., & Peppelenbosch, M. P. (2004). Bone Morphogenetic Protein 2 Is Expressed by, and Acts Upon, Mature Epithelial Cells in the Colon. *Gastroenterology*, *126*(1 SUPPL. 1), 111–121. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.10.067>
- Harvey, K. F., Pflieger, C. M., & Hariharan, I. K. (2003). The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, *114*(4), 457–467. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00557-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00557-9)
- Hentze, J. L., Carlsson, M. A., Kondo, S., Nässel, D. R., & Rewitz, K. F. (2015). The neuropeptide allatostatin a regulates metabolism and feeding decisions in drosophila. *Scientific Reports*, *5*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep11680>
- Hill, E., Broadbent, I. D., Chothia, C., & Pettitt, J. (2001). Cadherin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology*, *305*(5), 1011–1024. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4361>
- HOFMANN, C., LÜTHY, P., HÜTTER, R., & PLISKA, V. (1988). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, *173*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13970.x>
- Hofte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus*. *Microbiological Reviews*, *53*(2), 242–255.
- Holland, P. W. H., Booth, H. A. F., & Bruford, E. A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology*, *5*, 1–28. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47>
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X., & Perrimon, N. (2002). The JAK/STAT pathway in model organisms: Emerging roles in cell movement. *Developmental Cell*, *3*(6), 765–778. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00376-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00376-3)
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., & Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila

- homolog of YAP. *Cell*, 122(3), 421–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.007>
- Hung et al (2016)-Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil differences between purified toxin and biopesticide formulation. (2016). 2016.
- Ignell, R., Root, C. M., Birse, R. T., Wang, J. W., Nässel, D. R., & Winther, Å. M. E. (2009). Presynaptic peptidergic modulation of olfactory receptor neurons in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 13070–13075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813004106>
- ISAA. (2017). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 years. *Isaaa, Brief 53*, 127.
- Jasper, H. (2020). Intestinal Stem Cell Aging: Origins and Interventions. *Annual Review of Physiology*, 82, 203–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034359>
- Jensen, G. B., Larsen, P., Jacobsen, B. L., Madsen, B., Smidt, L., & Andrup, L. (2002). *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4900–4905. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4900-4905.2002>
- Jiang, H., & Edgar, B. A. (2009). EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development*, 136(3), 483–493. <https://doi.org/10.1242/dev.026955>
- Jiang, H., Grenley, M. O., Bravo, M. J., Blumhagen, R. Z., & Edgar, B. A. (2011). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *drosophila*. *Cell Stem Cell*, 8(1), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.026>
- Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G., & Edgar, B. A. (2009). Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the *Drosophila* Midgut. *Cell*, 137(7), 1343–1355. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.014>
- Johler, S., Kalbhenn, E. M., Heini, N., Brodmann, P., Gautsch, S., Bagcioglu, M., Contzen, M., Stephan, R., & Ehling-Schulz, M. (2018). Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01915>
- Joly, A., & Rousset, R. (2020). Tissue adaptation to environmental cues by symmetric and asymmetric division modes of intestinal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176362>
- Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M., & Bryant, P. J. (1995). The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes and Development*, 9(5), 534–546. <https://doi.org/10.1101/gad.9.5.534>
- Kaelin, P., Morel, P., & Gadani, F. (1994). Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 19–25. <https://doi.org/10.1128/aem.60.1.19-25.1994>
- Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Verstreken, P., Hiesinger, P. R., Bellen, H. J., & Halder, G. (2002). Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development*, 129(24), 5719–5730. <https://doi.org/10.1242/dev.00168>
- Katanaev, V. L., Solis, G. P., Hausmann, G., Buestorf, S., Katanayeva, N., Schrock, Y., Stuermer, C. A. O., & Basler, K. (2008). Reggie-1/flotillin-2 promotes secretion of the long-range signalling forms of Wingless and Hedgehog in *Drosophila*. *EMBO Journal*, 27(3), 509–521.

<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601981>

- Kim, E. K., Lee, K. A., Hyeon, D. Y., Kyung, M., Jun, K. Y., Seo, S. H., Hwang, D., Kwon, Y., & Lee, W. J. (2020). Bacterial Nucleoside Catabolism Controls Quorum Sensing and Commensal-to-Pathogen Transition in the *Drosophila* Gut. *Cell Host and Microbe*, *27*(3), 345–357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.025>
- Kim, W. J., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2013). A PDF/NPF neuropeptide signaling circuitry of male *Drosophila melanogaster* controls rival-induced prolonged mating. *Neuron*, *80*(5), 1190–1205. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.034>
- Kim, Y. J., Žitňan, D., Galizia, C. G., Cho, K. H., & Adams, M. E. (2006). A Command Chemical Triggers an Innate Behavior by Sequential Activation of Multiple Peptidergic Ensembles. *Current Biology*, *16*(14), 1395–1407. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.027>
- King, D. G. (1988). Cellular organization and peritrophic membrane formation in the cardia (Proventriculus) of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, *196*(3), 253–282. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051960302>
- Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., & Kuo, C. J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(1), 266–271. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536800100>
- Kunst, M., Hughes, M. E., Raccuglia, D., Felix, M., Li, M., Barnett, G., Duah, J., & Nitabach, M. N. (2014). Calcitonin gene-related peptide neurons mediate sleep-specific circadian output in *Drosophila*. *Current Biology*, *24*(22), 2652–2664. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.077>
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., and Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2011). 15971.
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 15966–15971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105994108>
- Lai, Z. C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L. L., & Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, *120*(5), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.036>
- Lajeunesse, D. R., Johnson, B., Presnell, J. S., Catignas, K. K., & Zapotoczny, G. (2010). Peristalsis in the junction region of the *Drosophila* larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. *BMC Physiology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-14>
- Lee, K. A., Kim, B., Bhin, J., Kim, D. H., You, H., Kim, E. K., Kim, S. H., Ryu, J. H., Hwang, D., & Lee, W. J. (2015). Bacterial uracil modulates *drosophila* DUOX-dependent Gut immunity via hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell Host and Microbe*, *17*(2), 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.012>
- Lee, K. A., Kim, S. H., Kim, E. K., Ha, E. M., You, H., Kim, B., Kim, M. J., Kwon, Y., Ryu, J. H., & Lee, W. J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *drosophila*. *Cell*, *153*(4), 797–811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009>
- Lee, W. C., Beebe, K., Sudmeier, L., & Micchelli, C. A. (2009). Adenomatous polyposis coli regulates *Drosophila* intestinal stem cell proliferation. *Development*, *136*(13), 2255–2264. <https://doi.org/10.1242/dev.035196>

- Li, J., Carroll, J., & Ellart, D. J. (1990). 353815a0. 2(1978), 205–210.
- Lin, G., Xu, N., & Xi, R. (2010). Paracrine Unpaired signaling through the JAK/STAT pathway controls self-renewal and lineage differentiation of *Drosophila* intestinal stem cells. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(1), 37–49. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp028>
- Liu, L., D. Boyd, S., A. Bulla Jr, L., & D. Winkler, D. (2018). “The Defined Toxin-binding Region of the Cadherin G-protein Coupled Receptor, BT-R1, for the Active Cry1Ab Toxin of *Bacillus thuringiensis*.” *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 11(11), 201–210. <https://doi.org/10.4172/0974-276x.1000487>
- Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Benguetat, O., Nawrot-Esposito, M. P., Pauron, D., Amichot, M., & Gallet, A. (2017). Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the *Drosophila* midgut. *Development (Cambridge)*, 144(5), 808–819. <https://doi.org/10.1242/dev.142539>
- Lucchetta, E. M., & Ohlstein, B. (2017). Amitosis of Polyploid Cells Regenerates Functional Stem Cells in the *Drosophila* Intestine. *Cell Stem Cell*, 20(5), 609-620.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.012>
- Mace, O. J., Tehan, B., & Marshall, F. (2015). Pharmacology and physiology of gastrointestinal enteroendocrine cells. *Pharmacology Research and Perspectives*, 3(4), 1–26. <https://doi.org/10.1002/prp2.155>
- Maeda, K., Takemura, M., Umemori, M., & Adachi-Yamada, T. (2008). E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes to Cells*, 13(12), 1219–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01239.x>
- Marianes, A., & Spradling, A. C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *ELife*, 2013(2), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.00886>
- Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437–2442. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989>
- Mathur, D., Bost, A., Driver, L., & Ohlstein, B. (2010). A transient niche regulates the specification of *drosophila* intestinal stem cells. *Science*, 327(5962), 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1181958>
- McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Isaac-Renton, J. L., & Naseby, D. C. (2008). Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7451–7453. <https://doi.org/10.1128/AEM.01284-08>
- Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. *Toxins*, 12(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/toxins12050301>
- Micchelli, C. A., & Perrimon, N. (2006). Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*, 439(7075), 475–479. <https://doi.org/10.1038/nature04371>
- Miguel-Aliaga, I., Jasper, H., & Lemaitre, B. (2018). Anatomy and physiology of the digestive tract of *drosophila melanogaster*. *Genetics*, 210(2), 357–396. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300224>

- Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R. T., Zacco, A., Greenberg, B., & Ciaccio, P. J. (2004). Modulation of Notch processing by γ -secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicological Sciences*, *82*(1), 341–358. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh254>
- Milne, R., & Kaplan, H. (1993). Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *23*(6), 663–673. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(93\)90040-Y](https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90040-Y)
- Milner, R. J. (1994). History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *49*(1), 9–13. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90014-0)
- Min, S., Chae, H. S., Jang, Y. H., Choi, S., Lee, S., Jeong, Y. T., Jones, W. D., Moon, S. J., Kim, Y. J., & Chung, J. (2016). Identification of a peptidergic pathway critical to satiety responses in *Drosophila*. *Current Biology*, *26*(6), 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.029>
- Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *16*(3 SPEC. ISS.), 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.009>
- Moustakas, A., & Heldin, C. H. (2009). The regulation of TGF β signal transduction. *Development*, *136*(22), 3699–3714. <https://doi.org/10.1242/dev.030338>
- Mueller, U., & Gorst, J. (2012). Comment on “ Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada” by A. Aris and S. Leblanc [Reprod. Toxicol. 31 (2011) 528-533]. *Reproductive Toxicology*, *33*(3), 401–402. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.01.012>
- Nässel, D. R., & Zandawala, M. (2019). Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. *Progress in Neurobiology*, *179*(February). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.02.003>
- Nawrot-Esposito, M. P., Babin, A., Pasco, M., Poirié, M., Gatti, J. L., & Gallet, A. (2020). *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides induce developmental defects in non-target *Drosophila melanogaster* larvae. *Insects*, *11*(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/insects11100697>
- O’Brien, L. E., Soliman, S. S., Li, X., & Bilder, D. (2011). Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell*, *147*(3), 603–614. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.048>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature*, *439*(7075), 470–474. <https://doi.org/10.1038/nature04333>
- Ohlstein, B., & Spradling, A. (2007). Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science*, *315*(5814), 988–992. <https://doi.org/10.1126/science.1136606>
- Oliveira-Filho, E. C., Oliveira, R. S., Lopes, M. C., Ramos, F. R., Grisolia, C. K., Alves, R. T., & Monnerat, R. G. (2009). Toxicity Assessment and Clearance of Brazilian Microbial Pest Control Agents in Mice. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *83*(4), 570–574. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9817-2>
- Osman, D., Buchon, N., Chakrabarti, S., Huang, Y. T., Su, W. C., Poidevin, M., Tsai, Y. C., & Lemaitre, B. (2012). Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *Journal of Cell Science*, *125*(24), 5944–5949. <https://doi.org/10.1242/jcs.113100>

- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., & Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, *6*(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Panayidou, S., & Apidianakis, Y. (2013). Regenerative inflammation: Lessons from Drosophila intestinal epithelium in health and disease. *Pathogens*, *2*(2), 209–231. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020209>
- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>
- Park, J. H., Chen, J., Jang, S., Ahn, T. J., Kang, K. J., Choi, M. S., & Kwon, J. Y. (2016). A subset of enteroendocrine cells is activated by amino acids in the Drosophila midgut. *FEBS Letters*, *590*(4), 493–500. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12073>
- Pasco, M. Y., Loudhaief, R., & Gallet, A. (2015). *Pasco-30-277-292-2015*. 277–292.
- Perdigoto, C. N., Schweisguth, F., & Bardin, A. J. (2011). Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development*, *138*(21), 4585–4595. <https://doi.org/10.1242/dev.065292>
- Peterson, A. M., Fernando, G. J. P., & Wells, M. A. (1995). Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of Manduca sexta. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *25*(7), 765–774. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00092-V](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00092-V)
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of Receptors in Bacillus thuringiensis Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *71*(2), 255–281. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00034-06>
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., & Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes and Development*, *17*(14), 1709–1713. <https://doi.org/10.1101/gad.267103>
- Pu, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., & Shen, P. (2018). Two Drosophila Neuropeptide Y-like Neurons Define a Reward Module for Transforming Appetitive Odor Representations to Motivation. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30113-5>
- Radtke, F., & Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: Two sides of a coin. *Science*, *307*(5717), 1904–1909. <https://doi.org/10.1126/science.1104815>
- Raymond, B., & Federici, B. A. (2017). In defense of Bacillus thuringiensis, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, *93*(7), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix084>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). Bacillus thuringiensis: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, *18*(5), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Raymond, B., Wyres, K. L., Sheppard, S. K., Ellis, R. J., & Bonsall, M. B. (2010). Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the bacillus cereus group in the field. *PLoS Pathogens*, *6*(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000905>
- Ren, F., Shi, Q., Chen, Y., Jiang, A., Ip, Y. T., Jiang, H., & Jiang, J. (2013). Drosophila Myc integrates multiple signaling pathways to regulate intestinal stem cell proliferation during midgut regeneration. *Cell Research*, *23*(9), 1133–1146. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.101>
- Ren, F., Zhang, L., & Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity

- through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Developmental Biology*, 337(2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.046>
- Renzi, M. T., Amichot, M., Pauron, D., Tchamitchian, S., Brunet, J. L., Kretzschmar, A., Maini, S., & Belzunces, L. P. (2016). Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.028>
- Rosi-Marshall, E. J., Tank, J. L., Royer, T. V., Whiles, M. R., Evans-White, M., Chambers, C., Griffiths, N. A., Pokelsek, J., & Stephen, M. L. (2007). Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16204–16208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707177104>
- Royet, J. (2011). Epithelial homeostasis and the underlying molecular mechanisms in the gut of the insect model *Drosophila melanogaster*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(22), 3651–3660. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0828-x>
- Rubio-Infante, N., & Moreno-Fierros, L. (2016). An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *Journal of Applied Toxicology*, 36(5), 630–648. <https://doi.org/10.1002/jat.3252>
- Sallé, J., Gervais, L., Boumard, B., Stefanutti, M., Siudeja, K., & Bardin, A. J. (2017). Intrinsic regulation of enteroendocrine fate by Numb. *The EMBO Journal*, 36(13), 1928–1945. <https://doi.org/10.15252/embj.201695622>
- Sansom, O. J., Meniel, V. S., Muncan, V., Phesse, T. J., Wilkins, J. A., Reed, K. R., Vass, J. K., Athineos, D., Clevers, H., & Clarke, A. R. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature*, 446(7136), 676–679. <https://doi.org/10.1038/nature05674>
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R., & Winton, D. J. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes and Development*, 18(12), 1385–1390. <https://doi.org/10.1101/gad.287404>
- Santé publique France*. (2017). *Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives - Données de la déclaration obligatoire*, (ed.: <http://www.santepubliquefrance.fr/>). (2017). 2017.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., Van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775–806. <https://doi.org/10.1128/mubr.62.3.775-806.1998>
- Scopelliti, A., Bauer, C., Yu, Y., Zhang, T., Kruspig, B., Murphy, D. J., Vidal, M., Maddocks, O. D. K., & Cordero, J. B. (2019). A Neuronal Relay Mediates a Nutrient Responsive Gut/Fat Body Axis Regulating Energy Homeostasis in Adult *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 29(2), 269–284.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.021>
- Scopelliti, A., Cordero, J. B., Diao, F., Strathdee, K., White, B. H., Sansom, O. J., & Vidal, M. (2014). Local control of intestinal stem cell homeostasis by enteroendocrine cells in the adult *Drosophila* midgut. *Current Biology*, 24(11), 1199–1211. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.007>
- Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *Journal*

- of Bacteriology*, 196(7), 1297–1305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>
- Shanbhag, S., & Tripathi, S. (2009). Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1731–1744. <https://doi.org/10.1242/jeb.029306>
- Shaw, R. L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B. A., & Tapon, N. (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development*, 137(24), 4147–4158. <https://doi.org/10.1242/dev.052506>
- Shibata, T., Maki, K., Hadano, J., Fujikawa, T., Kitazaki, K., Koshiba, T., & Kawabata, S. I. (2015). Crosslinking of a Peritrophic Matrix Protein Protects Gut Epithelia from Bacterial Exotoxins. *PLoS Pathogens*, 11(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005244>
- Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>
- Soberón, Mario, López-Díaz, J. A., & Bravo, A. (2013). Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.023>
- St Johnston, D., & Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: Parallels and diversity. *Cell*, 141(5), 757–774. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.011>
- Staley, B. K., & Irvine, K. D. (2010). Warts and yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Current Biology*, 20(17), 1580–1587. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.041>
- Stevens, T., Song, S., Bruning, J. B., Choo, A., & Baxter, S. W. (2017). Expressing a moth *abcc2* gene in transgenic *Drosophila* causes susceptibility to Bt Cry1Ac without requiring a cadherin-like protein receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.008>
- Tang, X., Zhao, Y., Buchon, N., & Engström, Y. (2018). The POU/Oct Transcription Factor Nubbin Controls the Balance of Intestinal Stem Cell Maintenance and Differentiation by Isoform-Specific Regulation. *Stem Cell Reports*, 10(5), 1565–1578. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.014>
- Tank, J. L., Rosi-Marshall, E. J., Royer, T. V., Whiles, M. R., Griffiths, N. A., Frauendorf, T. C., & Treering, D. J. (2010). Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), 17645–17650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006925107>
- Tantin, D. (2013). Oct transcription factors in development and stem cells: Insights and mechanisms. *Development (Cambridge)*, 140(14), 2857–2866. <https://doi.org/10.1242/dev.095927>
- Tapon, N., Harvey, K. F., Bell, D. W., Wahrer, D. C. R., Schiripo, T. A., Haber, D. A., & Hariharan, I. K. (2002). *salvador* promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, 110(4), 467–478. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00824-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00824-3)
- Tian, Ai, Benchabane, H., Wang, Z., & Ahmed, Y. (2016). Regulation of Stem Cell Proliferation and Cell Fate Specification by Wingless/Wnt Signaling Gradients Enriched at Adult Intestinal Compartment Boundaries. *PLoS Genetics*, 12(2), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005822>

- Tian, Aiguo, & Jiang, J. (2014). Intestinal epithelium-derived BMP controls stem cell self-renewal in *Drosophila* adult midgut. *ELife*, *2014*(3), 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.01857>
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & Sauvage, F. J. De. (2011). renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, *478*(7368), 255–259. <https://doi.org/10.1038/nature10408.A>
- Tilquin, M., Paris, M., Reynaud, S., Despres, L., Ravanel, P., Geremia, R. A., & Gury, J. (2008). Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE*, *3*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003432>
- Tojo, A. (1983). *Endotoxin by Gut Juice Protease of the Silkworm Bombyx mori*. *45*(2), 576–580.
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>
- Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A. E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M. B., Hausmann, G., Cantù, C., Aguet, M., & Basler, K. (2016). Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell Reports*, *15*(5), 911–918. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.088>
- Van Cuyk, S., Deshpande, A., Hollander, A., Duval, N., Ticknor, L., Layshock, J., Gallegos-Graves, L. V., & Omberg, K. M. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in Urban environments following spraying. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(22), 7954–7961. <https://doi.org/10.1128/AEM.05207-11>
- Van Es, J. H., Van Gijn, M. E., Riccio, O., Van Den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., & Clevers, H. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, *435*(7044), 959–963. <https://doi.org/10.1038/nature03659>
- Vanderveken, M., & O'Donnell, M. J. (2014). Effects of diuretic hormone 31, drosokinin, and allatostatin a on transepithelial K⁺ transport and contraction frequency in the midgut and hindgut of larval *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *85*(2), 76–93. <https://doi.org/10.1002/arch.21144>
- Veenstra, J. A., Agricola, H. J., & Sellami, A. (2008). Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell and Tissue Research*, *334*(3), 499–516. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0708-3>
- Venkei, Z. G., & Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *Journal of Cell Biology*, *217*(11), 3785–3795. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807037>
- Vettori, C., Paffetti, D., Saxena, D., Stotzky, G., & Giannini, R. (2003). Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *35*(12), 1635–1642. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.009>
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., & Lemaitre, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(32), 11414–11419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502240102>
- Vriz, S., Reiter, S., & Galliot, B. (2014). Cell Death. A Program to Regenerate. *Current Topics in Developmental Biology*, *108*, 121–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00002-4>
- Wang, Chenhui, Guo, X., Dou, K., Chn, H., & Xi, R. (2015). Ttk69 acts as a master repressor of enteroendocrine cell specification in *Drosophila* intestinal stem cell lineages. *Development*

- (Cambridge), 142(19), 3321–3331. <https://doi.org/10.1242/dev.123208>
- Wang, Chenhui, & Xi, R. (2015). Keeping intestinal stem cell differentiation on the Tramtrack. *Fly*, 9(3), 110–114. <https://doi.org/10.1080/19336934.2015.1119947>
- Wang, Christine, Chin-Sang, I., & Bendena, W. G. (2012). The fglamide-allatostatins influence foraging behavior in drosophila melanogaster. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036059>
- Wang, Q. P., Lin, Y. Q., Zhang, L., Wilson, Y. A., Oyston, L. J., Cotterell, J., Qi, Y., Khuong, T. M., Bakhshi, N., Planchenault, Y., Browman, D. T., Lau, M. T., Cole, T. A., Wong, A. C. N., Simpson, S. J., Cole, A. R., Penninger, J. M., Herzog, H., & Neely, G. G. (2016). Sucralose Promotes Food Intake through NPY and a Neuronal Fasting Response. *Cell Metabolism*, 24(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.010>
- Wang, Y., Pu, Y., & Shen, P. (2013). Neuropeptide-gated perception of appetitive olfactory inputs in drosophila larvae. *Cell Reports*, 3(3), 820–830. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.003>
- Wei, X., Shimizu, T., & Lai, Z. C. (2007). Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in Drosophila. *EMBO Journal*, 26(7), 1772–1781. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601630>
- Wilcks, A., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., & Licht, T. R. (2006). Persistence of Bacillus thuringiensis bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(3), 410–418. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00169.x>
- Willer, H. and Lernoud, J. (2018). *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2018.: FiBL, Frick, and IFOAM- Organics International - Bonn.* (2018). 2018.
- World Health Organization (1999) “Microbial pest control agent Bacillus thuringiensis” Geneva, *Environment health criteria* 217, pp. 6-69. (1999). 1999.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., & Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*, 114(4), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00549-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00549-X)
- Xiang, J., Bandura, J., Zhang, P., Jin, Y., Reuter, H., & Edgar, B. A. (2017). EGFR-dependent TOR-independent endocycles support Drosophila gut epithelial regeneration. *Nature Communications*, 8(May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms15125>
- Xu, J., Li, M., & Shen, P. (2010). A G-protein-coupled neuropeptide Y-like receptor suppresses behavioral and sensory response to multiple stressful stimuli in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2504–2512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3262-09.2010>
- Xu, N., Wang, S. Q., Tan, D., Gao, Y., Lin, G., & Xi, R. (2011). EGFR, Wingless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain Drosophila intestinal stem cells. *Developmental Biology*, 354(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.018>
- Zeng, X., & Hou, S. X. (2015). Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult drosophila posterior midgut. *Development (Cambridge)*, 142(4), 644–653. <https://doi.org/10.1242/dev.113357>
- Zhai, Z., Boquete, J. P., & Lemaitre, B. (2017). A genetic framework controlling the differentiation of intestinal stem cells during regeneration in Drosophila. *PLoS Genetics*, 13(6), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006854>
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A. (2006). A mechanism of cell death involving an adenyl 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604017103>