

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé



THESE

Présentée et soutenu publiquement à

L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Spécialité : Biologie Moléculaire

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR EN SCIENCES

Par

Bouasria Benbouziane

**UTILISATION DES BACTERIES LACTIQUES COMME VECTEURS DE
PROTEINES D'INTERET MEDICAL.**

Soutenu le 24/06/2014 devant le jury d'examen composé de :

Président du jury : M. Halbouche Miloud, Professeur, Univ. Mostaganem.

Examineurs : M. Benali Mohamed, Professeur, Univ. Sidi-Bel-abbès.
M. Kheroua Omar, Professeur, Univ. ES-SENIA. Oran.
M. Abouni Bouziane, Professeur, Univ. Sidi-Bel-abbès.
M. Sebahia Mohamed, Maitres de conférences A, Univ. Chlef.

Directeur de thèse : M. Riazi Ali, Professeur, Univ. Mostaganem.

Invité : M. Philippe Langella, Directeur de recherche. INRA de Jouy-En-Josas.

Année Universitaire : 2013/2014

Dédicaces

Je dédie mon travail de thèse à :

A la mémoire de mon cher père décédé au moment où j'écrivais ces derniers mots ; que le bon Dieu puisse lui accorder sa miséricorde et l'accueillir dans son vaste paradis.

Je ne trouverai jamais les mots assez forts pour remercier ma chère femme pour son amour et son soutien.

A mes deux petits anges, Manel et Ryad, qui illuminent ma vie et à ma chère mère.

A Toute ma grande famille.

Asri

AVANT-PROPOS

La présente thèse a été réalisée conjointement au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem dirigé par le Pr Riazi, et à l'Institut MICALIS (Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé) de l'Unité Mixte de Recherche UMR INRA-AgroParis au sein de l'équipe « interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte » dirigée par le Dr Philippe Langella (Jouy-en-Josas, France).

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherches, Mr Riazi Ali, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, initiée à la recherche depuis le démarrage de mon magister jusqu'au doctorat, et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail.

Je suis très reconnaissant envers mes co-directeurs de thèse, Messieurs Philippe Langella et Luis Bermudez-Humaran, respectivement directeur de recherche et chargé de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas, pour m'avoir accepté dans leur équipe et de m'avoir permis de m'initier aux techniques de biologie moléculaire. Je les remercie aussi pour les précieux conseils pratiques qu'ils m'ont communiqué, leur disponibilité et leur humanisme.

Mes chaleureux et respectueux remerciements sont adressés à Mr Halbouche Miloud, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, qui a bien voulu présider le jury de ma thèse malgré ses nombreuses occupations pédagogiques et scientifiques.

Je suis honoré par la participation de Mr Kheroua Omar, Professeur à l'université d'Es-senia d'Oran, que je remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements sont adressés à mon enseignant, Mr Benali Mohammed, Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbès, pour avoir accepté d'apporter sa touche de critiques scientifiques à cette étude.

J'exprime mes remerciements à Mr Abbouni Bouziane, professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbes, pour sa participation à l'examen de cette thèse.

Je remercie également Mr Sebahia Mohamed, maître de conférences de classe A à l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef, pour avoir accepté de mettre à profit sa longue expérience en biologie moléculaire dans la critique scientifique constructive de nos travaux.

Je voudrais également remercier tout particulièrement toutes ces personnes rencontrées dans les laboratoires du centre de l'INRA et je pense à Pascale Kharrat pour son aide dans les manipulations de biologie moléculaire, Jean-Jacques et Chantal pour la partie Microbiologie, Pedro et Claire pour la culture cellulaire, Camille et Florian pour la partie immunologie, Laetitia et Mathilde pour les manipulations des souris à l'animalerie de Jouy-en-Josas.

Je salue et remercie chaleureusement mes amis et collègues du LMBAFS pour leurs soutiens, leurs précieux conseils et leur aide morale.

Enfin, un immense merci à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

26 mai 2014, Mostaganem

Bouasria Benbouziane

Résumé

Au cours des dernières années, les bactéries lactiques recombinantes (LAB) ont été utilisées avec succès en tant que vecteurs de délivrance de protéines d'intérêt thérapeutique au niveau de la muqueuse. Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en place un système d'expression inductible chez la souche recombinante modèle, *L. lactis*, adapté pour la production et la livraison de protéines d'intérêt santé *in situ* au niveau des surfaces muqueuses. Nous avons, donc, décidé de développer un système d'expression régulé par le stress : Expression contrôlée inductible par le stress (SICE). En effet, lors de leur administration à l'hôte, les bactéries recombinantes vont se trouver confrontées à des conditions très différentes de celles de leur culture habituelle et, par conséquent, vont devoir subir divers types de stress : y compris le stress thermique si la température du corps du patient (37°C) à traiter est suffisamment élevée par rapport à la température de croissance optimale de ces bactéries. Dans le cas d'une administration orale, le stress thermique peut s'accompagner d'un stress acide dû à l'acidité gastrique et à un stress biliaire dans le duodénum. En outre, un tel système représente une alternative intéressante pour le traitement de certaines maladies telles que l'IBD (Inflammatory Bowel Diseases). La fonctionnalité du système SICE a été validée *in vivo* en utilisant deux voies d'administration : voie orale et intra-nasale, et dans deux modèles murins différents de pathologies humaines : (i) un modèle de traitement contre les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) et (ii) un modèle de vaccination contre le type 16 du virus du papillome humain (HPV-16).

Mots clés : Bactéries Lactiques Recombinantes - *Lactococcus lactis*- SICE-Bile-Inflammations - Human papillomavirus type-16 (HPV-16).

ABSTRACT

In recent years, Recombinant Lactic Acid Bacteria (LAB) have been successfully used as safe mucosal delivery vectors. In this work, we sought to implement an inducible expression system in the model LAB, *L. lactis*, suitable for the production and delivery of proteins of health interest *in situ* at mucosal surfaces. For this task, we wanted to design and implement a system in which protein expression is induced upon host administration, which will ensure production and delivery of the molecule of interest *in situ*. We decided to develop an expression system regulated by stress: Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system. Indeed, upon administration into the host, recombinant bacteria should find conditions very different from their usual culture conditions and then suffer different types of stress: including heat-stress (if the body temperature of the subject to be treated is high enough compared to the optimal growth temperature of the bacteria) and in the case of oral administration, the heat stress can be accompanied by an acid stress during passage through the stomach (where the pH is about 1.5–2.0) along with a bile stress in the duodenum. In addition, such a system represents an interesting alternative for the treatment of certain diseases such as IBD. The functionality of the SICE system was validated *in vivo* using two different routes of administration: oral and intranasal, and in two different murine models of human pathologies: (i) a model of therapy against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and (ii) a model of vaccination against human papillomavirus type-16 (HPV-16).

Key words: Recombinant lactic acid bacteria (LAB), *Lactococcus lactis*, Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system, bile stress, Inflammatory bowel diseases, human papillomavirus type-16 (HPV-16).

Liste des abréviations

- **ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique
- **Ag** : Antigène
- **BBP**: Bleu de BromoPhénol
- **BET**: Bromure d'éthidium
- **BL** : Bactérie Lactique
- **BLGM** : Bactéries Lactiques Génétiquement Modifiées
- **C** : Culot
- **CD** : Cellule Dendritique
- **CTL** : Cytotoxique des Lymphocytes
- **DAO** : Dérivé Actif de l'Oxygène
- **DO** : Densité Optique
- **DSS**: Dextran Sodium Sulfate
- **DTT**: Dithiotréitol
- **FCS**: Foetal Calf Sérum
- **H₂O₂** :Peroxyde d'hydrogène
- **HPV16** : papillomavirus humain de type 16
- **IBD**: Inflammatory Bowel Diseases
- **IFN**: Interféron
- **Ig** : Immunoglobuline
- **IL** : InterLeukine
- **KO** : KnockOut
- **L**: Lactococcus
- **LB**: Lymphocyte B
- **Lb.** Lactobacillus
- **LGG** : Lactobacillus rhamnosus souche GG
- **LPS** : Lipo Poly Saccharide
- **LT** : Lymphocyte T
- **M17** : Milieu pour la culture et l'isolement des lactocoques
- **MALT** : Mucosa Associated Lymphoid Tissue
- **MC** : Maladie de Crohn
- **MICI** : Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale
- **Mileu LB** : Luria-Bertani

- **NICE:** Nisine Controlled Expression
- **NOD:** Nod like receptor
- **Nuc :** Nucléase
- **P :** Promoteur
- **Pb:** Paires de bases
- **PBMC:** Peripheral Blood Monocyte Cell
- **PCR :** Polymerase Chain Reaction
- **PEG :** Polyéthylène glycol
- **pLB :** Plasmide
- **PP :** Pourcentage de Protection
- **PS :** peptide signal
- **PVDF :** Polyfluorure de vinylidène
- **RCH :** Rectocolite Hémorragique
- **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium
- **S:** Surnageant
- **Sacc:** Saccharose
- **SDS:** Sodium Dodécyle Sulfate
- **SICE:** Stress Induced Controlled Expression
- **SII:** Système Immunitaire Intestinal
- **SOD:** Superoxyde Dismutase
- **SPase:** Signal Peptidase
- **TBE:** Tris-Borate-EDTA
- **TD :** Tractus Digestif
- **TGF- β :** Transforming Growth Factor beta
- **Th2:** Cellules T helper
- **TLR:** Toll Like Receptor
- **TNBS:** 2,4,6-t Tri Nitro Benzen Sulfonic acid
- **TNF:** Tumor Necrosis Factor
- **UFC :** Unité Formant Colonie
- **GM17 :** Milieu gélosé M17 classique dans lequel le lactose est remplacé par du glucose (G)
- **GRAS:** Generally recognized as safe

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<u>Liste des Tableaux</u>	Page
Tab.1: Vecteurs bactériens utilisés en tant que vaccins vivants (Bermúdez-Humarán et Langella, 2009).....	05
Tab.2: Antigènes et cytokines (adjuvants) exprimés chez les bactéries lactiques (BL) (Bermúdez-Humarán et Langella, 2009).....	08
Tab.3: Les souches bactériennes et les plasmides utilisés (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	34

<u>Liste des Figures</u>	
Fig.1 : Schéma du système d'expression NICE (Mierau et Kleerebezem, 2005).....	11
Fig.2 : Sécrétion d'une protéine d'intérêt (Van Asseldonk <i>et al.</i> , 1993).....	14
Fig.3 : Ancrage d'une protéine d'intérêt à la paroi bactérienne (Piard <i>et al.</i> , 1997).....	14
Fig.4 : Mode opératoire d'induction de la colite murine au DSS (Akayasu <i>et al.</i> , 1990).....	22
Fig.5 : Coupe histologique de muqueuse murine enflammée ou non avec du DSS (Watterlot <i>et al.</i> , 2010).....	22
Fig.6 : Mode opératoire d'induction de la colite murine au TNBS (Wallace <i>et al.</i> , 1989).....	23
Fig.7 : Muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS (Watterlot <i>et al.</i> , 2010).....	24
Fig.8 : Coupe histologique de muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS et évaluées selon le score histologique (Ameho <i>et al.</i> , 1997).....	25
Fig.9 : Structure de la capsid de l'HPV-16 (Smotkin et Wettstein, 1986).....	25
Fig.10: Organisation génétique de l'HPV-16 et structure de la protéine E7 (Schiller <i>et al.</i> , 2008).....	26
Fig.11: Extraction de l'ADN plasmidique selon le Quick protocol-Promega (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	35
Fig.12 : Séquençage automatique d'ADN analysés par la compagnie MWG (Genomic Company, Allemagne).....	36
Fig.13 : Schéma de construction de plasmides et représentation de la cassette de pGroESL (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	39
Fig.14 : Marqueurs utilisés lors des électrophorèses des protéines (GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000 pb (Fermentas, Fisher Scientifique, France).....	39

Fig.15 : Les étapes de construction du plasmide final pLB333 (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	41
Fig.16 : Les techniques de clonage et de transformation utilisées (Langella <i>et al.</i> , 1993).....	44
Fig.17 : Schéma du plasmide pLB333 sécrétant la Nuc sous le contrôle de SICE chez <i>Lactococcus lactis</i> (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	45
Fig.18 : Schéma de digestion de plasmide pLB270 par les enzymes NsiI/NotI pour récupérer SEC mu IL-10 et remplacé PSExp4: Nuc après une digestion avec les mêmes enzymes NsiI/NotI pour donner après une ligation un nouveau vecteur pLB350 codant pour la cytokine IL-10 sous le contrôle du promoteur GroEL (Système SICE) chez <i>Lactococcus lactis</i> . (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	47
Fig.19 : Extraction des protéines des culots et des surnagent des cultures de <i>L. lactis</i> MG1363 renfermant le pLB350 exprimant IL-10.....	48
Fig.20 : Le protocole de Western Bloot utilisé pour l'immuno-détection d'IL-10 (Bermudez-Humaran <i>et al.</i> , 2002).....	50
Fig.21 : Schéma de digestion de plasmide pLB333 par les enzymes NsiI / EcoRI pour enlever et remplacer PSExp4: Nuc par le gène codant pour l'antigène E7 après une digestion du plasmide pLB 22 avec les mêmes enzymes NsiI / EcoRI pour donner après une ligation un nouveau vecteur pLB356 sécrétant E7 sous le contrôle de SICE chez <i>L. lactis</i> (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	52
Fig.22 : Protocole d'induction d'inflammation par l'acide dinitro benzene sulfonique ou DNBS (Martin, 2013).....	54
Fig.23 : Protocole d'induction d'inflammation par l'acide dinitro benzene sulfonique ou DNBS (Martin, 2013) Protocole de vaccination intra-nasale avec les souches recombinante de <i>L. lactis</i> (LLE7) induit une réponse immunitaire et une protection contre des tumeurs induites par l'HPV-16 chez les souris vaccinées (Bermudez-Humaran <i>et al.</i> , 2005).....	56
Fig.24 : Développement des tumeurs provoquées par les cellules TC-1chez les souris (Bermudez-Humaran <i>et al.</i> , 2005).....	57
Fig.25 : Préparation des splenocytes pour analyser la réponse cytotoxique (CTL).....	57
Fig.26 : Le fragment d'ADN correspondant à la séquence pLB241 codant pour le promoteur groESL (Benbouziane <i>et al.</i> , 2013).....	59
Fig.27 : Mise en évidence par test colorimétrique de l'activité biologique de la Nuc produite par les cultures sous le contrôle du promoteur (pGroESL).....	60
Fig.28 : Résultats de l'électrophorèse de la digestion des 4 clones positifs d'IL-10 GroEL par SpeI et pVUII qui seront envoyés en séquençage.....	61

Fig.29 : Séquençage du clone 1de la souche LL-pLB350 par MWG (Genomic Company, Allemagne).....	66
Fig.30 : Production d'IL-10 (bande majeure d'environ de 20 KDa dans les surnageants (S) par la souche <i>Lactococcus lactis</i> (LL-pLB350) sous le contrôle du système SICE chez les cultures stressées de LL-pLB350 et de précurseur SPExp4-IL-10 (bande mineure dans les culots (C)).....	67
Fig.31 : Quantification d'IL-10 sécrétée par la souche recombinante LL-pLB350 et par LL-pMEC243 produisant IL-10 sous le contrôle du système SICE déterminé par le test ELISA au niveau des surnageants.....	69
Fig.32 : Quantification d'IL-10 produite au niveau du culot (C) de la souche recombinante (LL-pLB350) stressée et non stressée par les sels biliaires.....	69
Fig.33 : Teneurs en IL-10 produite au niveau des surnageants (S) de la souche recombinante LL-pLB350 stressée et non stressée par les sels biliaires.....	71
Fig.34 : Effet thérapeutique de la souche recombinante LL-PLB350 sécrétant l'IL-10 murin (LLpLB350) sur les changements de poids des souris dans un modèle de colite induite par l'administration d'acide dinitrobenzene sulfonique (DNBS) par voie intra rectale.....	71
Fig.35 : Sévérité des scores macroscopiques provoqués par la réactivation de la colite .Les différences significatives importantes (*) sont enregistrées entre les lots traités par du PBS (#) par rapport aux lots traités par LL-pLB350 ; ainsi que les groupes contrôles (DNBS PBS et DNBS-LL-pLB44).....	72
Fig.36 : Evaluation de la sévérité provoquée par la réactivation de la colite sur les changements des scores microscopiques et les différences significatives marquées (*) entre les lots traités par du PBS (#) et l'éthanol (ETOH-PBS) par rapport aux lots traités par la souche LL-pLB350 et les groupes contrôles (DNBS-PBS et DNBS-LL-pLB44).....	72
Fig.37 : Séquençage du clone 1 de la souche recombinante (LL-pLB356) par MWG (Genomic Company, Allemagne).....	77
Fig.38 : Induction thermique (contrôle du système SICE) de la production de l'antigène E7 par <i>L. lactis</i> (LL-pLB356) révélé par western blot dans les surnageants et les culots des cultures stressées (à droite) ou non stressées (à gauche) par la chaleur. La position de l'antigène E7 mature est indiquée par une flèche à droite et les positions des marqueurs de masse moléculaire sont indiquées sur la gauche. (C = culot et S = surnageant).....	78

- Fig.39** : Régression du volume de la tumeur induite chez les souris par injection de la lignée cellulaire TC1 sous l'effet d'une immunisation par la souche recombinante *L. lactis* LL-pLB356 par rapport aux lots de souris immunisées par la souche sauvage *L. lactis* LL-pLB44 ou par le PBS..... 80
- Fig.40** : Réduction de la mortalité des souris (entre parenthèses) et du volume de leur tumeur sous l'effet d'une immunisation avec la souche recombinante *L. lactis* LL-pLB356 par rapport à celle avec une souche *L. lactis* sauvage LL-pLb44 ou avec du PBS..... 80

Table des matières

Dédicaces	
Avant-propos	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Table des matières	
Introduction.....	1
Chapitre I : Intérêt des Bactéries Lactiques en santé Humaine	
I.1. Généralités sur l'immunité muqueuse et la vaccination.....	3
I.2. Description des différents vecteurs à administration muqueuse.....	4
I.3. Adjuvants muqueux.....	6
I.4. Les Bactéries lactiques comme vecteurs à administration muqueuse.....	6
I.5. <i>Lactococcus lactis</i> en tant que vaccin vivant.....	9
I.5.1. Production de protéines hétérologues chez <i>L. lactis</i>	9
I.5.2. Le système NICE (Nisin Induced Controlled Expression).....	10
I.5.3. Le système SICE (Stress Induced Controlled expression.....	11
I.5.4. Les vecteurs d'expression.....	13
I.5.5. Amélioration de la production-sécrétion de protéines hétérologues chez <i>L. lactis</i>	15
I.6. Réponse immune contre des antigènes produits par <i>Lactococcus lactis</i>	15
I.7. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).....	17
I.7.1. Bactéries recombinantes et MICI.....	17
I.7.2. Les modèles d'études.....	19
I.7.2.1. Les modèles d'études in vitro : modèles cellulaires d'origine humaine.....	19
I.7.2.2. Les modèles d'études in vivo : modèles murins d'inflammation intestinale.....	20
I.7.2.2.1. Le modèle DSS : Dextran Sodium Sulfate.....	21
I.7.2.2.2. Le modèle TNBS (Trinitro-Benzen-Sulfonic Acid).....	23
I.7.3. Construction de souches vaccinales de BL afin de protéger et de lutter contre l'HPV16.....	24
I.7.4. Prévention et traitement des allergies à la β -lactoglobuline bovine (BLG) avec des lactocoques recombinants produisant la BLG et l'interleukine 12 (IL-12).....	29
I.7.5. Utilisation de souches recombinantes de <i>L. lactis</i> productrices de la leptine humaine en vue du traitement de l'obésité.....	31
I.8. Conclusion et perspectives.....	32
Chapitre II : MATERIELS ET METHODES	
II.1. Souches bactériennes et plasmides utilisés.....	33
II.1.1. Cultures bactériennes utilisées.....	33
II.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique	33
II.2. Construction d'un plasmide avec un système inductible aux stress pour la production de protéines hétérologues chez <i>Lactococcus lactis</i>	37

II.2.1. Digestion.....	38
II.2.2. Purification de l'ADN plasmidique.....	38
II.2.3. Ligation.....	40
II.2.4.1. Préparation des souches <i>Lactococcus lactis</i> compétentes MG1363.....	42
II.2.4.2. L'électroporation.....	42
II.3. Détection de l'activité biologique de la Nucléase (Nuc) par test colorimétrique.....	43
II.4. Construction d'un vecteur inductible exprimant IL10 chez <i>L. lactis</i>	45
II.4.1. Extraction des protéines.....	46
II.4.2. Western Blot.....	48
II.5. Construction d'un vecteur HPV-16 E7 chez <i>Lactococcus lactis</i>	50
II.6. Les animaux.....	51
II.7. Modèle de thérapie contre les maladies inflammatoires (IBD).....	53
II.8. Modèle de vaccination contre le virus HPV-16.....	55
II.9. Traitement statistique des résultats.....	59

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Construction d'un vecteur inductible au stress exprimant une protéine chez <i>L. lactis</i>	59
III.2. Validation <i>in vivo</i> du système SICE.....	61
III.3. Caractérisation de la production d'IL-10 en utilisant le système SICE chez <i>L. lactis</i>	61
III.4. Effet de la souche recombinante LL-PLB350 sécrétant l'interleukine10 (IL-10) dans un modèle colite induite par l'acide dinitrobenzène sulfonique ou DNBS chez la souris.....	70
III.5. Production et sécrétion de l'antigène E7 du HPV-16 par la souche recombinante LL- pLB356.....	71
III.6. Vaccination intra nasale avec <i>L. lactis</i> recombinante produisant l'antigène E7 sous le contrôle d'un système SICE afin de protéger et lutter contre les tumeurs par HPV-16.....	78
III.7. La lyse des cellules TC-1 par la médiation et activation des splénocytes des souris immunisées	80

Conclusion

Références bibliographiques

Communications scientifiques

Introduction

Les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries à Gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* (Stackebrandt et Teuber, 1988).

Ce sont des microorganismes largement utilisés dans des procédés industriels de fermentation agro-alimentaire et certains genres comme les lactobacilles ou les bifidobactéries sont des bactéries commensales qui font partie du microbiote intestinal (Mater et Corthier, 2004).

Les BL sont généralement reconnues comme étant sans danger par les autorités sanitaires du monde entier (microorganismes considérés comme « Generally Recognized As Safe ») (Gilliland, 1990). Lorsqu'elles sont ingérées vivantes en grandes quantités, elles peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte, où elles sont susceptibles d'exercer diverses actions bénéfiques sur l'hôte après leur ingestion (ex. amélioration de la digestion des fibres, stimulation du système immunitaire et prévention ou traitement des diarrhées) (Ljungh et Wadström, 2006). Du fait de leur parfaite innocuité et de leurs effets probiotiques (pour certaines), les BL sont de plus en plus étudiées pour le développement de nouvelles stratégies de vaccination mucoale (Wells et Mercenier, 2008).

Actuellement, les vaccins mucoaux en cours de développement sont basés sur l'utilisation de microorganismes pathogènes atténués dont l'utilisation présente des risques sanitaires (Wells et Mercenier, 2008). Comme les BL sont inoffensives ou même bénéfiques pour certaines espèces, elles représentent une alternative intéressante aux stratégies basées sur des pathogènes atténués pour l'administration mucoale de vaccins ou médicaments (Wells et Mercenier, 2008).

En effet, de tels vecteurs vivants permettent l'induction d'une immunité au niveau des muqueuses qui constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. De plus, ces vecteurs, plus faciles à administrer et moins coûteux à produire que les vaccins injectables, sont tout à fait adaptés à des campagnes massives de vaccination dans les pays en voie de développement.

Deux paramètres sont essentiels lorsqu'on veut faire produire une protéine d'intérêt santé à une BL :

- la localisation cellulaire de la protéine, selon qu'elle soit ancrée à la paroi, sécrétée ou simplement produite, son mode d'action va varier.

- le système d'expression de la protéine qui peut être soit, sous le contrôle d'un promoteur constitutif soit, sous le contrôle d'un promoteur inductible permettant ainsi de maîtriser sa production.

Le choix de la localisation cellulaire de la protéine dépend de ce que l'on souhaite étudier et du mode d'action de la bactérie que l'on souhaite utiliser.

Certaines protéines, telles que les cytokines, peuvent s'accumuler au sein du cytoplasme de la bactérie et dégrader ainsi la cellule, d'où la nécessité de mettre en place des systèmes de régulation tels que des promoteurs inductibles. Ces systèmes permettent de prévenir d'éventuels effets négatifs de la surproduction de la protéine hétérologue en contrôlant l'expression du gène par un facteur environnant extérieur tel que le pH, la température, la concentration en sels biliaires ou encore la présence de peptide antimicrobien (Bermudez-Humaran, 2004).

Un des meilleurs exemples est le système NICE (Nisine Controlled expression), qui permet d'activer l'expression du gène d'intérêt uniquement en présence d'une bactériocine « la nisine » dans le milieu environnant» (De Ruyter *et al.*, 1996; Kuipers, 1998).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons d'abord construit le nouveau promoteur pGroESL pour obtenir un vecteur inductible aux stress exprimant une protéine chez *Lactococcus lactis*, le promoteur **groESL** de *L. lactis* a été cloné dans le vecteur ayant la Nucléase (**Nuc**) comme protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur s'exprimant chez *Staphylococcus*, car son activité est facilement détectable *in vitro*. Cette caractéristique a permis un criblage rapide et direct des clones recombinants montrant une activité de Nuc sur boîte pétri (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002; Le Loir *et al.*, 1996, 1998).

Chapitre I. Intérêt des Bactéries Lactiques en santé humaine

I.1. Généralités sur l'immunité muqueuse et la vaccination

Les agents pathogènes qui infectent l'organisme par les muqueuses représentent les causes majeures des maladies infectieuses à travers le monde. Le moyen le plus efficace de limiter la morbidité et la mortalité induites par ces agents est la vaccination.

Les muqueuses, des tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital, représentent une surface de contact d'environ 400 m² avec le milieu extérieur. Ces surfaces muqueuses comportent un système immunitaire très développé : MALT (mucosa associated lymphoid tissue), constitué d'environ 80 % des cellules immunitaires de l'organisme et considéré ainsi comme le plus important système lymphoïde chez l'homme (Cesta, 2006 ; Corr *et al.*, 2008). Ces propriétés particulières ont suscité l'intérêt d'exploiter une approche vaccinale muqueuse pour lutter contre les agents infectieux dès leur pénétration dans l'organisme.

Les vaccins muqueux offrent l'avantage d'induire une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique. Au contraire, les vaccins injectables traditionnels génèrent une bonne immunité systémique mais n'induisent pas ou très peu d'immunité muqueuse (Neutra et Kozlowski, 2006).

Les vaccins muqueux sont, a priori, dépourvus d'effets secondaires parce qu'ils évitent le contact direct entre les composants complexes des vaccins (ex. adjuvants potentiellement dangereux), et la circulation systémique. D'un point de vue pratique, ils sont faciles à administrer (spray nasal ou par voie orale par exemple), d'un moindre coût et donc plus accessibles aux pays en voie de développement (Neutra et Kozlowski, 2006).

Cependant, en dépit de ces avantages, l'efficacité de l'immunisation au niveau des muqueuses est limitée par la dégradation des antigènes, l'adsorption sur les muqueuses de l'hôte et l'utilisation de systèmes d'expression inadaptés.

Au cours des dernières années, de nouvelles stratégies d'immunisation par voie mucosale ont été développées sur la base de pathogènes atténués (bactéries et virus) exprimant des molécules d'intérêt médical (Holmgren et Czerkinsky, 2005). Cependant, le principal risque lié à l'utilisation de ces systèmes est un retour à l'état pathogène de ces microorganismes, interdisant leur application à des patients immunodéprimés, des personnes âgées et des enfants (Alexandersen, 1996).

L'utilisation de BL en tant que vecteurs d'antigènes constitue une stratégie plus sûre et moins onéreuse. En plus, ces bactéries ont déjà été utilisées avec succès pour exprimer et délivrer plusieurs protéines d'intérêt médical (Wells et Mercenier, 2008 ; Bermúdez-Humarán et *al.*, 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009).

I.2. Description des différents vecteurs à administration muqueuse

Un vecteur idéal à administration muqueuse doit pouvoir :

i) préserver les antigènes des dégradations, ii) cibler le système immunitaire local (ex. cellules épithéliales ou cellules dendritiques susceptibles de capturer l'antigène) et iii) stimuler de façon appropriée l'immunité innée et spécifique afin d'induire une immunité spécifique adaptée.

Les récentes avancées en biotechnologie et une meilleure compréhension du système immunitaire ont rendu possible, aujourd'hui, la conception des nouveaux vecteurs à administration muqueuse (Ilum et Davis 2001).

De tels vecteurs comprennent :

- des systèmes inertes dans lesquels divers complexes lipidiques, nanoparticules, microsphères ou polymères solubles enrobent les antigènes ou l'ADN nu (Hu et *al.*, 2001 ; Christensen et *al.*, 2007 ; Singh et *al.*, 2007).

- des vecteurs viraux (adénovirus, virus de la rougeole ou poxvirus) (Moss, 1991 ; Ulaeto et Hruby, 1994 ; Beukema et *al.*, 2006 ; Karkhanis et Ross, 2007 ; Jennings et Bachmann, 2008 ; Patterson et Robert-Guroff, 2008) ou des vecteurs bactériens tels que des bactéries pathogènes atténuées (dérivés de *Salmonella typhi*, *Bordetella pertussis*, etc.) ou des bactéries lactiques et/ou commensales (Wells et Mercenier, 2008 ; Bermúdez-Humarán et *al.*, 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009 ; Mielcarek et *al.*, 2001 ; Daudel et *al.*, 2007) (tableau 1).

Toutefois, les vecteurs viraux et bactériens sont plus immunogéniques que les vecteurs inertes et représentent donc de meilleurs candidats pour induire une réponse immunitaire muqueuse et systémique.

Parmi ces deux types de vecteurs à administration muqueuse (virus et bactéries), les génomes bactériens présentent l'avantage de pouvoir contenir plusieurs gènes hétérologues à la différence des vecteurs viraux dont le nombre des gènes hétérologues est limité par la taille

de son génome qui est beaucoup plus petit que celui des vecteurs bactériens. Ainsi, une bactérie recombinante peut produire différents antigènes permettant le développement de vaccins multivalents.

Tableau 1 : Vecteurs bactériens utilisés en tant que vaccins vivants.

(Bermúdez-Humarán et Langella, 2009)

Vecteur bactérien	Source (auteurs)
Pathogènes atténués	
<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	Stover et al. (1991)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Jensen et al. (1997)
<i>Salmonella spp.</i>	Curtiss et al. (1994)
<i>Vibrio cholera</i>	Killeen et al. (1999)
<i>Shigella spp.</i>	Phalipon et Sansonetti (1995)
<i>Bordetella spp.</i>	Stevenson et Roberts (2003)
Bactéries non pathogènes	
<i>Streptococcus gordonii</i>	Lee (2003)
<i>Lactococcus lactis</i>	Wells et Mercenier (2008)
<i>Lactobacillus spp.</i>	Seegers (2002)
<i>Staphylococcus spp.</i>	Nguyen et al. (1993)

I.3. Adjuvants muqueux

Un des problèmes majeurs rencontrés en vaccinologie est souvent la faible immunogénicité des antigènes utilisés. L'utilisation d'adjuvants tels que la toxine cholérique et l'entérotoxine d'*Escherichia coli* constitue une bonne solution; car ils sont considérés comme les adjuvants muqueux les plus puissants connus à ce jour. Malheureusement, ces adjuvants très efficaces peuvent causer des diarrhées sévères chez l'homme et induire des réponses de type cellules T helper (Th2) indésirables (Holmgren et *al.*, 2003 ; Lycke, 2005).

Par ailleurs, le pouvoir adjuvant de cytokines, toujours en cours d'évaluation, pourrait constituer une prochaine génération d'adjuvants (Villinger, 2003 ; Boyaka et McGhee, 2001). Parmi ces cytokines, l'interleukine-12 (IL-12) est une molécule stimulatrice du système immunitaire dont l'emploi s'est révélée très prometteur en co-administration avec un antigène (Metzger, 2009).

En outre, l'IL-12 a été utilisée avec succès dans des immunothérapies contre certains cancers et son utilisation empêche le développement d'un état de tolérance contre l'antigène utilisé. Ce dernier point est très intéressant dans le cadre du développement de vaccins vivants, car la persistance de l'antigène au niveau des muqueuses peut induire un état de tolérance non souhaité.

I.4. Les Bactéries lactiques comme vecteurs à administration muqueuse

La nécessité, toujours actuelle, de développer des vaccins plus sûrs, faciles à administrer et peu onéreux, a conduit à une recherche intense sur l'utilisation potentielle d'organismes vivants recombinants comme vecteurs d'antigènes protecteurs, administrables en particulier par voie locale.

L'attention s'est donc tournée vers l'utilisation de BL à Gram-positif et commensales comme vecteurs d'antigènes (Wells et Mercenier, 2008). Leur totale innocuité, alliée aux capacités de certaines d'entre elles à coloniser les cavités corporelles externes, désigne les BL, en particulier les lactobacilles, comme candidats de choix pour délivrer des antigènes vaccinaux au niveau des muqueuses.

Ces bactéries présentent en outre l'avantage d'être aisément administrables par voie orale ou locale. L'évaluation du potentiel des BL en tant que vecteurs vivants de vaccination a été initiée il y a quelques années dans différents laboratoires dans le monde entier (Wells et Mercenier, 2008 ; Bermúdez-Humarán et *al.*, 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009).

En plus de leur statut GRAS, de nombreux antigènes et cytokines ont été produits à ce jour chez différentes BL et l'administration mucosale de ces BL génétiquement modifiées chez la souris stimule une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique (tableau 2).

Afin d'identifier l'espèce de bactérie permettant d'induire une protection à long terme, deux types de BL ont été étudiés selon qu'ils persistent (e.g. certaines espèces de lactobacilles) ou non (e.g. *Lactococcus lactis*) dans le tube digestif.

Le mode de production de l'antigène par la bactérie recombinante conduisant au meilleur effet a été examiné également. La production d'un antigène par une BL peut être envisagée (en théorie) dans trois différentes localisations cellulaires : dans la cellule, à sa surface, ou sécrétée (Bermúdez-Humarán et al., 2004a). L'expression dans ces trois localisations a pour but une optimisation des interactions protéine-hôte et chaque localisation présente des avantages et des inconvénients selon l'application.

Une forme cytoplasmique permet de protéger la protéine des environnements extérieurs drastiques (tel que le jus gastrique), mais une lyse cellulaire est nécessaire pour délivrer la protéine.

La forme sécrétée permet une meilleure diffusion de la protéine à l'extérieur de la bactérie et donc une meilleure accessibilité à l'hôte. Elle est en revanche plus exposée à la protéolyse.

La forme ancrée de la protéine pourrait constituer un compromis entre les deux formes précédentes. La présence de la protéine à la surface de la bactérie permettrait une meilleure accessibilité de l'hôte pour la protéine tout en limitant les problèmes de protéolyse de la protéine protégée par la paroi de la bactérie.

Dans ce contexte, plusieurs travaux ont été réalisés pour comparer la production de différents antigènes chez les BL en utilisant ces trois localisations et l'évaluation de leurs effets immunomodulateurs (Norton et al., 1996a ; Reveneau et al., 2002 ; Bermúdez-Humarán et al., 2004b). Ces travaux ont montré que les réponses immunitaires les plus élevées sont obtenues avec des antigènes exposés à la surface des BL.

Tableau 2 : Antigènes et cytokines (adjuvants) exprimés chez les bactéries lactiques (BL)
(Bermúdez-Humarán et Langella, 2009)

Protéines	Source	Vecteur	Potentiel	Références
Antigènes Bactériens				
PA	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Lb. casei</i>	Vaccin contre l'anthrax	Zegers et al. (1999)
LpA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Lb. plantarum</i>	Vaccin contre la maladie de Lyme	del Rio et al. (2008)
L7/L12	<i>Brucella abortus</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre la brucellose	Ribeiro et al. (2002)
GroEL	<i>Brucella abortus</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre la brucellose	Miyoshi et al. (2006)
β -toxin	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre <i>C. perfringens</i> type B et C	Nijland et al. (2007)
K99	Enterotoxigénic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>Lb. acidophilus</i>	Traitement contre la colibacillose entérique	Chu et al. (2005)
SpaA	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre le rouget du porc	Cheun et al. (2004)
UreB	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre <i>Helicobacter</i>	Lee et al. (2001)
Cag12		<i>L. lactis</i>	Vaccin contre <i>Helicobacter</i>	Kim et al. (2006)
PAC	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre les caries	Iwaki et al. (1990)
M6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre les caries	Mannam et al. (2004)
PsaA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre pneumocoques	Hanniffy et al. (2007)
Antigènes Viraux				
E7	<i>Human papillomavirus type-16 (HPV-16)</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre le cancer du col de l'utérus	Bermúdez-Humarán et al. (2002)
		<i>Lb. casei</i>	Thérapie pour le cancer du col et de l'utérus	Poo et al. (2006)
		<i>Lb. plantarum</i>	Thérapie pour le cancer du col et de l'utérus	Cortes-Perez et al. (2007a)
L1	HPV-16	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre le cancer du col de l'utérus	Cho et al. (2007)
		<i>L. lactis</i>	Vaccin contre le cancer du col de l'utérus	Cortes-Perez et al. (2009a)
		<i>Lb. casei</i>	Vaccin contre le cancer du col de l'utérus	Aires et al. (2006)
Autres				
MSP-1	<i>Plasmodium yoelii</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre la malaria	Zhang et al. (2005)
MSA2	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre la malaria	Ramasamy et al. (2006)
BLG	Bovine β -lactoglobulin	<i>L. lactis</i>	Traitement contre l'allergie	Chatel et al. (2001)
CWP2	<i>Giardia lamblia</i>	<i>L. lactis</i>	Vaccin contre la giardiose	Lee et Faubert (2006)
Cytokines				
IL-2	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Adjuvant pour vaccin contre le tétanos	Steidler et al. (1998)
IL-6	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Adjuvant pour vaccin contre le tétanos	Steidler et al. (1998)
IL-10	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Thérapie pour les colites	Steidler et al. (2000)
	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. lactis</i>	Thérapie pour la maladie de Crohn	Steidler et al. (2003)
IL-12	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Adjuvant thérapie pour le cancer du col de l'utérus	Bermúdez-Humarán et al. (2003a)
IFN- ω	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Traitement antiviral	Bermúdez-Humarán et al. (2003b)
IFN- γ	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Traitement antiviral/anti-tumoral	Bermúdez-Humarán et al. (2008)
IFN- β	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. lactis</i>	Traitement antiviral/anti-inflammatoire	Zhuang et al. (2008)
MIG/IP-10	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	Nouveau adjuvant muqueux	Cortes-Perez et al. (2008)
Leptin	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. lactis</i>	Nouveau adjuvant muqueux	Bermúdez-Humarán et al. (2007)

I.5. *Lactococcus lactis* en tant que vaccin vivant

Lactococcus lactis est une bactérie à Gram-positif en forme de coque ovoïde qui est largement utilisée dans la fabrication de produits laitiers, en particulier de fromages.

De plus, cette bactérie acidifie les milieux dans lesquels elle se développe et peut synthétiser des bactériocines (Siegers et Entian, 1995) ; ce qui lui permet de contrecarrer le développement de microorganismes indésirables dans les produits laitiers et, par là, de participer à la préservation de la qualité hygiénique des produits.

Les nombreux travaux menés sur cette bactérie ont permis de caractériser des gènes essentiels ou présentant un intérêt technologique (gènes impliqués dans le métabolisme, la résistance au stress, la croissance, etc..) et d'élucider leurs mécanismes d'expression (Djordjevic et Klaenhammer, 1998).

Des outils et des techniques d'étude de plus en plus performants ont été mis au point : systèmes de mutagenèse et d'intégration chromosomique des gènes d'intérêt, vecteurs de clonage et d'expression constitutive ou inductible, systèmes de ciblage de protéines hétérologues dans différents compartiments de la bactérie (Bermúdez-Humarán et al., 2004a ; Nouaille et al., 2003).

En outre, les génomes des souches *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (Bolotin et al., 2001) et *L. lactis cremoris* MG1363 (Wegmann et al., 2007) ont été récemment séquencés. Grâce à ces travaux, *L. lactis* est considérée comme la BL modèle et fait partie des bactéries les mieux caractérisées avec *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Sa parfaite innocuité et le développement des connaissances sur ses capacités de production et de sécrétion de protéines hétérologues en font un bon candidat pour la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique.

L. lactis a été largement étudiée et manipulée ces dernières années pour la production de protéines hétérologues telles que plusieurs antigènes d'origine virale ou bactérienne, ainsi que des molécules biologiquement actives (cytokines, hormones, etc...) (Bermúdez-Humarán et al., 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009).

I.5.1 Production de protéines hétérologues chez *L. lactis*

Aujourd'hui, une large gamme de signaux d'expression constitutive ou inductible a été décrite chez *L. lactis* (Wells et Mercenier, 2008 ; Bermúdez-Humarán et al., 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009). Grâce à ces études, toute une gamme de promoteurs naturels constitutifs ou inductibles a été constituée.

Dans le cadre de ces études, il a été question d'utiliser deux types de promoteurs principalement : i) le promoteur constitutif fort P59 (Van der Vossen et *al.*, 1987) et, ii) le promoteur inductible à la nisine (PnisA) (De Ruyter et *al.*, 1996).

I.5.2. Le système NICE (Nisin Induced Controlled Expression)

La nisine est une bactériocine de *L. lactis* largement utilisée comme substance antimicrobienne en industrie agro-alimentaire. Onze gènes chromosomiques adjacents (nisABTCIPRKFEFG) codent pour la biosynthèse et l'immunité contre la nisine (Kuipers et *al.*, 1995). Le gène nisA correspond au gène de structure de la nisine et les gènes nisRK constituent le système à deux composantes responsable de l'induction des autres gènes du cluster.

L'étude de la régulation de la biosynthèse de la nisine a permis de mettre en évidence le processus par lequel la nisine extracellulaire se fixe sur la protéine NisK qui s'autophosphoryle et devient capable d'activer le régulateur NisR par phosphorylation. NisR active ensuite la transcription des opérons nisABTCIP et nisFEFG.

La caractérisation de la régulation de ce système a permis de mettre au point un système d'expression inductible chez *L. lactis* utilisant le promoteur du gène nisA et les gènes nisRK (Mierau et Kleerebezem, 2005) (fig.1).

Le gène d'intérêt est cloné en aval du promoteur PnisA et le plasmide est introduit dans une souche possédant les gènes nisRK (i.e. *L. lactis* NZ9000). L'addition de quantités sub-inhibitrices de nisine dans le milieu de culture déclenche l'expression du gène d'intérêt proportionnellement à la quantité de nisine présente. Ce système est aujourd'hui largement utilisé pour exprimer des protéines hétérologues chez les BL en général (Mierau et Kleerebezem, 2005).

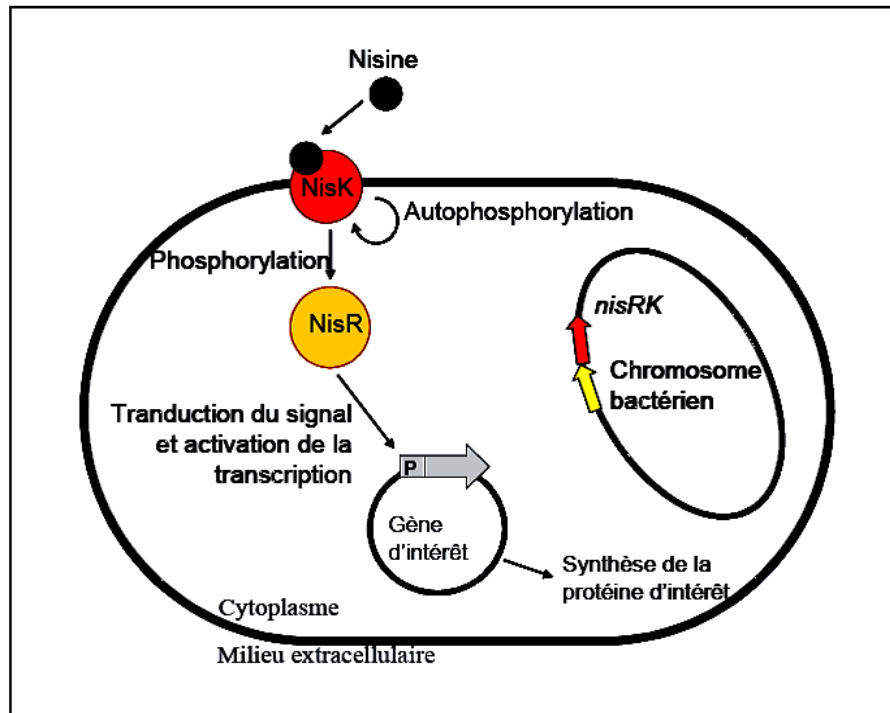


Figure 1 : Schéma du système d'expression NICE (Mierau et Kleerebezem, 2005)

I.5.3. Le système SICE (Stress Induced Controlled expression)

Bien que l'on connaisse chez les bactéries lactiques en général et chez *L. lactis* en particulier, un très grand nombre de gènes dont l'expression est régulée par divers facteurs, on ne dispose à l'heure actuelle que d'un choix restreint de promoteurs inductibles utilisables en pratique pour la construction de cassettes d'expression de gènes d'intérêt.

En effet, cette utilisation demande, non seulement que les promoteurs concernés soient inductibles, mais encore qu'il existe un différentiel d'expression suffisant entre les différents états d'induction. Idéalement, l'expression doit atteindre un niveau élevé en conditions d'induction, et être absente ou faible en conditions de non-induction.

Le système NICE est aujourd'hui le plus largement utilisé pour exprimer un gène d'intérêt en fonction de la présence ou non dans le milieu extérieur d'une bactériocine, la nisine.

Cependant, les inconvénients inhérents à ce système sont, d'une part, la nécessité de la présence de gènes régulateurs de ce système (apportés par des plasmides, ou clonés et intégrés dans le chromosome bactérien), et d'autre part, la contrainte d'une étape constituée par la mise en présence de la bactérie avec la nisine.

Dans ce contexte, les concepteurs ont cherché à mettre en œuvre un système d'expression inductible convenant pour l'expression de protéines hétérologues d'intérêt au sein de bactéries lactiques destinées à être utilisées comme vecteur thérapeutique ou vaccinal, et ont eu l'idée de rechercher un système d'expression qui serait induit lors de l'administration des bactéries au sujet que l'on souhaite traiter.

Ils sont partis de l'hypothèse que cette administration, qui place les bactéries dans des conditions très différentes de leurs conditions de vie habituelles, pouvait induire chez celles-ci différents types de stress : il peut s'agir notamment de stress thermique, si la température corporelle du sujet à traiter est suffisamment élevée par rapport à la température optimale de croissance de la bactérie administrée ; en cas d'administration orale, le stress thermique peut être accompagné d'un stress acide lors du passage dans l'estomac (où le pH est d'environ 1,5 à 2), puis d'un stress biliaire au niveau du duodénum.

Les chercheurs ont exploré la possibilité d'identifier, parmi les promoteurs des nombreux gènes identifiés comme étant induits par un ou plusieurs de ces stress (Van de Guchte et *al.*, 2002), un promoteur effectivement utilisable en pratique pour contrôler l'expression inductible de protéines hétérologues .

Ils se sont intéressés au promoteur de l'opéron GroESL de *Lactococcus lactis*. Les protéines GroES et GroEL, présentes dans de nombreuses bactéries, sont des chaperonines et des protéines de réponse au choc thermique ou hsp (pour « heat-shock proteins »).

L'opéron GroESL de *Lactococcus lactis subsp. lactis* a été décrit par Kim et *al.* (1993), qui ont rapporté que sa transcription était inductible par un choc thermique. Arnaud et *al.* (1996) ont étudié la cinétique d'induction de la transcription des gènes dnaK, dnaJ et groEL de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* pendant un choc thermique provoqué par une élévation de température, de 30 °C (température optimale de croissance de *Lactococcus lactis*) à 43°C.

Ils ont observé un niveau de transcription allant de 10 fois (pour dnaJ et groEL) à 100 fois (pour dnaK) le niveau de base pendant les 15 premières minutes du choc thermique, et diminuant après 20 minutes.

Les inventeurs ont cloné le promoteur de l'opéron GroESL de *Lactococcus lactis*, et ont testé ses capacités à contrôler l'expression d'une protéine hétérologue et son inductibilité dans des conditions reproduisant celles d'une administration *in vivo* chez l'homme. Ils ont constaté qu'en conditions basales (c'est-à-dire en conditions optimales de croissance pour *L. lactis*), le promoteur PGroESL permettait l'expression d'une protéine hétérologue, à un niveau faible, et qu'une élévation de température à 37 °C, bien que plus faible que les températures (supérieures à 40°C) habituellement utilisées pour l'induction d'un stress thermique chez *L. lactis*, suffisait pour augmenter de 1,3 à 5 fois la quantité de protéine hétérologue produite.

I.5.4. Les vecteurs d'expression.

Les chercheurs ont un système de production-exportation de protéines hétérologues chez *L. lactis* à l'aide d'une protéine sécrétée modèle très stable et bien caractérisée, la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc) (Le Loir et al., 1996). Nuc est considérée comme un bon rapporteur car son activité est très facilement détectable *In vivo* par un test de coloration sur des colonies bactériennes, en culture liquide ou extraites du tractus digestif.

Ce système est composé d'une famille de vecteurs qui permettent le ciblage contrôlé de l'expression d'une protéine à l'intérieur de la cellule, ancrée à la paroi ou sécrétée dans le milieu extérieur, pCYT, pSEC et pCWA, respectivement.

pCYT : Pour obtenir l'expression d'une protéine dans le cytoplasme, le gène d'intérêt est fusionné uniquement au promoteur PnisA.

pSEC : La voie de sécrétion utilisée dans nos travaux est la voie Sec-dépendante. Elle reconnaît des protéines synthétisées avec un peptide signal (PS) N-terminal et assure leur exportation et leur translocation (fig.2). La nature du PS utilisé pour sécréter une protéine peut beaucoup influencer l'efficacité de sécrétion de la protéine. Un des PS les plus efficaces pour sécréter protéines hétérologues chez *L. lactis* est celui de la protéine Usp45 qui est la protéine majoritaire sécrétée par *L. lactis* (van Asseldonk et al., 1993). Ainsi, le PS de cette protéine a été utilisé pour exporter de nombreuses protéines hétérologues chez *L. lactis* (Le Loir et al., 2005).

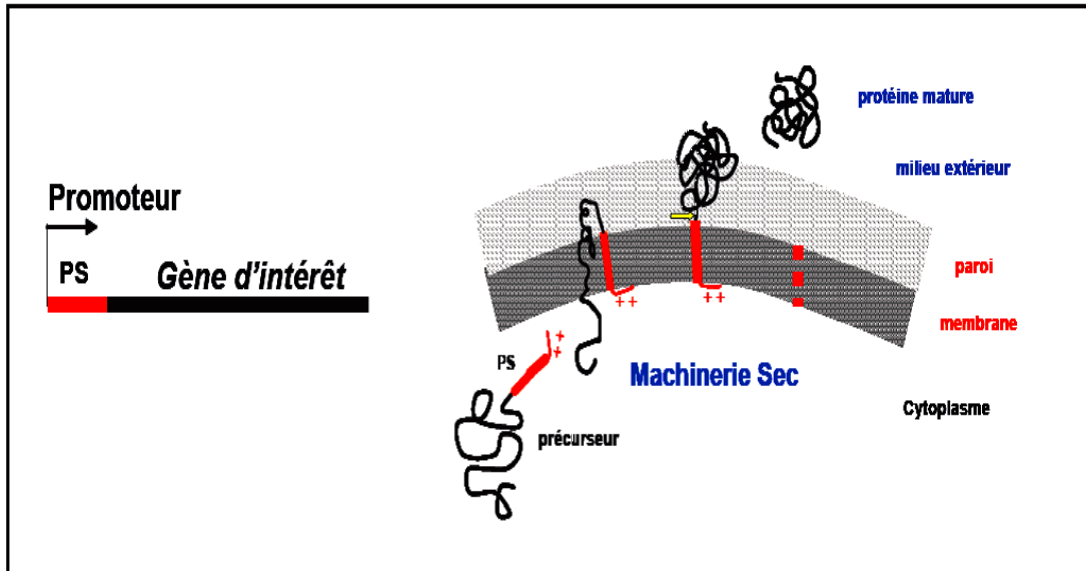


Figure 2 : Sécrétion d'une protéine d'intérêt (Van Asseldonk et al., 1993).

pCWA : Pour obtenir une protéine ancrée à la paroi de la bactérie, le gène d'intérêt est fusionné au PSUsp45 et au domaine d'ancrage de la protéine M6 de *Streptococcus pyogenes* (CWAM6) (fig.3). Ce domaine contient les signaux nécessaires pour un ancrage à la paroi (Piard et al., 1997).

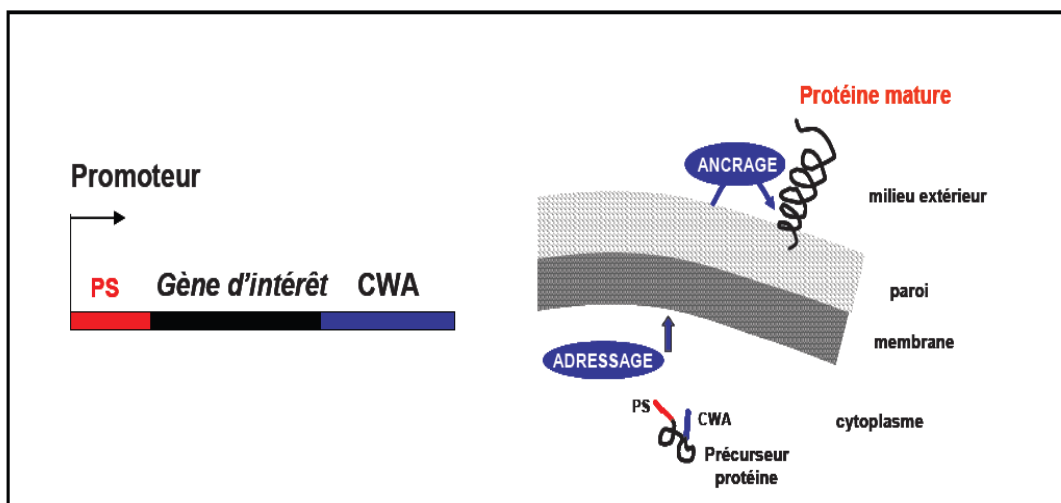


Figure 3 : Ancrage d'une protéine d'intérêt à la paroi bactérienne (Piard et al., 1997).

Ces vecteurs, fonctionnels dans un large spectre de BL, sont utilisés en routine au sein de notre laboratoire partenaire (Institut MICALIS, Jouy-en-Josas) pour la production d'une quarantaine de protéines hétérologues chez *L. lactis* (tableau 2). Plus récemment, ce laboratoire a développé différents systèmes d'expression basés sur des promoteurs inductibles aux sels biliaires qui constituent une bonne alternative au promoteur inductible à la nisine.

I.5.5. Amélioration de la production-sécrétion de protéines hétérologues chez *L. lactis*

Le Loir *et al.* (1998) ont travaillé sur des vecteurs d'expression et les facteurs de l'hôte affectant la production-sécrétion de protéines hétérologues chez *L. lactis*. Ils ont développé un vecteur (pSEC:LEISS) contenant un pro-peptide synthétique (LEISSTCDA), identifié comme « booster » de la production et de la sécrétion.

Pour les facteurs de l'hôte affectant la production-sécrétion, ils ont identifié le gène *ybdD*. L'inactivation de ce gène entraîne une surproduction des seules protéines sécrétées selon un mécanisme non encore élucidé.

Nouaille *et al.* (2006) ont aussi complété la machinerie de sécrétion de *L. lactis* avec SecDF de *B. subtilis* et ont observé une amélioration des niveaux de production et de sécrétion dans la souche résultante.

Enfin une souche de *L. lactis* qui ne produit ni l'unique protéase extracellulaire HtrA (Poquet *et al.*, 2000), ni la principale protéase intracellulaire ClpP (Frees et Ingmer, 1999) a été obtenue. Cette souche permet une production contrôlée et stable de différentes protéines hétérologues qui étaient hautement dégradées dans la souche sauvage (Cortes-Perez *et al.*, 2006).

I.6. Réponse immunitaire contre des antigènes produits par *Lactococcus lactis*

Aujourd'hui, des nombreuses études justifient l'utilisation des souches recombinantes de *L. lactis* pour induire une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009).

La première tentative d'évaluation du potentiel de *L. lactis* en tant que vaccin à administration muqueuse a été réalisée avec une souche recombinante de lactocoque produisant une forme ancrée de l'antigène protecteur (PAC) de *Streptococcus mutans* (Iwaki

et *al.*, 1990). Les souris immunisées par voie orale avec cette souche recombinante développaient des anticorps IgG sériques et IgA mucosales spécifiques du PAC.

Ces résultats montrent pour la première fois que *L. lactis* peut être utilisée comme un vecteur pour délivrer un antigène au système immunitaire. Toutefois, c'était Wells et *al.* (1993) qui rapportèrent pour la première fois l'utilisation d'une souche recombinante de *L. lactis* vivante produisant le fragment C de la toxine tétanique (TTFC) comme antigène modèle, pour protéger des souris contre un challenge léthal avec la toxine tétanique après administration sous-cutanée de la souche recombinante.

Plus tard, le même groupe de chercheurs évalue l'effet de l'administration par voie orale ou nasale de souches recombinantes de lactocoques produisant le fragment C de la toxine tétanique (TTFC) chez la souris (Norton et *al.*, 1996 ; Robinson et *al.*, 1997).

L'immunisation orale chez la souris avec ces lactocoques recombinants entraîne une réponse humorale (i.e. anticorps IgG sériques et IgA mucosales spécifiques du TTFC) moins importante que l'administration intra-nasale, mais l'efficacité protectrice mesurée (c'est-à-dire le défi avec la toxine tétanique) était la même.

Plusieurs études ont été menées après ces travaux pour analyser l'expression de nombreuses protéines hétérologues d'origine virale, bactérienne ou eucaryote chez *L. lactis* (Bermúdez-Humarán et *al.*, 2004a) (tableau 2).

L'objectif de notre laboratoire partenaire est l'induction d'une réponse présentation de protéines d'intérêt médical telles que des cytokines, des antigènes, des allergènes et des antioxydants par des BL.

Dans cette partie du chapitre, nous décrivons les trois projets les plus marquants de l'équipe « interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte » de l'institut MICALIS de Jouy-en-Josas, et qui concernent la production de protéines d'intérêt santé par *L. lactis* et comportant tous une phase de construction de souches suivie d'une phase d'expérimentation chez l'animal :

a) construction de souches vaccinales de *L. lactis* afin de protéger et lutter contre le papillomavirus humain de type 16 (HPV-16),

b) prévention et traitement des allergies à la β lactoglobuline (BLG) avec des lactocoques recombinants produisant la BLG et l'interleukine-12 (IL-12) ; et iii) utilisation

des lactocoques recombinants producteurs de leptine humaine en vue du traitement de l'obésité.

I.7. Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI)

Les MICI se caractérisent par une inflammation chronique atteignant principalement le tube digestif. La formation d'infiltrats de cellules pro-inflammatoires va causer de nombreux dommages tissulaires et cellulaires au sein du tube digestif caractéristiques des MICI dont les causes demeurent inconnues. On distingue principalement deux MICI : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).

Il est parfois difficile lors des premières manifestations cliniques de savoir à laquelle des deux maladies on est confronté. Il existe cependant une différence fondamentale : l'inflammation observée dans la RCH atteint toujours le rectum et peut « remonter » sur le côlon, d'un seul tenant, sans laisser d'intervalle de muqueuse saine. Elle ne touche en aucun cas d'autres segments du tube digestif.

En revanche, dans le cas de la MC, l'inflammation peut atteindre toutes les parties du tube digestif (depuis la bouche jusqu'à l'anus) mais se situe préférentiellement sur la partie terminale de l'intestin grêle (iléon) et sur le côlon. La MC fut décrite pour la première fois en 1932 par Burril B. Crohn, médecin américain, qui lui a donné son nom suite à la description de 14 cas d'affection localisée au niveau de l'iléon.

En ce qui concerne l'épidémiologie, en 2001, on comptait un nouveau cas par an pour 1000 habitants au sein des pays industrialisés (Fournet et Dhumeaux, 2001).

A l'échelle mondiale, on peut observer une différence entre l'hémisphère nord et l'hémisphère sud. En effet, la maladie est plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord, on retrouve également plus de cas en milieu urbain qu'en milieu rural. Le plus fréquemment, l'âge moyen des personnes atteintes se situe entre 15 et 30 ans (Société Nationale Française de Gastroenterologie, 1999a, b; Baumer, 2002).

I.7.1. Bactéries recombinantes et MICI

Les probiotiques naturels peuvent être efficaces contre les inflammations grâce à leurs propriétés intrinsèques. A présent, nous allons voir que les BL peuvent également être utilisées comme outils afin de véhiculer des protéines anti-inflammatoires au sein du tube digestif et constituer ainsi des probiotiques recombinants.

L'originalité du concept BLGM (Bactéries Lactiques Génétiquement Modifiées) réside dans le fait d'utiliser des BL qui possèdent différents avantages telles que :

a) leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe), qui indique qu'elles sont non invasives et non pathogènes (Salminen *et al.*, 1998; Bermudez-Humaran, 2004).

b) leur utilisation intensive dans l'industrie alimentaire (intervenant à 70% du chiffre d'affaire de l'industrie laitière française, par exemple).

c) leurs capacités à résister à l'environnement *in vivo* et à persister au sein du tube digestif.

Tous ces paramètres sont essentiels, et leurs confèrent d'excellents avantages en tant que vecteurs de protéines d'intérêt santé.

L'utilisation des BLGM dans la recherche est décrite depuis une dizaine d'année : elle permet d'une part, d'étudier les mécanismes d'action de certaines protéines et d'autre part, de délivrer une protéine d'intérêt santé au sein de l'environnement intestinal.

Parmi les protéines d'intérêt santé véhiculées, on retrouve des antigènes (Ag) bactériens ou viraux (Cortes-Perez *et al.*, 2009), des enzymes (Matsumoto *et al.*, 2005), des interleukines (Schotte *et al.*, 2000) ou encore des agents antioxydants (Han *et al.*, 2006).

La BL modèle utilisée dans ce domaine est *L. lactis*, coque à Gram positif, aérobie strict, largement utilisé dans l'industrie fromagère (notamment dans la fabrication du Cheddar, fromage le plus consommé dans le monde).

De nombreux outils moléculaires sont disponibles pour cette bactérie et le génome de la souche avec laquelle nous travaillons, à savoir *L. lactis* MG1363, est séquencé. De plus, elle sécrète peu de protéines et seule l'Usp45 est visible après coloration au bleu de Coomassie (Van Asseldonk *et al.*, 1990), elle ne contient pas de plasmide et ne sécrète pas de protéases (Chopin *et al.*, 1984) ; ce qui en fait une bonne candidate hôte de production de protéines.

En effet, *L. lactis* est un formidable outil moléculaire mais sa survie au sein du tube digestif est faible (0.1 à 2%) (Klijn *et al.*, 1995), cela est notamment dû à sa faible capacité à résister à la lyse lors du passage dans le duodénum (Vesa *et al.*, 2000).

De plus, il ne s'agit pas d'une bactérie probiotique or, il est assez intéressant lors de l'utilisation de BLGM dans le traitement des MICI de combiner les effets anti-inflammatoires de la souche sauvage avec l'action anti-inflammatoire de la molécule hétérologue produite par cette même souche.

I.7.2. Les modèles d'études

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement des MICI et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, il a été nécessaire de mettre au point différents modèles d'études *in vitro* et *in vivo* reproduisant au plus près les phénomènes physiologiques ayant lieu lors d'une colite humaine.

Parmi les modèles d'études *In vitro*, la multiplication des modèles cellulaires utilisant les lignées cellulaires épithéliales HT-29 et Caco-2 ou encore de cellules mononucléaires de sang périphérique « Peripheral Blood Monocyte cell » (PBMC) sont couramment utilisées afin de cribler des souches bactériennes selon un profil anti-inflammatoire ou encore d'étudier leurs mécanismes d'actions (Imaoka *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les modèles d'études *in vivo*, on retrouve :

a) les colites induites chez le modèle murin avec des agents chimiques tels que l'éthanol, l'acide acétique, les polysaccharides sulfatés « dextran sodium sulfate » (DSS) (Yamada *et al.*, 1992; Kitajima *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008)

b) les colites induites par l'activation du système immunitaire induisant ainsi la prolifération des lymphocytes T (LT) « 2,4,6-tri nitrobenzen sulfonic acid » (TNBS) (Foligne *et al.*, 2007a)

c) l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés, développant spontanément des colites tels que les souris knock-out IL-10 (KO IL-10), animaux dont le gène codant pour l'IL-10 est invalidé (Sheil *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2007).

I.7.2.1. Les modèles d'études in vitro : modèles cellulaires d'origine humaine.

- Cellules immunitaires d'origine sanguine.

Les «peripheral blood monocyte cell » (PBMC) » utilisées ont pour origine le sang humain. Elles permettent l'analyse de la réponse immunitaire, car mises en co-culture avec des bactéries, elles vont réagir et produire des cytokines (IL-10, IL-12, IFN-g...)

qui permettent de déterminer le potentiel anti-inflammatoire des souches étudiées (Foligne *et al.*, 2007b).

- Lignées cellulaires épithéliales d'origine intestinale: cellules HT-29 ou Caco 2

Originellement issues d'adénocarcinome colique humain, elles sont maintenues en culture par passages successifs. Stimulées avec un agent pro-inflammatoire (TNF- α ou IL-1 β) elles vont produire de l'IL-8 dont la modulation par la bactérie est analysée par des tests ELISA (Sokol *et al.*, 2008).

- Lignées de cellules HT-29 transfectées par un gène rapporteur dont l'expression est sous le contrôle d'éléments de réponse à NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription prés hétérodimétrique, qui induit la transcription des gènes intervenant dans de nombreux processus comme le contrôle d'inflammation et la réponse immunitaire. Une activité trop importante de **NF- κ B** entraîne une synthèse accrue de protéine anti-apoptotiques qui se traduit par l'apparition de certains cancers.

Construite afin d'étudier le facteur de transcription NF- κ B impliqué dans l'inflammation intestinale, cette lignée cellulaire contient un plasmide comprenant le gène de la luciférase (luc) qui est utilisé en tant que gène marqueur. En présence d'ATP dans le milieu, la luciférase est responsable d'une émission lumineuse facilement détectable. Sous le contrôle d'éléments de réponse à NF- κ B, la mesure de l'activité luciférase après coculture de la lignée de cellules HT-29 et de souches bactériennes permet de déterminer le profil inflammatoire des souches ainsi que leur mode d'action (Lakhdari *et al.*, 2009).

I.7.2.2. Les modèles d'études *in vivo* : modèles murins d'inflammation intestinale

L'étude des modes d'actions et des effets anti-inflammatoires des souches bactériennes sur les modèles *in vitro* ne sont pas suffisant pour caractériser une souche comme ayant des effets potentiellement bénéfiques contre les inflammations chez l'homme. Il est nécessaire de tester ces souches sur des modèles plus complexes, rassemblant l'ensemble du système immunitaire et de l'écosystème intestinal tels que des modèles murins.

Bien que les modèles de colites murins soient essentiels à l'étude des mécanismes d'action ainsi qu'à la recherche de nouveaux traitements anti-inflammatoires, il est important de savoir que les colites induites, quelles qu'elles soient, ne reproduisent que partiellement les

MICI. La complexité de ces maladies, l'intervention de différents facteurs déclenchants et l'absence de maladies semblables chez le modèle murin, sont des facteurs limitant dans le développement de ces modèles.

À l'heure actuelle, les symptômes sont reproduits artificiellement, utilisant l'injection d'agents chimiques ou modifiant le système immunitaire. Les modes d'actions des colites animales sont donc différents en fonction du modèle choisi, c'est pourquoi il reste indispensable d'utiliser plusieurs modèles pour une même étude et ainsi permettre de se rapprocher au mieux des colites induites chez les patients atteints de MICI.

I.7.2.2.1. Le modèle DSS : Dextran Sodium Sulfate

L'ajout de DSS dans l'eau de boisson des souris pendant 7 à 10 jours va reproduire les symptômes d'une colite aiguë, représentant le premier stade d'inflammation de la RCH chez l'homme. Mis au point par Okayasu en 1990, son mode d'action reste encore à élucider, pour autant, son utilisation dans l'étude des effets anti-inflammatoires de souches bactériennes est très courante (Okayasu *et al.*, 1990).

Le mode opératoire consiste à administrer oralement les souches bactériennes aux souris pendant 9 jours par sondage intra-gastrique à hauteur de 10^9 UFC par souris. Au 2^{ème} jour, l'ajout du DSS dans l'eau de boisson est effectué, la dose peut varier de 1 à 5% selon le type de colites que l'on souhaite obtenir (modérée à sévère), le sacrifice des souris a lieu au 9^{ème} jour (fig.4).

Les effets anti-inflammatoires des souches sont évalués selon plusieurs critères (Schultz *et al.*, 2004) dont:

- **L'évaluation clinique quotidienne** selon une échelle de 0 à 4, qui comprend la consistance et la présence de sang dans les fèces ainsi que la perte de poids, la moyenne des trois critères permettant d'obtenir un score d'activité.

- **Un score histologique** selon une échelle de 0 à 4, qui comprend la sévérité et l'extension de l'inflammation et les dommages causés aux cryptes, l'ensemble en fonction du pourcentage d'atteinte de la muqueuse. La somme des trois critères permettant d'obtenir le score histologique (fig. 5).

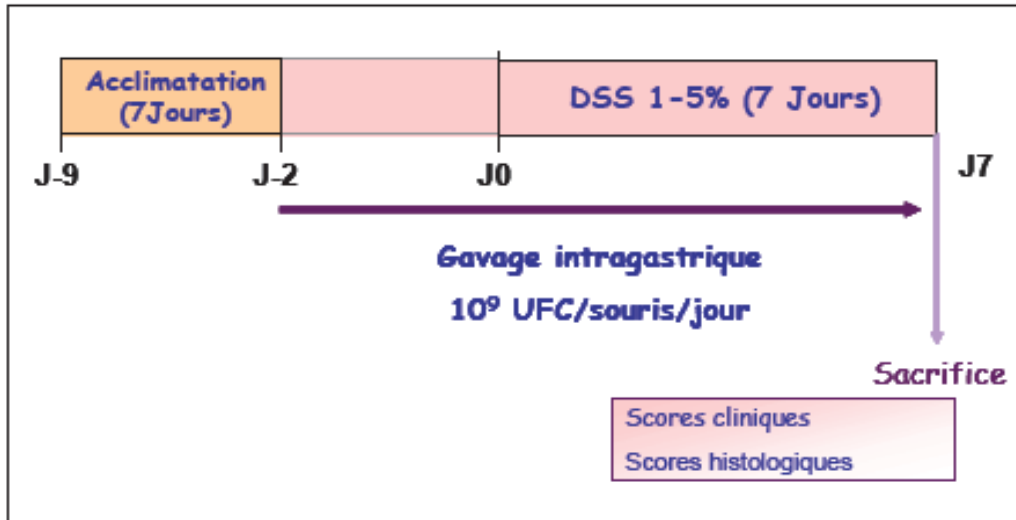


Figure 4 : Mode opératoire d'induction de la colite murine au DSS (Akayasu *et al.*, 1990).

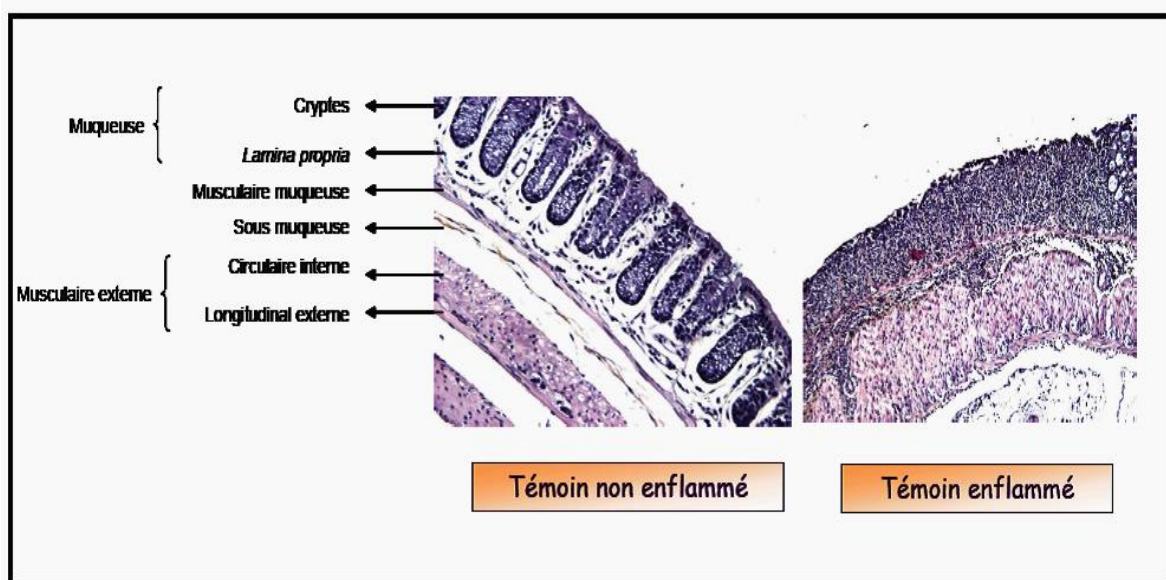


Figure 5: Coupe histologique de muqueuse murine enflammée ou non avec du DSS (Watterlot *et al.*, 2010).

I.7.2.2.2. Le modèle TNBS (Trinitro-Benzen-Sulfonic Acid)

La colite induite par l'injection de TNBS reproduit plus spécifiquement les symptômes de la maladie de Crohn (MC), le TNBS est un haptène qui va se lier aux protéines des tissus et stimuler ainsi l'immunité à médiation cellulaire Th1 *via* l'activation des LT.

Le mode opératoire consiste à administrer oralement les souches bactériennes aux souris pendant 7 jours par sondage intragastrique à hauteur de 10^9 UFC/souris/jour. Au 5^{ème} jour, l'injection par voie intra-rectale de TNBS est effectuée, la dose varie de 50 mg/Kg à 150 mg/Kg. Le sacrifice des souris a lieu au 7^{ème} jour (fig. 6).

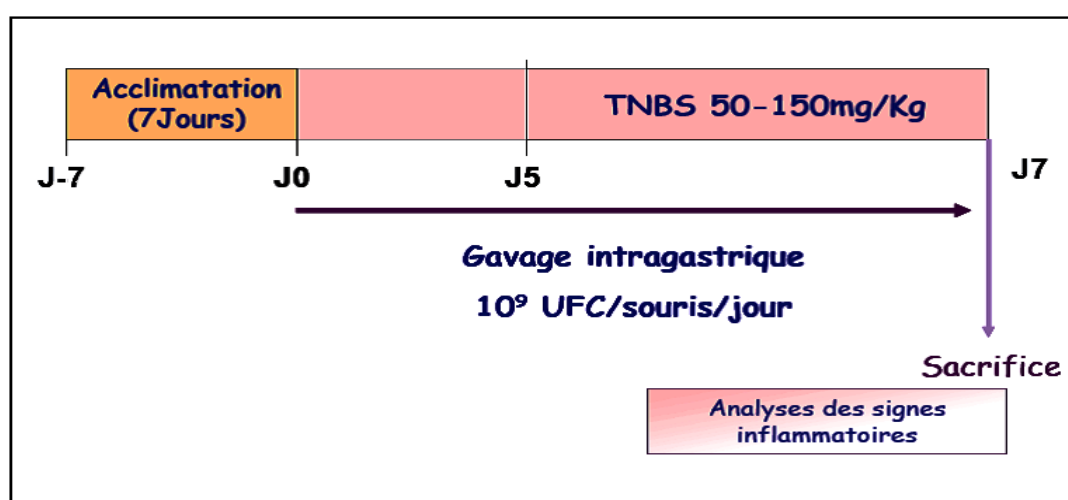


Figure 6: Mode opératoire d'induction de la colite murine au TNBS (Wallace *et al.*, 1989).

L'évaluation des effets anti-inflammatoires des souches est basée sur plusieurs critères comportant :

- **Les scores cliniques** qui sont établis selon deux principaux critères i) la détermination du poids des souris le jour de l'administration du TNBS puis 48 h après et ii) l'état général des souris selon une échelle de 0 à 2 (vitalité, recroquevillement, dos rond...) ainsi que l'aspect visuel (poils hérissés, abîmés...).
- **L'analyse du côlon** par la détermination de la longueur et du calibre distal et moyen.
- **Les scores des selles** : il est établi selon une échelle de 0 à 5, en fonction de la consistance et de la présence de sang dans les fèces.
- **Les scores macroscopiques de Wallace** : ils sont établis selon une échelle de notation de 0 à 10, en fonction de l'état macroscopique de la muqueuse du côlon : la présence d'ulcères,

l'épaississement de la paroi, le nombre de sites d'ulcérations et d'inflammations majeures (fig. 7) (Wallace *et al.*, 1989).



Figure 7: Muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS

(Watterlot *et al.*, 2010)

- **Les scores histologiques** sont établis selon une échelle de notation de 0 à 6, en fonction de l'état microscopique de la muqueuse du côlon : la présence d'infiltrats inflammatoires, d'ulcérations et de nécroses de la muqueuse et de la sous muqueuse, cela en fonction du pourcentage de la muqueuse atteinte (fig.8) (Ameho *et al.*, 1997).

I.7.3. Construction de souches vaccinales de BL afin de protéger et de lutter contre l'HPV-16

Le papillomavirus humain de type 16 (HPV-16) est un des virus à potentiel oncogène que l'on retrouve (avec le type 18) dans plus de 90 % des cancers du col de l'utérus (300 000 décès par an dans le monde) (Castellsagué, 2008).

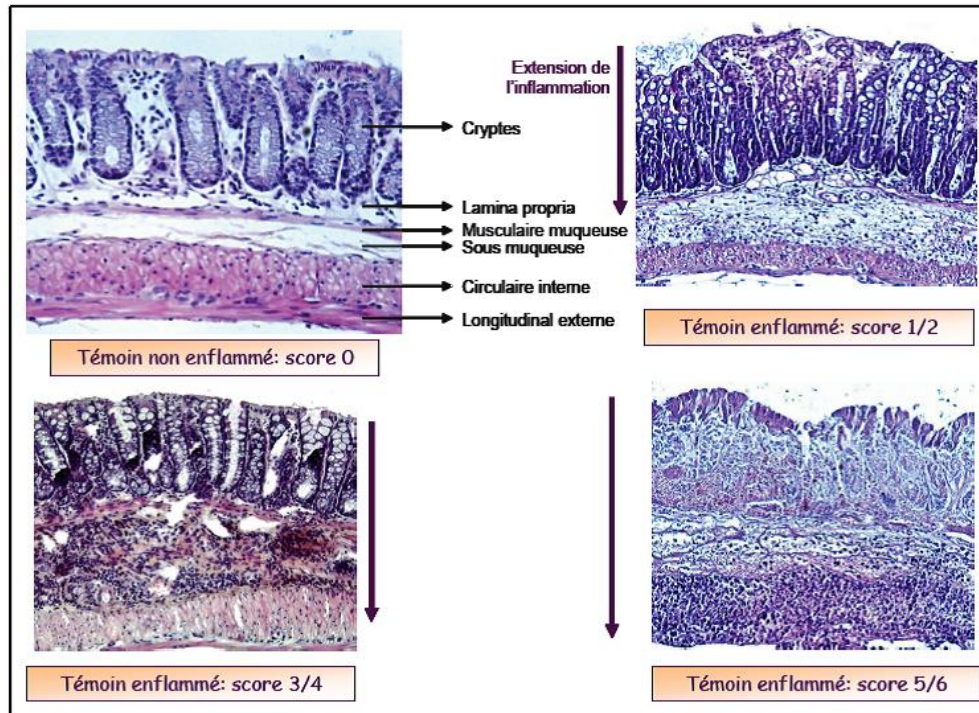


Figure 8: Coupe histologique de muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS et évaluées selon le score histologique (Ameho *et al.*, 1997).

L'HPV-16 fait partie de la famille des *papovaviridae*. Son génome est constitué d'environ 8000 pbs, sa capsid de forme icosaédrique est formée à partir de deux protomères L1 et L2 qui s'associent en 72 capsomères (douze pentons et soixante hexons). Ce virus est dépourvu d'enveloppe et sa taille est de l'ordre de 50 nm (fig. 9).

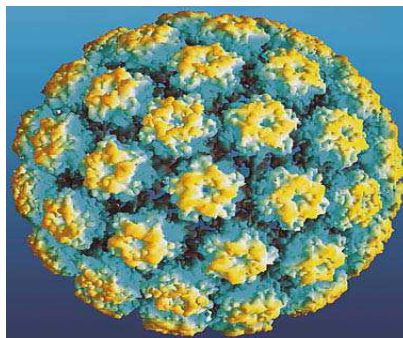


Figure 9: Structure de la capsid de l'HPV-16 (Smotkin et Wettstein, 1986).

L'Ag E7 est exprimé depuis les cellules eucaryotes infectées par l'HPV-16 et contribue ainsi au développement du phénotype malin. L'Ag E7 est une phosphoprotéine composée de 98 acides aminés, de masse moléculaire 19 KDa et dépourvue d'activité enzymatique (Smotkin and Wettstein, 1986).

Cette phosphoprotéine possède un domaine de liaison au zinc à l'extrémité COOH terminale impliqué dans la stabilité de la protéine. Du côté NH₂ terminal, on retrouve une petite région analogue à celle de la protéine E1A des adénovirus et de l'Ag T des polyomavirus, impliquée dans la perturbation du cycle cellulaire.

C'est ainsi, que l'Ag E7 interagit avec plusieurs composants cellulaires et notamment des protéines suppresseurs de tumeur telles que Rb (protéine du retinoblastome), dérégulant ainsi le cycle cellulaire des cellules épithéliales et provoquant leur multiplication anarchique (fig. 10) (Baker *et al.*, 1987; Dyson *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1989; Zwerschke and Jansen-Durr, 2000). C'est à travers ce processus que la protéine E7 participe à la prolifération et à l'immortalisation de la cellule infectée induisant le développement du cancer.

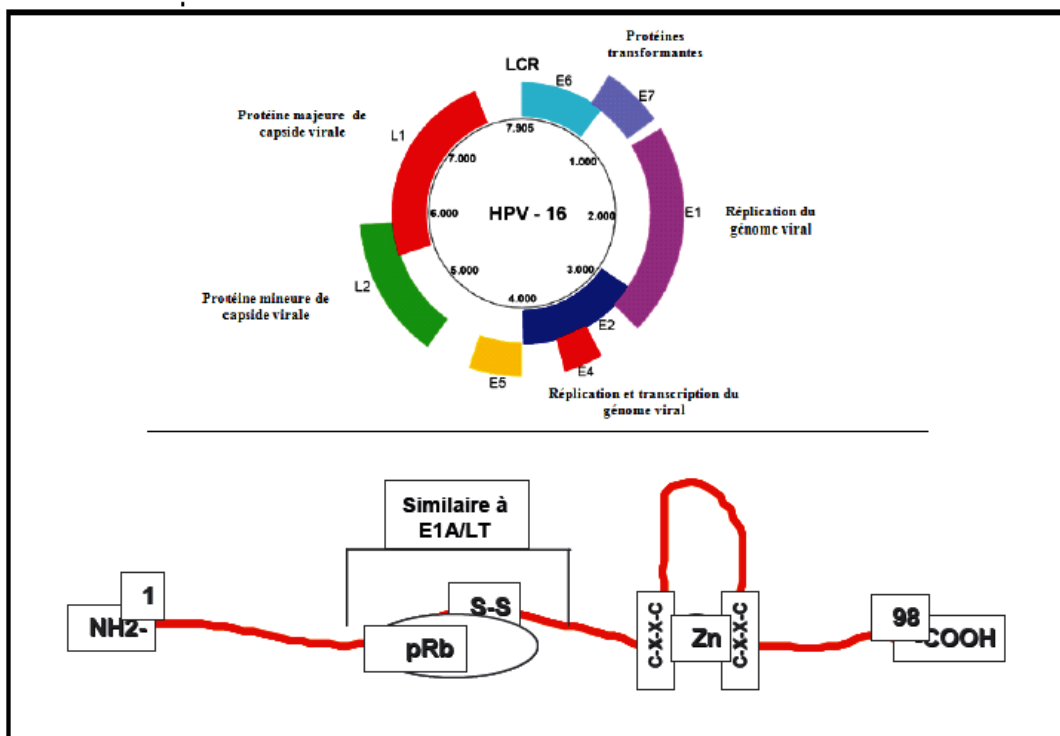


Figure 10 : Organisation génétique de l'HPV-16 et structure de la protéine E7 (Schiller *et al.* 2008).

Bien que la protéine E6 soit également impliquée dans le processus, les études ont démontré que le transcrite de E7 et sa protéine sont plus abondants (Smotkin and Wettstein, 1986). En conséquence, la protéine E7 semble être le candidat le plus adapté pour étudier la réponse immunitaire et développer de nouveaux vaccins contre l'HPV-16.

Lors d'une immunisation induite par la présence de la protéine au sein de l'organisme, ce dernier va activer des macrophages, des LT et induire des Ac dirigés spécifiquement contre la protéine virale E7.

De précédentes études concernant les mécanismes de la réponse immunitaire induite par l'HPV-16 restent ambiguës. Il semblerait que l'ensemble des voies Th1 et Th2 interviennent, notamment par l'augmentation des cytokines telles que l'IFN- γ (appartenant au groupe Th1) et l'IL-5 (appartenant au groupe Th2) (De Jong *et al.*, 2004; Warrino *et al.*, 2004; Warrino *et al.*, 2005). Dans nos travaux, nous avons choisi d'analyser plus spécifiquement ces deux cytokines caractéristiques de la réponse immunitaire induite par l'antigène E7.

Les stratégies actuelles pour prévenir ou traiter l'infection par ce virus sont prometteuses mais coûteuses. Des vaccins prophylactiques basés sur des VLPs (virus-like particles) ont récemment induit des baisses significatives des infections à l'HPV-16 et l'HPV-18, ainsi que des cancers associés à ces infections lors d'essais cliniques humains (Schiller *et al.* 2008).

Cependant, ces vaccins agissent seulement au niveau de l'infection et n'ont aucun effet thérapeutique. Par ailleurs, leur coût encore très élevé limite leur utilisation dans les pays en voie de développement où l'on dénombre environ 80 % de décès liés au cancer associés à l'HPV.

Dans ce projet, l'équipe de Schiller a utilisé *L. lactis* pour délivrer deux protéines:

a) l'antigène E7 du HPV-16, protéine retrouvée systématiquement dans des carcinomes provoqués par des infections par des HPV et un des antigènes candidats pour le développement d'une thérapie anti-HPV

b) l'interleukine-12 (IL-12), molécule à laquelle Metzger (2009) attribua une action stimulatrice de la réponse immunitaire cellulaire lors d'infections.

Dans un premier temps, Schiller *et al.* (2008) ont construit une souche génétiquement modifiée de *L. lactis* sécrétant de façon stable l'antigène E7, alors que l'E7 fut décrite auparavant par Bermúdez-Humarán *et al.* (2002) comme une protéine très labile, et qui ont

par la suite ciblé l'expression de l'E7 dans trois localisations différentes (i.e. cytoplasme, paroi et milieu extracellulaire).

L'administration nasale de trois souches recombinantes exprimant l'E7 induit une réponse immune spécifique de l'E7 chez la souris chez laquelle une immunogénicité accrue de la forme ancrée de l'E7 fut observée (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004b).

Bermúdez-Humarán *et al.* (2004b) ont ensuite construit une souche recombinante de *L. lactis* sécrétant l'IL-12. Cette cytokine déjà utilisée avec succès en immunothérapie et oncologie n'avait jusqu'alors jamais été produite chez une bactérie à Gram positif.

En effet, une des difficultés concernant la production d'IL-12 est qu'elle requiert l'assemblage de deux sous-unités (p35 et p40) par un pont disulfure. Pour cela, Bermúdez-Humarán *et al.* (2003a) avaient développé des souches de *L. lactis* permettant la production de:

- a) de protéines p35 et p40, donnant une forme hétérodimérique native de l'IL-12.
- b) d'une protéine de fusion des deux sous-unités de l'IL-12 (scIL-12). L'activité biologique de l'IL-12 produite par *L. lactis* a été ensuite confirmée *In vitro* sur des cellules de rate de souris, puis *In vivo* par administration intra-nasale à des souris.

Ces mêmes auteurs ont, également, mesuré le potentiel adjuvant de ces souches recombinantes de lactocoques en les associant à la souche de *L. lactis* produisant la forme ancrée de l'antigène E7.

Deux années plus tard, ce même groupe de chercheurs (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2005) a évalué les capacités préventives et curatives de la combinaison de ces deux lactocoques par la mise en place d'un modèle murin chez lequel ils induisent des tumeurs par implantation sous-cutanée de cellules tumorales exprimant l'antigène E7 de l'HPV-16 « cellule tumorales » (TC-1), et dont ils mesurent l'évolution suite à l'administration intra-nasale de souches.

Ils ont ainsi évalué les effets préventifs et curatifs de la co-administration intra-nasale chez la souris de souches de lactocoques produisant E7 et IL-12 sur le développement de la tumeur TC-1. Leurs résultats démontrent que l'administration préventive de lactocoques avant l'injection des cellules tumorales induit l'absence de développement de tumeurs chez 50 % des animaux immunisés.

Bermúdez-Humarán et *al.* (2005) ont ainsi constaté un effet adjuvant significatif de l'IL-12 co-délivrée avec l'antigène E7 dans la mesure où en l'absence de la souche produisant l'IL-12, ils notent l'absence de tumeurs dans seulement 25 % des souris immunisées.

Ces auteurs observent, également, que les souris immunisées avec LL-E7 et LL-IL12 sont capables de résister à un second défi (2 mois après la première immunisation) suggérant que l'immunité induite est durable.

L'utilisation thérapeutique de ces souches chez des souris où les tumeurs sont déjà implantées, provoque la régression totale des tumeurs chez 35% des animaux traités. Ces effets anti-tumoraux sont la conséquence d'une réponse cytotoxique dépendante des lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Ces résultats chez la souris constituent la première mise en évidence d'un effet préventif et curatif contre le cancer du col de l'utérus par vaccination muqueuse avec des souches recombinantes de lactocoques. Le vaccin, disponible actuellement en France, a un coût très élevé (près de 150 € la dose à raison de trois doses par personne vaccinée), ce qui limite son utilisation dans les pays en voie de développement.

Il faut cependant souligner que ces stratégies basées sur des bactéries transgéniques demeurent aujourd'hui des modèles d'étude non encore autorisés chez l'Homme. Ces derniers temps, on peut cependant noter une évolution sensible concrétisée entre autres par les premiers essais cliniques de Phase I menés chez l'Homme avec des souches de lactocoques sécrétrices d'IL-10 (Baat et *al.*, 2006).

I.7.4. Prévention et traitement des allergies à la β -lactoglobuline bovine (BLG) avec des lactocoques recombinants produisant la BLG et l'interleukine 12 (IL-12).

La prévalence des allergies alimentaires a particulièrement augmenté au cours des 20 dernières années (Lack, 2008). Les réactions et manifestations allergiques résultent de l'induction, chez des sujets génétiquement prédisposés, de lymphocytes T auxiliaires (ou Th pour T « helper ») de type 2 (Th2) contre certaines protéines alimentaires inoffensives normalement tolérées par l'organisme ; ces protéines deviennent des allergènes.

Il existe dans l'organisme une régulation fine entre les différentes sous-populations lymphocytaires Th1, Th2 et Th17. Cette régulation résulte d'actions inhibitrices de ces différentes populations les unes envers les autres, et/ou du fait de l'activation de cellules régulatrices (Treg). Les lymphocytes Th1 sont sécrétors des cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-12 et l'interféron gamma (IFN- γ), qui favorisent l'induction d'une immunité à médiation cellulaire et la production d'IgG2a chez la souris (IgG1 chez l'homme) (O'Garra, 1998).

L'IL-12 inhibe le développement des lymphocytes Th2 qui sont, quant à eux, sécrétors de cytokines anti-inflammatoires qui conduisent à la production d'IgE spécifiques et inhibent le développement des cellules Th1 (IL-4, IL-13). L'induction modérée de cellules spécifiques de type Th1 pourrait donc permettre la modulation des cellules Th2 spécifiques d'allergènes, responsables de la sensibilisation allergique (production d'IgE spécifiques d'un allergène) et de la réaction allergique (apparition de symptômes suite à un test de provocation).

Plusieurs études suggèrent que certaines bactéries probiotiques, dont certaines BL, pourraient agir favorablement et participer au maintien de cet équilibre Th1/Th2. Elles représentent donc des bonnes candidates pour réguler les maladies allergiques.

Grâce à un modèle murin d'allergie alimentaire à la bêta-lactoglobuline bovine (BLG) (Adel-Patient et *al.*, 2003), un des allergènes majeurs du lait de vache, ils ont pu étudier l'effet de la co-administration par voie orale ou intranasale de lactocoques recombinants produisant la BLG et l'IL-12 sur la sensibilisation allergique.

Grâce au suivi de la réponse immunitaire spécifique induite chez ces souris (dosage des anticorps spécifiques et des cytokines Th1/Th2), ils ont démontré que l'administration intra-nasale de lactocoques recombinants stimule de façon significative une réponse immunitaire Th1 par rapport aux souris contrôles. Ce pré-traitement permet de prévenir la sensibilisation allergique à la BLG (c'est-à-dire la production d'IgE spécifiques et de cytokines Th2) et le déclenchement de la réaction allergique chez les souris (éosinophilie locale) (Cortes-Perez et *al.*, 2007b).

De plus, Cortes-Perez et *al.* (2009b) ont montré l'effet positif de l'administration thérapeutique des lactocoques produisant la BLG sur certains marqueurs de l'allergie au lait de vache. Enfin, ils ont mis en évidence que l'administration nasale de la souche sécrétant

l'IL-12 diminue aussi les manifestations allergiques dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine (Wu *et al.*, 2006).

I.7.5. Utilisation de souches recombinantes de *L. lactis* productrices de la leptine humaine en vue du traitement de l'obésité.

L'obésité constitue un problème mondial de santé publique et les traitements susceptibles de réduire ce problème ont un très fort potentiel thérapeutique. Bermúdez-Humarán *et al.* (2007) ont développé des lactocoques recombinants producteurs de la leptine humaine, hormone produite principalement par l'adipocyte, qui informe le cerveau de l'état des réserves adipeuses.

Chez la souris obèse (ob/ob), la déficience en leptine conduit à une obésité massive. Les travaux de ces auteurs ont eu pour objet de mesurer les effets de l'administration nasale d'une souche de *L. lactis* sécrétant la leptine humaine chez des souris ob/ob.

Dans un premier temps, ils ont construit une souche de *L. lactis* sécrétant efficacement la leptine humaine biologiquement active. Ils ont ensuite déterminé si l'administration intranasale de LL-Lep (lire souche recombinante *Lactococcus lactis* productrice de leptine) pouvait inhiber la prise alimentaire et donc la prise de poids des souris ob/ob.

Bermúdez-Humarán *et al.* (2007) ont ainsi observé que l'administration quotidienne de cette souche recombinante de *L. lactis* à ces souris obèses réduisait de façon significative le gain de poids et la prise alimentaire. Ces résultats démontrent que la leptine est produite sous forme active par *L. lactis* recombinée et que cette souche peut être utilisée avec succès pour réguler le poids corporel et la consommation des aliments.

L'ensemble de ces résultats confirme tout le potentiel des lactocoques recombinants en tant que vecteurs de protéines d'intérêt santé et laissent espérer que de telles souches de BL recombinantes seront un jour autorisées afin d'apporter de nouvelles solutions dans le futur pour la prévention et le traitement de maladies.

Dans une autre étude, Chang *et al.* (2003) ont construit une souche recombinante de *Lb. jensenii*, une bactérie commensale du vagin, pour exprimer et sécréter un domaine de la protéine de liaison à la protéine gp120 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), CD4, et ils ont démontré que la co-incubation de cette bactérie recombinante avec un virus VIH

portant le gène rapporteur luciférase (i.e. VIH-1HxB2) entraîne une diminution significative de l'entrée de ce virus dans des cellules HeLa (exprimant le récepteur CD4-CXCR4-CCR5) *In vitro*.

En plus de leur application en tant que vaccin, les lactobacilles peuvent aussi être utilisés pour délivrer de molécules anti-infectieuses ou produits antimicrobiens *In situ*. Un exemple est l'utilisation de souches recombinantes de lactobacilles pour prévenir la carie dentaire dans un modèle animal (Krüger et *al.*, 2002).

I.8. Conclusion et perspectives

Au cours des cinq dernières années, l'intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques pour délivrer des molécules d'intérêt a considérablement augmenté, ce qui s'est traduit par des avancées significatives rassemblées au sein de cette revue bibliographique.

En dépit de ces progrès, beaucoup de questions restent en suspens notamment au niveau de la réponse immune générée chez l'hôte par les antigènes natifs de la BL utilisée comme vecteur ou encore le mode d'administration orale ou intra-nasale. Actuellement, le mode d'administration intra-nasale paraît le plus adapté pour induire une bonne réponse immune aux niveaux systémiques et mucosal mais il reste à s'assurer de l'aspect sanitaire de ces administrations.

Les applications thérapeutiques ont évolué de telle manière que l'on peut raisonnablement envisager l'utilisation de BL recombinantes en prévision et lors du traitement de pathologies humaines dans les prochaines années.

Des systèmes de confinement biologique ont été mis au point afin d'empêcher la dissémination de ces BL recombinantes (Steidler et *al.*, 2003). Cette stratégie a permis la mise en place d'un premier essai clinique de phase I (Braat et *al.*, 2006) qui est une étape essentielle dans des utilisations futures de ces outils très prometteurs.

Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

II.1.Souches bactériennes et plasmides utilisés

II.1.1. Cultures bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont reportées dans le tableau 3. La souche *E.coli* est cultivée dans le milieu Luria-Bertani (LB, Difco Laboratories, England) à 37°C avec agitation et *Lactococcus lactis* est cultivé dans le milieu M17 (Difco Laboratories, England) additionné de 0.5% de glucose (GM17) à 30°C. Les clones sont sélectionnés par l'addition d'antibiotique (la concentration d'antibiotique est pour *E. coli* ils sont sélectionnés par l'addition de chloramphénicol à (10µg/mL) et d'ampicilline (100 µg/mL), pour *Lactococcus lactis* on ajoute au milieu du chloramphénicol à (10µg/mL).

II.1.2.Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée selon la méthode décrite par Sambrook et al. (1989) (fig.11) à partir de cultures des clones obtenus sur milieux additionnés de différents antibiotiques cités auparavant (tableau 3).

Cette extraction est effectuée avec des kits commerciaux (Promega, USA) (fig. 11). Ces kits de réactifs sont également connus sous les noms abrégés de miniprep, midiprep et maxiprep en fonction du volume de la culture bactérienne utilisée.

L'utilisation de petites colonnes du kit (Promega) équipées d'un filtre à résine permet l'amélioration la pureté de l'ADN obtenu. L'extraction est ensuite contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 1% en appliquant une tension de 5 à 10 V/cm. Le tampon de migration TBE (Tris-Borate-EDTA) a pour rôle de garder le pH constant, d'assurer la solubilité des molécules qui migrent et de permettre une bonne séparation. Il doit être le plus inerte possible vis-à-vis des molécules d'ADN. On utilise du glycérol permettant d'augmenter la densité de l'échantillon et faciliter son dépôt dans un puit et un marqueur de mobilité qui est un colorant (bleu de bromophénol ou BBP) permettant de suivre le front de migration (Sambrook et al., 1989).

Tableau3 : les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans ce travail (Benbouziane *et al.*, 2013)

E coli TOP10	Souches compétentes	TOPO KIT Invitrogen
L lactis MG1363	Souche dépourvue de plasmides dérivée de <i>L. lactis</i> NCDO712	Gasson (1983)
LL-pMEC243	Souche dérivée de <i>L. lactis</i> MG1363 contenant le plasmide pMEC243	Foligne et al.(2008)
LL-pLB44	Souche dérivée de <i>L. lactis</i> MG1363 contenant le plasmide pLB44	Ce travail
LL-pLB333	Souche dérivée de <i>L. lactis</i> MG1363 contenant le plasmide pLB333	Ce travail
LL-pLB356	Souche dérivée de <i>L. lactis</i> MG1363 contenant le plasmide pLB356	Ce travail
LL-pLB350	Souche dérivée de <i>L. lactis</i> MG1363 contenant le plasmide pLB350	Ce travail
Plasmides		
pCR@2.1	Ap Vecteur TOPO	
pLB141	Cm ^R ; plasmide pGK (contient le gène Nuc spécifiant le précurseur de la Nucléase de <i>hylococcus</i> secrété sous contrôle du cripte promoteur inductible PnisA	Morello et al.(2002)
pLB22	Cm ^R ; plasmide pGK, sous le contrôle transcriptionnel du promoteur PnisA, code pour la fusion PS _{LcoB} -E7	Bermudez-Humaran et al.(2002)
pLB44	Cm ^R ; dépourvue de plasmide pGK	Bermudez-Humaran et al.(2007),
pMEC243	Cm ^R , dérivé du plasmide pNZYR (réplique de pSH71 chez <i>L. lactis</i>) exprimant et secrétant IL10 murin sous le contrôle transcriptionnel du promoteur usp45	Foligne et al.(2008)
pLB270	Cm ^R , plasmide, codant pour IL-10 murin sous le contrôle transcriptionnel de <i>PnisA</i> .	Motta et al.(2002)
pLB263	AP, vecteur pCR-TOPO contenant le promoteur groESL	Ce travail
pLB333	Cm ^R , plasmide pGK (codant pour la Nuc sous le contrôle transcriptionnel du promoteur <i>PnisA</i>) (<i>casette SP_{Exp4}-NucB</i>)	Ce travail
pLB356	Cm ^R , plasmide pGK (codant pour le HPV-16 E7 sous le contrôle transcriptionnel du promoteur <i>PnisA</i>) (<i>casette SP_{Exp4}-E7</i>)	Ce travail
pLB350	Cm ^R , plasmide pGK (codant pour l'IL-10 sous le contrôle du promoteur <i>GroESL</i>) (<i>casette SP_I</i>	Ce travail

1. Prélever, dans un microtube 1.5 ml des cultures bactérienne transformés puis centrifugation à 12000 g/5 min (14000 rpm/min) a T° ambiante.

2. Rajouter au culot 200 µl de solution resuspension R (glucose, EDTA, Tris pH8, Rnase) + 50 µl de lysozyme à 50 µg/ml pendant 01h/37°).

- 250 µl de solution de lyse (retournement pour faciliter la lyse) 4 fois.

- Ajouter 10µl de solution de dénaturation de protéine (protéinase) retournement 4 fois.

3. Ajouter 350 µl de solution de neutralisation Acétate de sodium (précipite les protéines et ADN chromosomiques) un précipité blanc apparait, centrifuger pendant 10min pour séparer l'ADN puis récupérer le surnagent.

4. Placer sur le microtube une colonne de filtration (silice), déverser le surnagent sur la colonne et centrifuger pendant 1 min.

5. Transférer la colonne dans un nouveau microtube et déverser 750 µl de solution de lavage, répéter la même opération avec 250 µl puis centrifuger pendant 1min.

6. Transférer la colonne dans tube de 1.5 ml et ajouter 70µl de solution d'elution (Nucléase Fee-water).

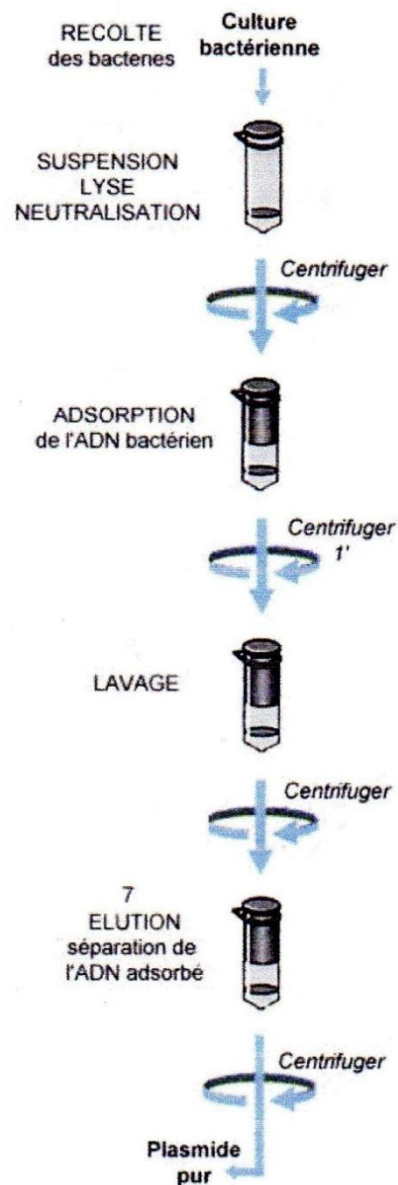


Figure 11 : Extraction de l'ADN plasmidique selon le Quickprotocol-Promega (Sambrook et *al.*, 1989).

Le Bromure d'éthidium (BET), un colorant fluorescent, est utilisé en biologie moléculaire pour le marquage et la détection des acides nucléiques. Il s'agit d'un hétérocycle organique (composé organique cyclique à chaîne fermée) à noyaux accolés qui se lie à l'ADN bicaténaire par intercalation. Du fait de la planéité de sa structure, cette molécule possède cette propriété d'intercalation entre les paires de base des acides nucléiques, où sa fluorescence dans le visible est exaltée. Elle est révélée par excitation sous illumination par UV (300 nm) en plaçant le gel sur un lecteur UV. Il occupe un site inter-bases sur deux jusqu'à saturation.

L'amplification par PCR a été effectuée avec un thermocycleur (Applied Biosystème, USA) utilisant l'enzyme Mix (Fermentas, Fisher Scientific, France). Les séquences d'ADN sont analysées automatiquement par la compagnie MWG (Genomic Company, Allemagne) (fig.12).

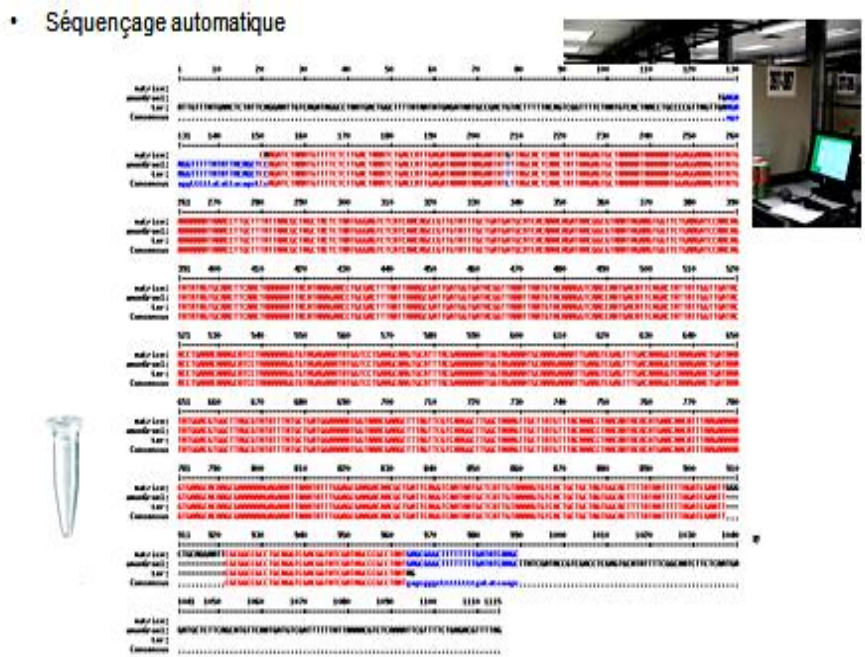


Figure 12: Séquençage automatique d'ADN analysés par la compagnie MWG (Genomic Company, Allemagne).

II.2. Construction d'un plasmide avec un système inductible aux stress pour la production de protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis*.

Un système de production-exportation de protéines hétérologues chez *L. lactis* à l'aide d'une protéine modèle très stable et bien caractérisée, sécrétée par *staphylococcus aureus*, la nucléase (**Nuc**), a été développé selon la méthode de Morello et al. (2008). La Nuc est considérée comme un bon rapporteur car son activité est très facilement détectable par un test de coloration sur des colonies bactériennes.

Pour construire un plasmide d'où le gène d'intérêt est cloné en aval d'un promoteur inductible aux stress afin d'exprimer la protéine hétérologue, il faut cloner le promoteur groESL (insert) de la souche *lactococcus lactis* MG1363 dans le vecteur pLB141. Ce dernier est utilisé pour sécréter la nucléase chez *staphylococcus aureus*.

Le plasmide obtenu est introduit dans une souche de *Lactococcus lactis* compétente MG1363.

Le fragment d'ADN correspondant à la séquence 241 pb codant pour le promoteur groESL de *lactococcus lactis* a été amplifié par PCR via l'utilisation des amorces suivantes :

Amorce 1 : BglIIProGroESL (5'-CCAAGATCTAAAT GTTTTCTCTTGACTAAATCTGACC-3')

pour le brin sens

Amorce 2 : NheI-ProGroESL(5'AGCTAGCGTTAATAAAGCAAGGTTTATTTTTTTCATATAC-3')

pour le brin anti-sens

Le fragment résultant de la PCR a été cloné dans pCR®2.1 formant ainsi le plasmide pLB263. Dans ce plasmide, le promoteur groESL est cloné dans une direction anti-sens.

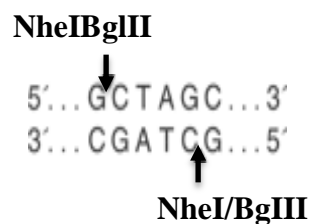
Le fragment d'ADN contenant le promoteur GroESL (insert) a été obtenu à partir du plasmide pLB263 après digestion par les enzymes de restriction BglII/NheI (Fermentas) et cloné dans un vecteur purifié. Celui-ci est aussi obtenu après la digestion par BglII/NheI du pLB141 (vecteur) (fig.13).

Dans ce vecteur final, le gène Nuc est fusionné dans un fragment d'ADN contenant SPExp4 (voir ci-dessus). Enfin, le plasmide pLB333 résultant est cloné dans *Lactococcus lactis* MG1363 donnant la nouvelle souche recombinante LL-pLB333 (Benbouziane *et al.*, 2013).

Pour mettre au point notre protocole de digestion, il nous a fallu déterminer la quantité d'enzyme nécessaire à une digestion totale ainsi que les conditions de la digestion. L'évaluation de la concentration de nos plasmides a été effectuée lors de la migration sur gel d'agarose par comparaison de l'intensité de nos bandes à celle du marqueur qui est connue. On détermine ainsi la quantité d'ADN dont on dispose pour les digestions selon sa taille par rapport au marqueur GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000 pb (Fermentas, Fisher Scientifique, France) (fig.14).

II.2.1.Digestion

Il s'agit d'endonucléases d'origine bactérienne qui scindent la molécule d'ADN au niveau de sites spécifiques, les sites de restriction, définis par une séquence nucléotidique particulière. Les fragments d'ADN double brin produits, ou fragments de restriction, ont ainsi une taille bien définie. Les enzymes utilisées sont BglII et NheI (Fermentas, Fisher Scientifique, France) qui ont les sites de reconnaissances suivants :



II.2.2. Purification de l'ADN plasmidique

La purification de l'ADN plasmidique à partir d'extrait de gel d'agarose est réalisée selon une procédure simple utilisant le système QIAquick® PCR purification Kit (QIAGEN, Pays-Bas) selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989).

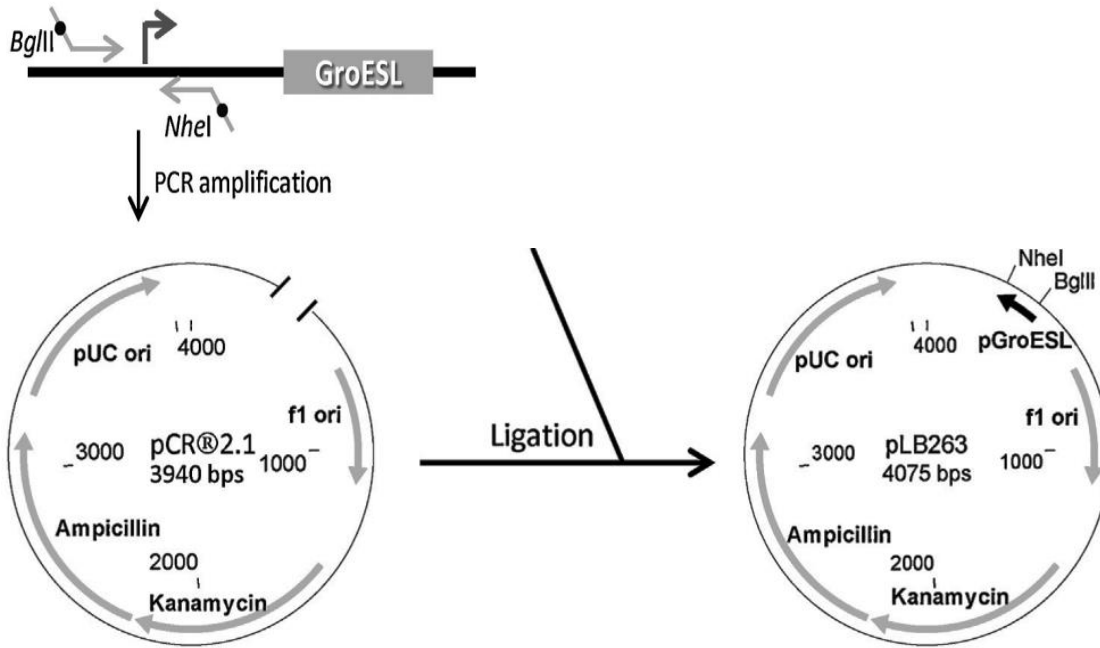


Figure 13 : Schéma de construction de plasmides et représentation de la cassette de pGroESL (Benbouziane *et al.*, 2013).

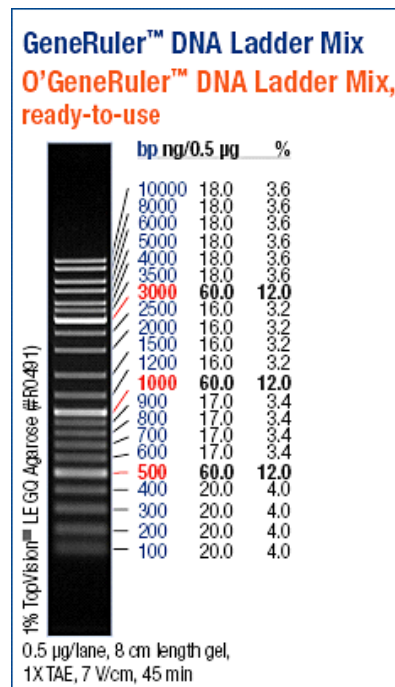


Figure 14 : Marqueurs utilisés lors des électrophorèses sur gel d'agarose à 1 % (GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000 pb (Fermentas, Fisher Scientifique, France).

Les bandes de gel contenant les fragments que l'on souhaite purifier sont découpés à l'aide d'un scalpel sous lumière UV. Les fragments qui nous intéressent sont la bande à 241pb pour le pLB263 et la bande à 3493 pb pour le pLB 210. Les fragments sont tout d'abord mélangés et dissouts avec 5 volumes de tampon QG (*Buffer QIA quick Gel Extraction*) contenant un indicateur de pH, permettant la détermination facile du pH optimal pour la purification de l'ADN.

Ce mélange est ensuite transféré sur une colonne QIA quick pour réaliser une chromatographie d'adsorption. L'éluat de chromatographie est centrifuge à 12000 g pendant 1 min à température ambiante puis on élimine le surnageant.

Il s'agit ensuite de laver l'ADN resté sur la membrane de la colonne avec 750µL de tampon de lavage puis centrifuger à 12000 g pendant 1minute. Une dernière centrifugation « à sec » pour éliminer le tampon de lavage puis la colonne est transférée dans un microtube propre. Le tampon d'éluion est ajouté pour décrocher l'ADN de la membrane puis on centrifuge une dernière fois. L'ADN purifié est ensuite dosé par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (Castella et al., 2006).

II.2.3. Ligation

La ligation consiste à relier des molécules d'ADN à l'aide de l'enzyme ADN ligase qui forme des liaisons phospho-diester entre les nucléotides. L'ADN a été digéré partiellement par les endonucléases bactériennes BglII et NheI qui ont généré des extrémités cohésives 5' débordantes.

Ce type d'extrémités est apte à s'apparier par des liaisons hydrogène dans des conditions de température correctes (16 à 25°C). Une fois les réassociations préparées par la formation de liaisons faibles, la ligase va refaire les liaisons covalentes entre les deux extrémités d'ADN à condition que l'une soit 5'P et l'autre 3'OH. Dans notre cas, elle permet de former le plasmide pLB333 contenant le promoteur GroEL (fig. 15).

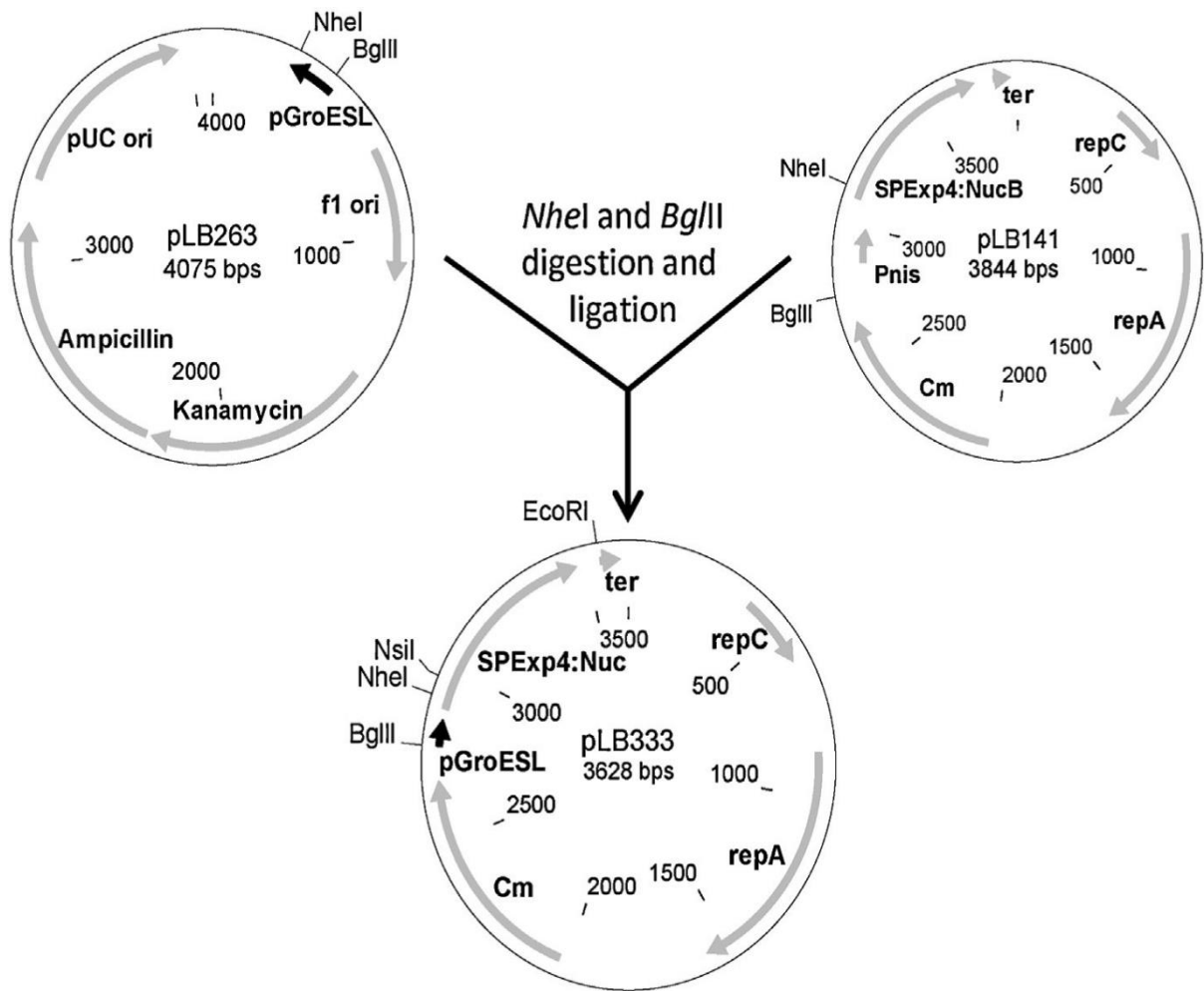


Figure 15 : Les étapes de construction du plasmide final pLB333 (Benbouziane *et al.*, 2013).

II.2.4.1. Préparation des souches *Lactococcus lactis* compétentes MG1363

L'inclusion du plasmide précédemment construit dans les souches de *Lactococcus lactis* compétentes MG1363 est réalisé selon la méthode ci-après décrite par Sambrook *et al.*, (1989).

La veille, on repique une colonie de *Lactococcus lactis* MG1363 dans 6 mL GM17+ Sacc (saccharose) + glycine 1% (300µl de glycine à 20% dans 5.7 mL de GM17 + Sacc) qui est laissée en incubation pendant la nuit à 30°C (Langella *et al.*, 1993).

Le lendemain, on prépare une solution de lavage composée de Sacc-gly (saccharose 0.5M, glycérol 10%) et une solution comportant 30% de PEG 3000 (Poly Ethylène Glycol) et 10% de glycérol à 4°C. On procède à une dilution de la culture bactérienne au 1/50 dans une solution GM17 + Sacc + glycine 2% et lorsque la DO à 600 nm atteint 0.4, on commence les lavages à froid du culot de la culture avec, à chaque fois, un volume de 30 mL de la solution de Sacc-gly, suivis de plusieurs centrifugations de 15 min à 4700 tours/min à 4°C (cette opération est répétée 4 fois).

En fin de procédure, on reprend le culot dans 1mL de PEG3000 30%-glycérol 10% que l'on répartit par volumes de 100 µl dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL qui sont mis sous congélation dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

II.2.4.2. L'électroporation

Les plasmides peuvent être introduits dans une bactérie rendue préalablement compétente par traitement thermique ou choc électrique ; c'est le phénomène d'électroporation. Une fois introduit dans l'hôte bactérien, l'ADN plasmidique se réplique normalement et exprime immédiatement les gènes d'intérêt.

Cette technique consiste à appliquer un champ électrique au niveau du tissu cible après l'injection d'ADN. L'électroporation utilise l'effet d'impulsions électriques pour déstabiliser la membrane cellulaire pendant de courtes périodes, permettant ainsi la pénétration du plasmide ou d'autres molécules. Cette technique a été préalablement développée pour améliorer l'entrée dans la cellule de molécules ou principes actifs peu perméables. Cette méthode appliquée à l'ADN a été utilisée pour la première fois chez *E. coli* par Gibson *et al.* (1984) et chez *Lactococcus lactis* par Langella *et al.*, (1993).

La procédure consiste à décongeler 100 µl de cellules compétentes (*Lactococcus lactis* MG1363) dans la glace (5-7 min) et on rajoute un volume (5µl) de plasmide (100 ng de plasmide) dans le tube selon sa concentration de manière suffisante pour en tester l'efficacité.

Les composants de mélange sont ensuite laissés en contact environ 10 min avant d'être transférés dans une cuve d'électroporation froide stérile dont l'appareillage associe le « Gene Pulser » (BioRad, Hercules, CA, USA), réglé à 25 µF (Farad), 2.4 KV/cm (kilovolt), et le « Gene controller » (BioRad, Hercules, CA, USA) réglé à 200 Ohms.

Le tube à essai contenant le mélange est retiré de la cuve stérile et placé dans une autre cuve contenant 900 µl de M17 glucose et saccharose 0.5M (à température ambiante) sur laquelle l'électrochoc est appliqué. La souche compétente *Lactococcus lactis* MG1363 électroporée avec le plasmide est laissée s'exprimer pendant 3h à 30°C (fig.17). Après cela, on ensemence des boîtes de pétri contenant du GM17 sans antibiotiques pour le contrôle négatif et du M17 glu-sacc 0.5M avec antibiotique (par exp : Chloramphénicol 10µg/ml) avec cette culture (fig.16).

II.3. Détection de l'activité biologique de la Nucléase (Nuc) par test colorimétrique

Pour détecter la Nuc produite par la souche LL-pLB333 et déterminer son activité, la souche est cultivée dans le milieu glucosé GM17+ 10µg de chloramphénicol par mL pendant une nuit à 30°C sans agitation. Le lendemain, cette culture est diluée au 1/100 et laissée incuber à 30°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique atteignant 0.6 à $\lambda = 600$ nm.

Ensuite, on procède à l'induction des cultures à la chaleur (42°C/20 min) et aux sels biliaires (15 ng/mL), puis on dépose des spots de ces cultures et de celles non induites sur boîte de pétri contenant du milieu méthyl vert-DNA Agar (Difco laboratories, England).

Les boîtes de pétri sont incubées à 30°C pendant une nuit pour mesurer les concentrations et photographier les résultats. Comme témoin négatif, nous avons utilisé une souche de *L. lactis* transformée avec un vecteur videpWV01 (pLB44) appelée LL-pLB44 (se référer au tableau 1).

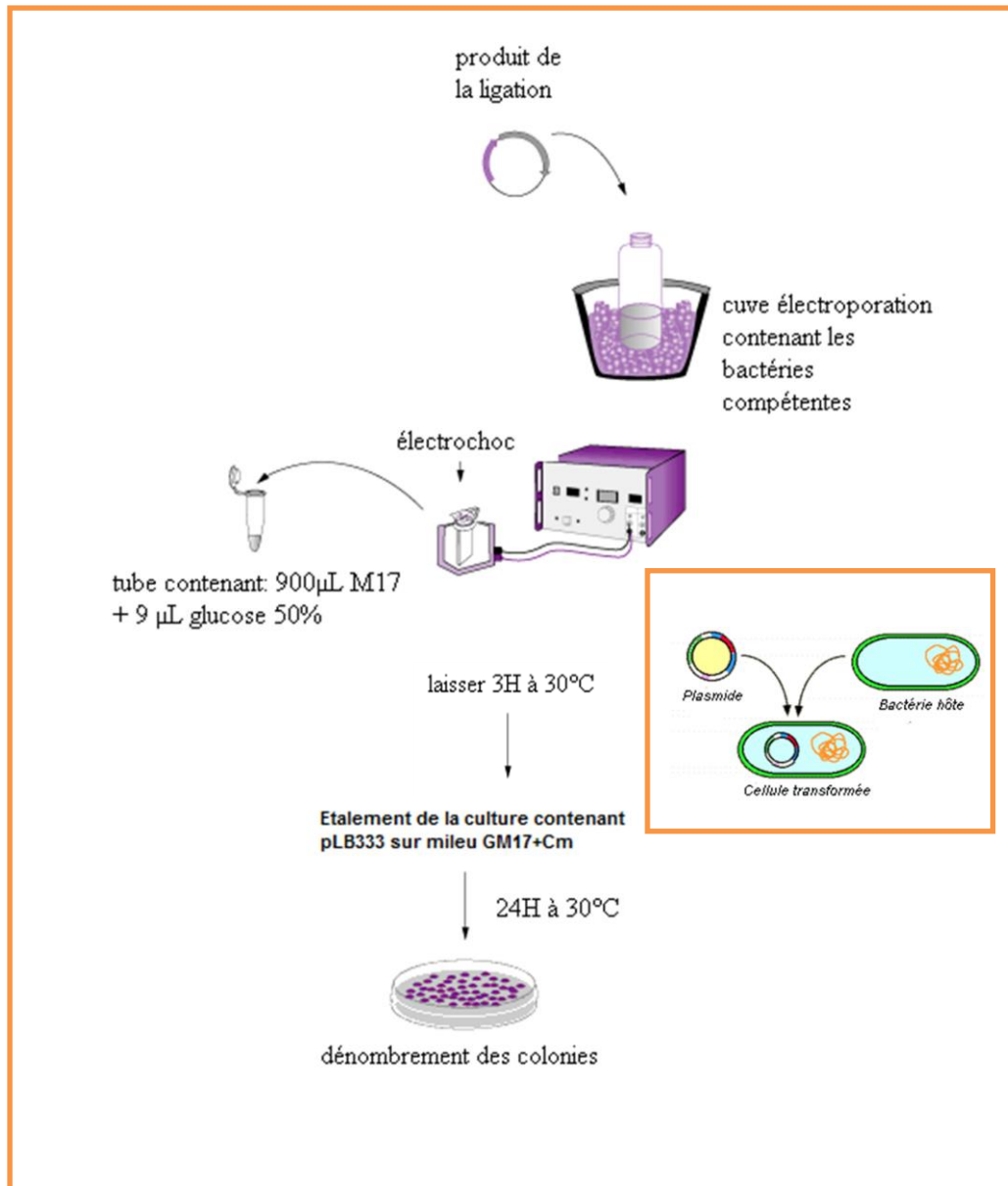


Figure 16 : Techniques de clonage et d'électroporation utilisées (Langella *et al.*, 1993).

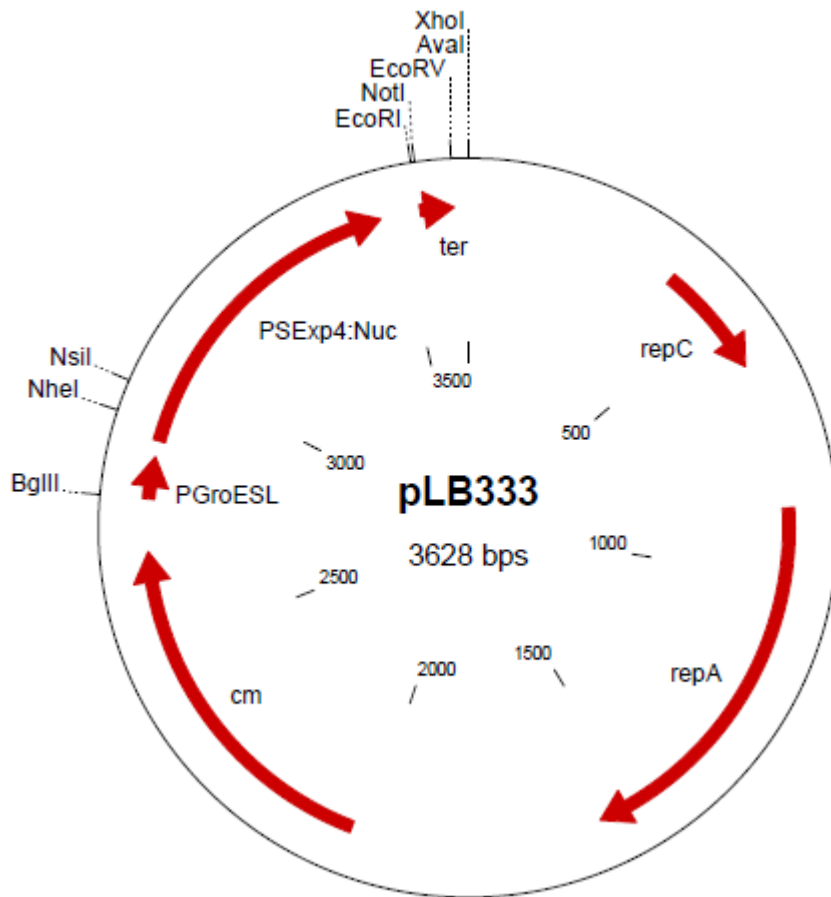


Figure 17: Schéma du plasmide **pLB333** sécrétant la **Nuc** sous le contrôle de **SICE** chez *Lactococcus lactis* (Benbouziane *et al.*, 2013).

II.4. Construction d'un vecteur inductible exprimant IL10 chez *L. lactis*

Pour la production d'interleukine murin IL10, la séquence d'ADN codant pour IL10 est obtenue après la digestion du plasmide pLB 270 par les enzymes NsiI/NotI ensuite clonée dans le vecteur pLB333 qui a subi lui aussi la même digestion avec les mêmes enzymes pour remplacer la partie correspondante à la Nuc (fig.17).

En utilisant les mêmes techniques de clonage citées auparavant (se référer à la fig.18), le vecteur résultant pLB350 est cloné dans la souche *L. lactis* MG1363 pour donner la souche LL-pLB350.

Pour détecter l'IL-10, les cultures de LL-pLB350 sont incubées une nuit à 30°C pour avoir une croissance équivalente à une densité optique comprise entre 2 et 2.5 à $\lambda = 600$ nm. Après cela, on procède à une extraction des protéines et immuno-détection selon la procédure décrite dans ce qui suit.

II.4.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines est effectuée à partir de 2 mL d'une culture induite qui sont centrifugés (5 min, 17500 \times g) pour recueillir le culot cellulaire et le surnageant que l'on traite séparément (fig.19).

Les protéines du surnageant (S) sont précipitées en ajoutant 100 μ L de d'acide trichloroacetic (TCA) à 100% ; celui-ci va modifier les liaisons responsables de leur structure primaire.

La précipitation de ces protéines est stimulée ensuite par séjour des tubes 10 min dans de la glace. Après 10 min de centrifugation à 17500 \times g à 4°C, le surnageant est éliminé et les protéines sont récupérées pour être re-suspendues dans une solution de NaOH 50 mM et de bleu de charge pour Western. Le fait de travailler à 4°C réduit l'activité protéasique.

Tandis que pour le culot (C) bactérien, il est remis en suspension dans un tampon TES (Tris-EDTA-Sacharose) + Lys-Anti-protéase [Tris-HCl 50 mM à pH 8, EDTA 1mM, Saccharose à 25%] – Lysoenzymes 10 mg/mL – anti-protéase à 1 mg/mL) incubé à 37°C pendant 30 min afin de fragiliser les membranes des *L. lactis*. Le tampon permet de maintenir un pH proche des conditions physiologiques.

On rajoute du SDS (Sodium Dodécyle Sulfate) à 20% pour que la protéine développe une charge globale négative, additionné un tampon de charge DTT (Di ThioTreitol) à 1M. Le DTT est un agent réducteur qui permet d'éviter la formation de ponts disulfures.

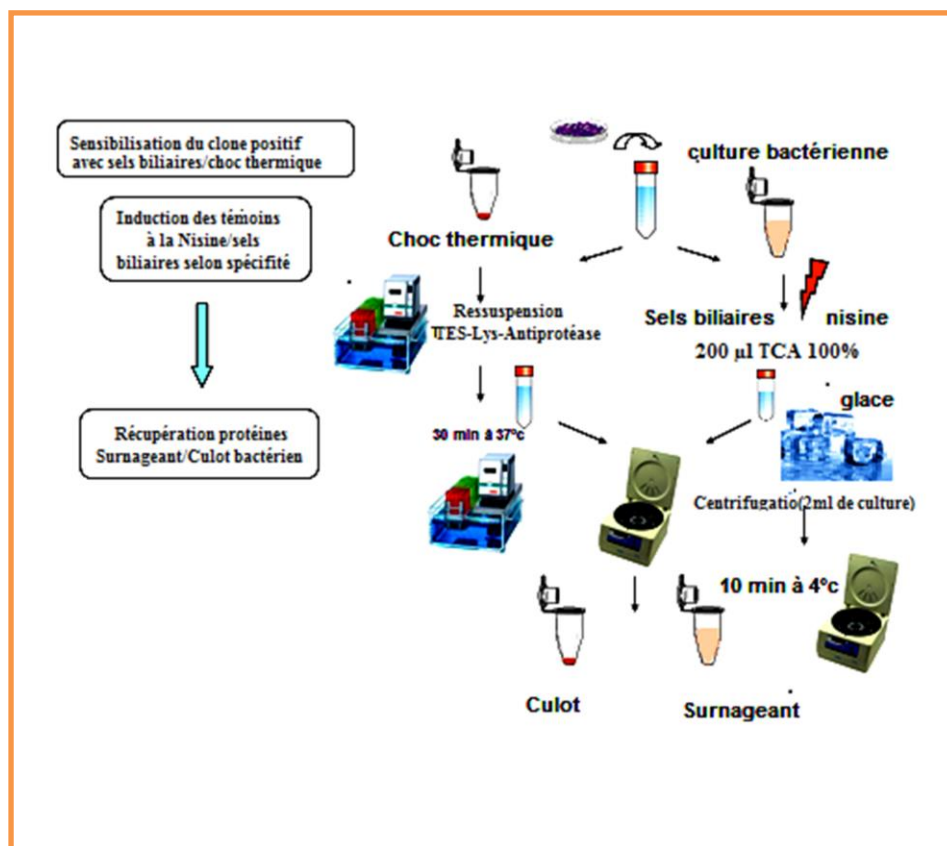


Figure 19 : Extraction des protéines des culots et des surnageant des cultures de *L. lactis*MG1363 renfermant le pLB350 exprimant IL-10

II.4.2. Western Blot

On effectue une électrophorèse SDS-PAGE de nos protéines en conditions dénaturantes (Chauffage 90 C°/3 min), sur un gel pré-coulé à 12% de polyacrylamide (Invitrogen, Fisher Scientific, Strasbourg, France).

Après une migration sous 150V-150 mA (milliampères) pendant 1h30, on réalise ensuite un transfert sur membrane Hydrophobic polyvinylidene difluoride (PVDF). Le blot se réalise par électro-transfert (application d'un champ électrique perpendiculaire au gel) pour favoriser la migration des protéines du gel vers la membrane.

Après le lavage de la membrane au TBST (Tris Buffer Saline Tween), on sature ensuite les sites non spécifiques de la membrane par la caséine du lait, cette étape est importante car la membrane, de par ses propriétés absorbantes, pourrait fixer de manière non spécifique les anticorps AC de détection (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002).

Un anticorps primaire anti-IL10 permettra la liaison spécifique à l'IL10 sur la membrane (Millipore, Ref. AB1492P, Sigma-Aldrich®, Suisse) pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages au TBST, l'anticorps secondaire est rajouté sur la membrane pendant 1h à température ambiante. Il s'agit de la protéine G (Protéine G-PRH ; Biorad, France) (la Peroxydase de Raifort) à une dilution de 1/5000^{ème}.

Pour révéler la membrane, on rajoute une solution du kit de révélation d'ECL (Amersham Biosciences) qui est dégradé par l'HRP couplée à l'Anticorps secondaire ; ce qui permettra de générer un signal révélant la présence d'IL10 (fig.20). La prise de photo se fait avec l'appareil Kodak révélateur et fixateur photographique en chambre noire. La concentration d'IL-10 sécrétée dans le milieu a été également évaluée par ELISA (Mabtech, Nacka Strand, Suède).

La fonctionnalité et l'inductibilité du système SICE (stress induced controlled expression) chez la souche *Lactococcus lactis* LL-pLB350 ont été déterminées en utilisant un milieu minimum de croissance tel que cela a été décrit par **Sissler *et al.* (1999)**.

Dans ce protocole, la culture LL-pLB350 est incubée une nuit à 30°C dans le milieu GM17 pour avoir une croissance équivalente à une densité optique voisine de 2.5 à $\lambda = 600$ nm. Ensuite, on procède à deux lavages de cette culture avec le milieu minimum avant d'effectuer une dilution au 1/10 dans le même milieu de sorte à obtenir une densité optique allant de 0.5 à 0.6 à $\lambda = 600$ nm, avant d'induire la souche par addition de 15 ng/mL de solution de sels biliaires (concentration finale d'un mélange d'acide cholique et d'acide désoxycholique : fournis par Sigma-Aldrich, France). La culture est encore laissée 15 min à 30°C jusqu'à l'obtention d'une DO de 0.6 à $\lambda = 600$ nm, avant que les culots cellulaires et les surnageants ne soient traités séparément comme précédemment décrit.

II.5. Construction d'un vecteur HPV-16 E7 chez *Lactococcus lactis*

Dans cette manipulation, il s'agit d'utiliser *Lactococcus lactis* pour délivrer la protéine E7 du HPV-16, protéine retrouvée systématiquement dans des carcinomes provoqués suite à des infections par l'HPV-16.

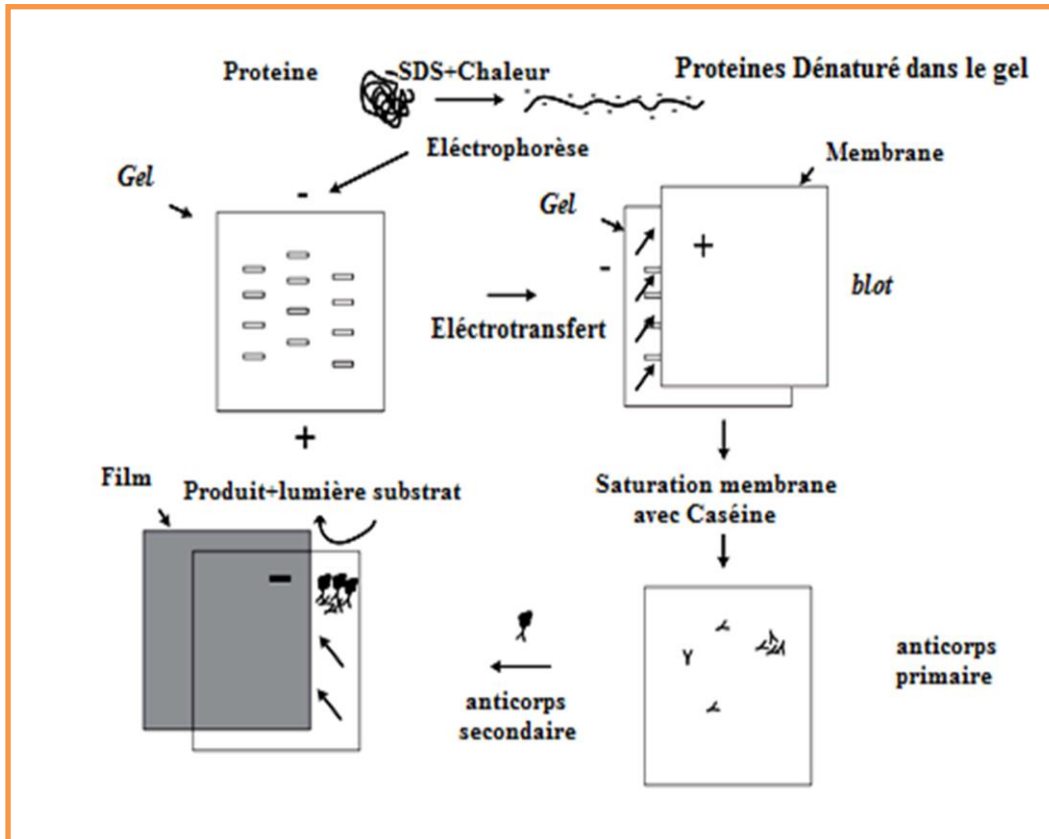


Figure 20 : Le protocole de Western Blot utilisé pour l'immuno-détection de l'IL-10 (Bermudez-Humaran et al., 2002).

Pour la production de l'antigène E7, le fragment d'ADN codant pour la Nuc et qui est le plasmide pLB333 a été remplacé par le gène E7. Ce dernier est obtenu après une digestion du plasmide pLB22 (précédemment nommé pSEC: E7) (se référer au tableau 1) (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002) avec NsiI / EcoRI et cloné dans le vecteur pLB333 digéré avec les mêmes enzymes et remplaçant le fragment d'ADN correspondant codant pour la Nuc. Le plasmide résultant (pLB356) (fig.21) a été cloné dans la souche *L. Lactis* MG1363 avec le même protocole cité auparavant et qui a permis de donner la souche recombinante *L. lactis* (LL-pLB356).

Pour la détection de la protéine E7, la souche recombinante LL-pLB356 a été cultivée dans le milieu GM17 jusqu'à l'obtention d'une DO comprise entre de 0,6 à 0,8 à $\lambda = 600$ nm. L'extraction et l'immuno-détection ont été effectuées comme décrit précédemment pour les cultures de LL-pLB350 (Benbouziane *et al.*, 2013).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), le Western blot et l'immuno-détection ont été réalisés selon le même protocole décrit précédemment (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002), c'est à dire après la migration sur gel et le transfert sur membrane pour favoriser la migration des protéines. La seule différence réside dans l'utilisation d'anticorps anti-E7 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) comme anticorps primaire sur la membrane pendant 1h à température ambiante.

Après 3 lavages au TBST, l'anticorps secondaire est rajouté sur la membrane et laissé pendant 1h à température ambiante. Il s'agit de la protéine G couplée à l'HRP (Protéine G-PRH ; Biorad, France) à une dilution de 1/5000^{ème}. La révélation de la membrane se fait comme précédemment, c'est-à-dire qu'on rajoute le substrat qui est dégradé par l'HRP couplée à l'Anticorps secondaire ; ce qui permettra de générer un signal révélant la présence d'E7.

II.6. Les animaux

Des souris conventionnelles spécifique C57BL/6 (les mâles pour le modèles IBD (Inflammatory bowel diseases) et les femelles pour le modèle de vaccination souris exempt de germes pathogènes), d'âge de 6 à 8 semaines ont été maintenues dans des conditions normales.

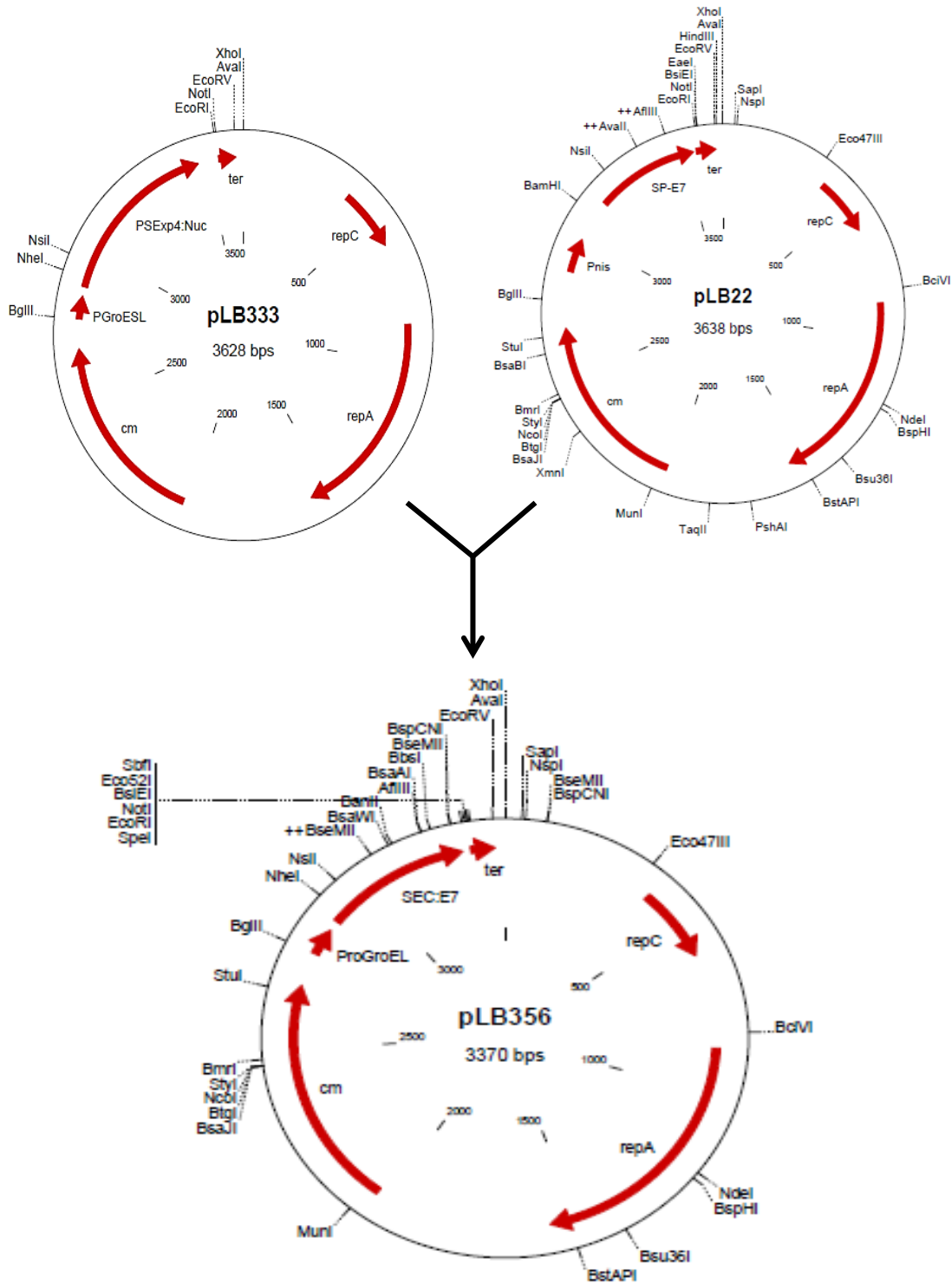


Figure 21 : Schéma de digestion de plasmide pLB333 par les enzymes NsiI / EcoRI pour enlever et remplacer PSEXP4:Nuc par le gène codant pour l'antigène E7 après une digestion du plasmide pLB 22 avec les mêmes enzymes NsiI / EcoRI pour donner après une ligation un nouveau vecteur pLB356 sécrétant E7 sous le contrôle de SICE chez *L.lactis* (Benbouziane *et al.*, 2013).

d'élevage (Unité Expérimentale d'Animalerie des Rongeurs ; UEAR, INRA, Jouy-en-Josas, France)

Toutes les expériences ont commencé après deux semaines d'acclimatation des souris et ont été réalisées selon les règles de la Communauté européenne des soins des animaux et avec l'autorisation N°78-149 du service vétérinaire français.

II.7. Modèle de thérapie contre les maladies inflammatoires (IBD) (Inflammatory bowel diseases)

L'induction de colite par administration d'acide Dinitro Benzene Sulfonique (DNBS) a été réalisée selon un protocole décrit par Martin et *al.* (2014) (fig.22). Préalablement constituées en lot de 8 animaux, les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 150µl par souris pesant environ 20g d'une solution contenant 0.1% de xylazine (Rompun, Alcyon, France) et 0.06% de delakétamine (Imalgene 1000, Merial, France) et 0.06% de xylazine (Rompun, Alcyon, France).

Ensuite, la colite a été induite par l'administration intra-rectale de 200 mg/kg de DNBS dans une solution à 30% d'éthanol et en utilisant un cathéter 3.5 tout en maintenant les souris dans une position verticale pendant 30 secondes.

Les souris de contrôle n'ont reçu que l'éthanol. Toutes les souris ont été alimentées avec 6% de saccharose dans l'eau potable dès les trois premiers jours après l'administration de DNBS pour prévenir la déshydratation (période DNBS).

Quatre jours après la première administration de DNBS, on inocule 1.10^9 UFC de la souche de *Lactococcus lactis* (wt) qui ne produise pas de protéine recombinante (LL-pLB44) et aussi de la souche *Lactococcus lactis* sécrétant l'IL-10 murin (LL-pLB350) par voie intra-gastrique dans un volume de 200µl/souris pendant 7 jours. Le groupe de contrôle positif de la colite reçoit 200 µl de mélange de DNBS et de tampon phosphate PBS.

La colite est réactivée 12 jours après la première injection de DNBS avec une deuxième administration de 100 mg/kg de la même solution de DNBS.

La sévérité de la colite était déterminée par la mesure de la perte de poids dans les 3 jours suivants la seconde injection. En outre, les souris ont été sacrifiées par élévation cervicale et l'examen interne a été effectué ultérieurement.

Pour évaluer les dommages causés au colon, ce dernier a été retiré dans des conditions stériles et disséqué, ouvert avec soin longitudinalement, nettoyé avec du PBS et examiné immédiatement. Les scores macroscopiques de Wallace ont été effectués selon le protocole adapté pour la colite DNBS par Appleyard et Wallace (1995).

Pour les examens histologiques (microscopiques), le colon est fixé au formol et les segments ont été inclus dans de la paraffine et des coupes de 3.5 µm ont été réalisées puis colorées à l'hématoxyline-éosine.

Les scores histologiques sont établis sur la base de notation, en fonction de l'état microscopique de la muqueuse du colon, la présence d'infiltrats inflammatoires et d'ulcérations (Cooper *et al.*, 1993).

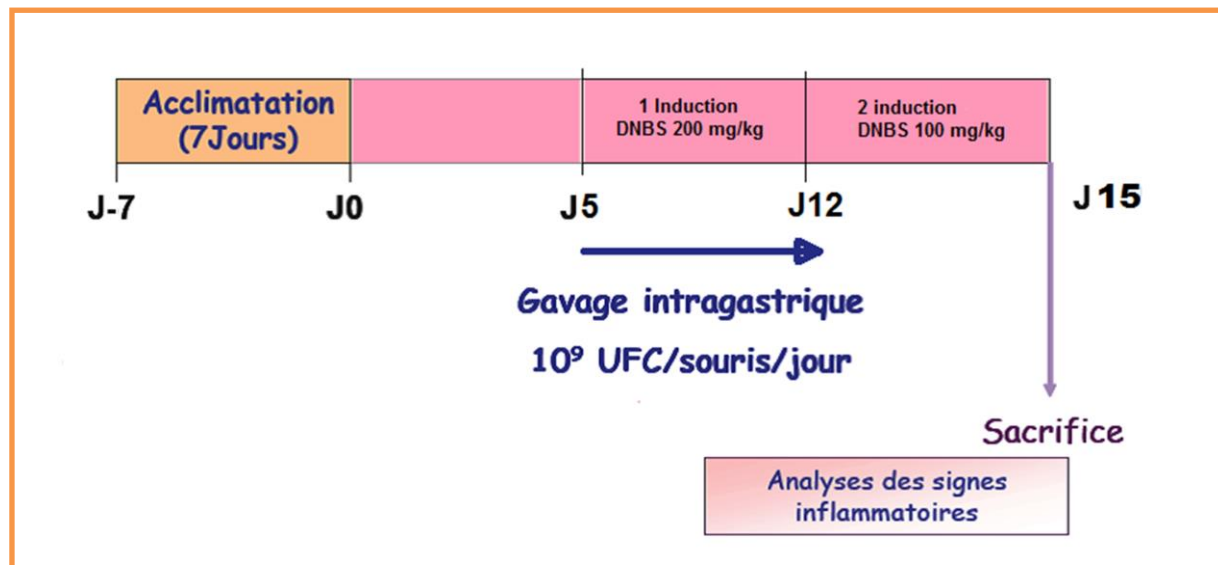


Figure 22: Protocole d'induction d'inflammation par l'acide Di Nitro Benzene Sulfonique (DNBS) (Martin *et al.*, 2014).

II.8. Modèle de vaccination contre le virus HPV-16

Cette manipulation a été faite selon le protocole décrit par Bermudez-Humaran *et al.* (2005) pour étudier la réponse spécifique de la protéine E7 à l'administration par voie nasale de la souche recombinante *Lactococcus lactis* amputée de son plasmide LL-pLB44 ou de la souche recombinante *Lactococcus lactis* avec plasmide LL-pLB356 exprimant l'antigène E7 du HPV-16 remis dans 10µl de PBS (5µl ont été administrés avec une micropipette dans chaque narine) aux jours J0, J14 et J28 (fig.23).

Les souris témoins ont reçu du tampon phosphate PBS (10µl). Des cellules d'une lignée tumorale exprimant l'antigène E7 (TC-1) ont été injectées en sous-cutané dans le flanc arrière droit de la souris (à J35 après la première administration) à des concentrations de l'ordre de 5.10^4 cellules dans 100 µl de PBS.

Le volume des tumeurs chez ces souris a été mesuré une fois par semaine au niveau du site d'injection des cellules TC-1 avec un pied à coulisse, et le volume de la tumeur a été estimé comme suit (selon les formules « longueur x largeur x hauteur x pi/6 » ou « longueur x largeur²/2 ») (fig.24).

Pour analyser la réponse immunitaire provoquée après l'administration des souches recombinantes de *L. lactis*, des groupes de souris (n= 6) étaient immunisés de la même manière que précédemment avec la souche LL-pLB 356 ou bien LL-pLB44, ou encore du PBS pour le témoin.

A J35, les rates ont été prélevées après sacrifice des souris par élongation cervicale. Les splénocytes ont été séparés par une centrifugation à gradient sur tube Ficoll-hypaque (Sigma, France), puis remis dans le milieu RPMI (Le Roswell Park Memorial Institute medium ou *RPMI*) à raison 1.10^6 cellules/puits dans des plaques à 24 puits.

Les suspensions de splénocytes sont stimulées avec 1µg d'E7 purifiée (Watterlot *et al.*, 2010) pour déterminer *in vitro* si la re-stimulation induit une réponse à l'antigène spécifique. Après 24h, les suspensions cellulaires sont filtrées et les surnageants examinés pour doser les

cytokines IL-2 et l'INF gamma (Interleukine-2 et Interféron) par test ELISA (Mabtech, Nacka Strand, Suède).

Pour analyser la réponse cytotoxique des lymphocytes T (CTL), les souris (n=6) immunisées ont été sacrifiées à J 35 et les suspensions des splénocytes sont obtenues après filtration dans des flacons équipés d'un filtre à 40 µm.

Les lymphocytes ont été obtenus par une centrifugation à gradient de densité créée par addition de lympholyte (Cedarlane Labs, Ontario, Canada). Les lymphocytes ont été remis dans du RPMI 1640 complété avec 10% de sérum fœtal de veau ou FCS (Foetal calf sérum) puis dispatché sur des plaques à 24 puits a raison de 1.10^6 cellules / puits et incubées à 37°C pendant 3 jours avec moins de 5% de CO₂ (fig.25).

Après une coculture pendant 3 jours des cellules TC-1 avec de la mitomycine (100µg /mL) (Bermudez-Humaran *et al.*, 2005) et traité avec 1g de protéine d'E7 d'*E.coli* (dérivé purifié). Les splénocytes ont été ensuite transférés dans des boîtes de culture contenant 5.10^5 cellules viables de TC-1 et incubés pendant 5 jours.

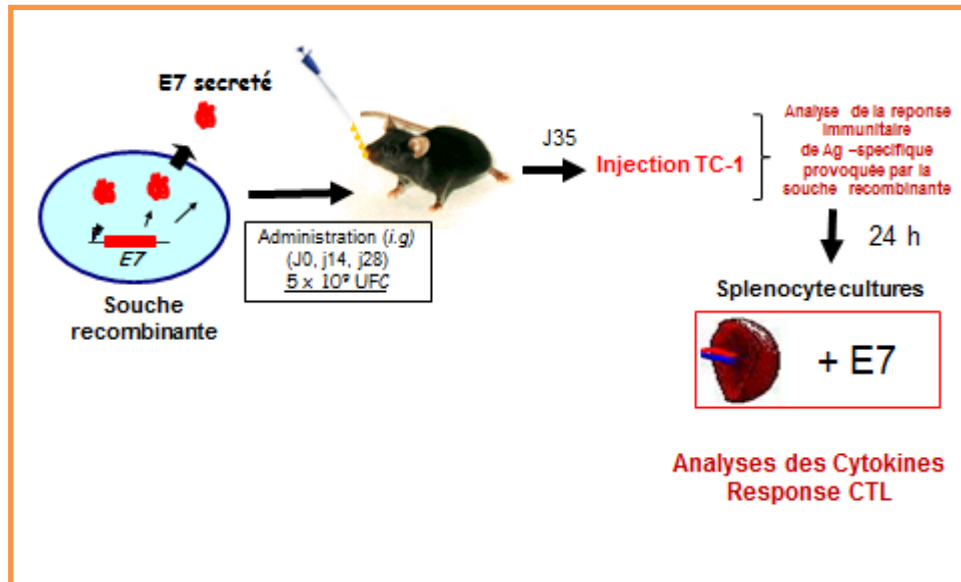


Figure 23: Protocole de vaccination intra-nasale avec les souches recombinante de *L. lactis* (LL-E7) induit une réponse immunitaire et une protection contre des tumeurs induites par l'HPV-16 chez les souris vaccinées (Bermudez-Humaran *et al.*, 2005).

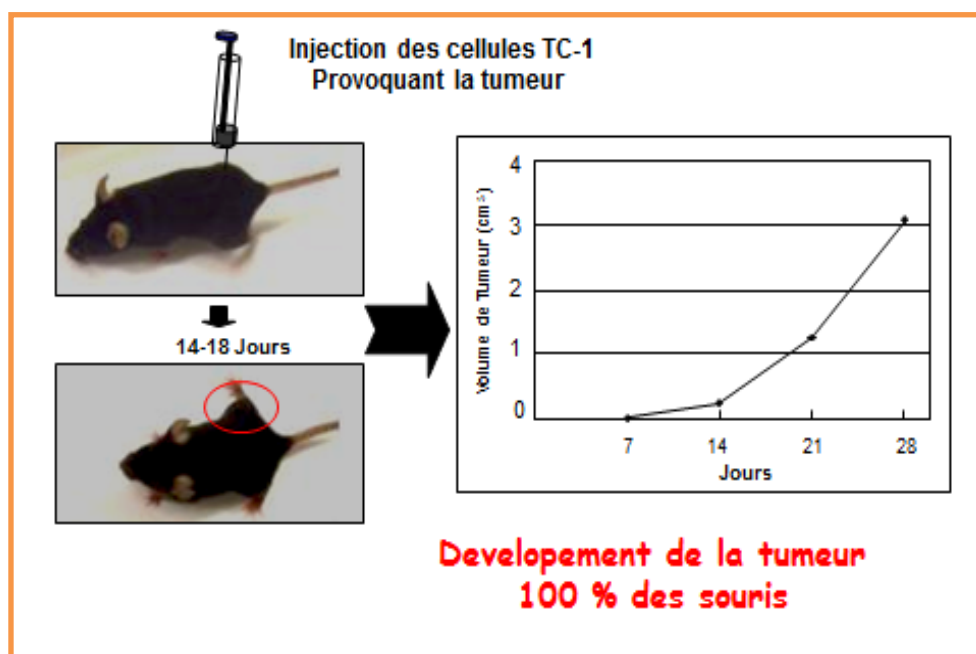


Figure 24 : Développement des tumeurs provoquées par les cellules TC-1 chez les souris (Bermudez-Humaran *et al.*, 2005).

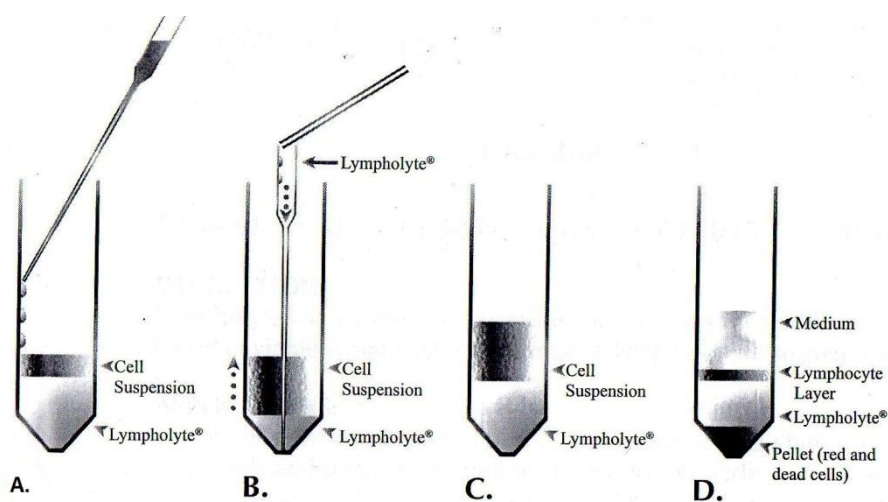


Figure 25: Préparation des splenocytes pour analyser la réponse cytotoxique (CTL).

La lyse des cellules TC-1 a été contrôlée au microscope et photographiée à grossissement x100. Les images ont été contrôlé à la microscopie Axio observer.Z1 (ZEISS) et un appareil photoCool-SNAP HQ2 (Photometrics). Les images sont analysées avec le logiciel de traitement d'image « Axiovisionimaging ».

II.9. Traitement statistique des résultats

Les données ont été analysées par les deux sens des mesures répétées de l'analyse de la variance (Anova) avec un test de comparaison multiple de Bonferroni pour comparer la différence entre les groupes pratiquant Graphpad Prism 5de windows. $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Construction d'un vecteur inductible au stress exprimant une protéine chez

Lactococcus lactis

Pour obtenir un vecteur inductible aux stress exprimant une protéine chez *Lactococcus lactis*, le promoteur groESL de *L. lactis* (pGroESL), représenté à la fig. 26, a été cloné dans le vecteur pLB141 donnant un nouveau vecteur pLB333.

Le criblage rapide et direct des clones recombinants montrant une activité nucléase (Nuc) sur boîte de pétri a pu être obtenu à partir du vecteur pLB141 possédant la Nuc comme protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur s'exprimant chez *Staphylococcus*, car son activité est facilement détectable in vitro (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002; Le Loir *et al.*, 1996 ; 1998).

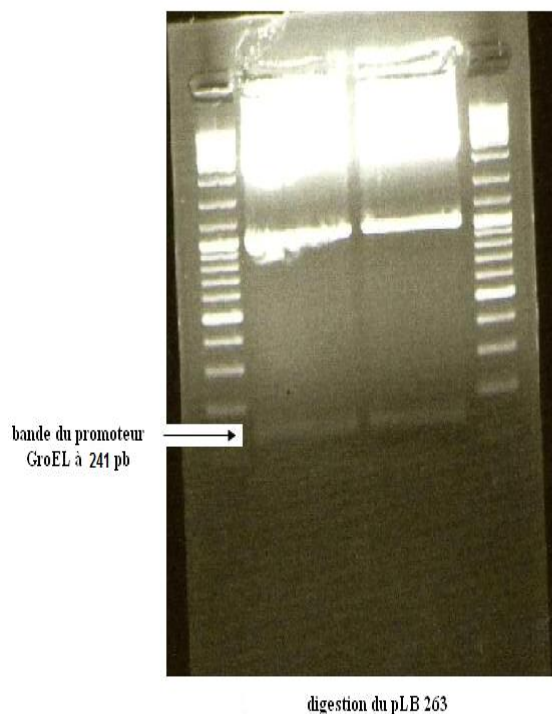


Figure 26: Le fragment d'ADN correspondant à la séquence pLB241 codant pour le promoteur groESL (Benbouziane *et al.*, 2013).

La capacité de la souche LL-pLB333 à produire et sécréter biologiquement la Nuc active a été testée à l'aide du milieu vert méthyl ADN, indicateur de l'activité de la Nuc des souches recombinante de *L. lactis* sur boîte pétri.

Comme le montre la figure 27 les spots de culture de la souche LL-pLB333 étaient entourés d'un halo clair correspondant à la dégradation de l'ADN après 24h d'incubation grâce à la sécrétion de la nucléase (Nuc) par ces souches. En revanche, aucune dégradation n'a été observée chez les cultures de *L. lactis* qui ne portent pas le plasmide LL-pLB44.

Plus important encore, les cultures de la souche LL-pLB333 stressées par un choc thermique de 42°C du chlorure de sodium (NaCl 2.5% : P/V), un pH de 4.5 ou encore par une solution de sels biliaires de concentration finale égale à 15 ng/ml d'acide cholique (Sigma–Aldrich, France) ont donné un halo ou une zone claire de dégradation plus large et plus importante de l'ADN. Ces résultats ont ainsi confirmé la sécrétion biologique active de la Nuc par les cultures de la souche LL-pLB333.

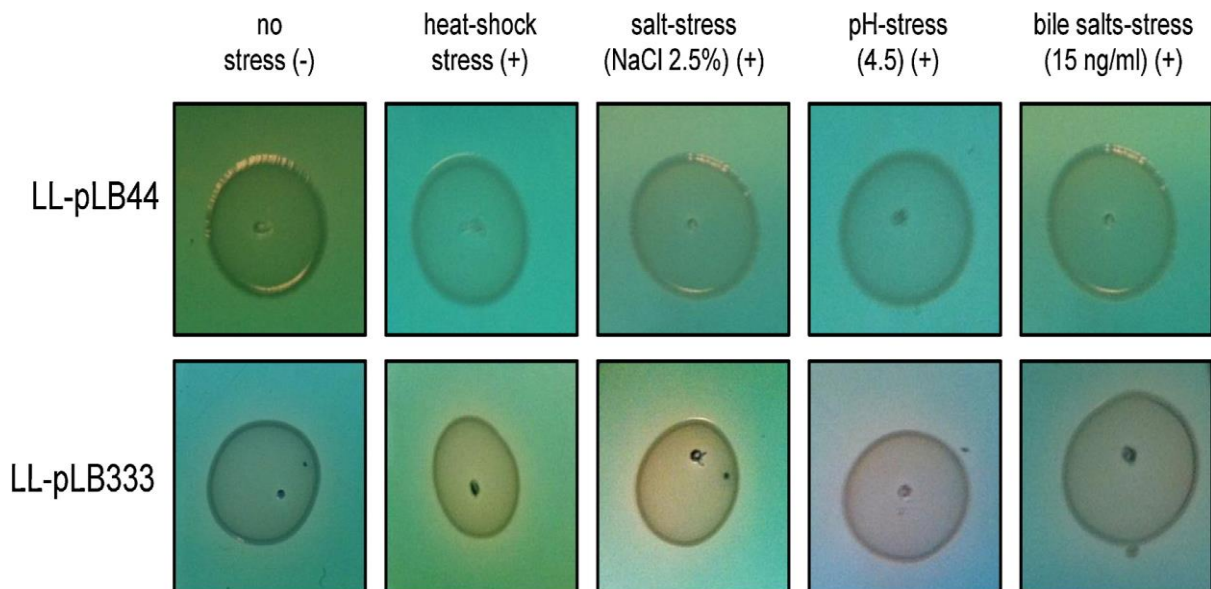


Figure 27 : Mise en évidence par test colorimétrique de l'activité biologique de la Nuc produite par les cultures sous le contrôle du promoteur (pGroESL).

III.2. Validation *in vivo* du système SICE

Les clones de *L. lactis* construits (Groel-IL-10 et Groel-E7) ont été validés *in vitro* d'une part, par digestion et séquençage et d'autre part, par l'expression de l'IL-10 et E7 par western Blot lorsque la souche est soumise à un stress.

Ces clones ont été par la suite également validés *in vivo* chez des souris (modèle murin) en vue de produire et de sécréter les protéines d'intérêt thérapeutiques (l'IL10 et l'E7) sous l'effet de différents stress.

III.3. Caractérisation de la production d'IL-10 en utilisant le système SICE chez *L. lactis*

La réussite du clonage se caractérise par la présence du gène IL-10 dans les clones. La figure 28 présente le résultat de digestion des clones où il apparaît deux bandes à 3178 pb et à 360 pb pour chaque clone traduisant le caractère positif de ces clones après électrophorèse, et donc la digestion du plasmide. Ces quatre clones positifs sont dirigés vers le séquençage.

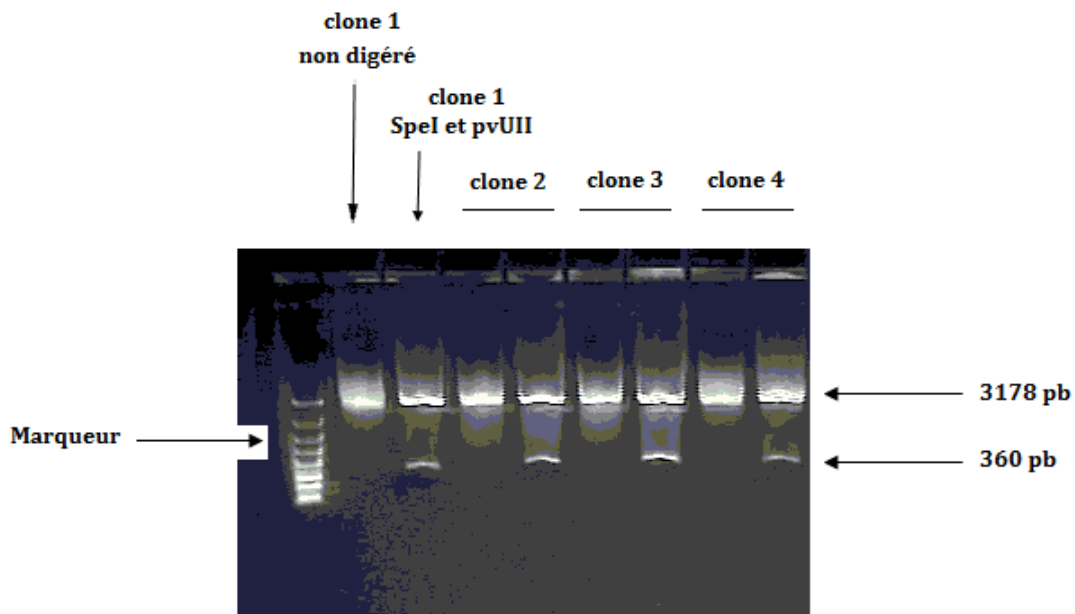
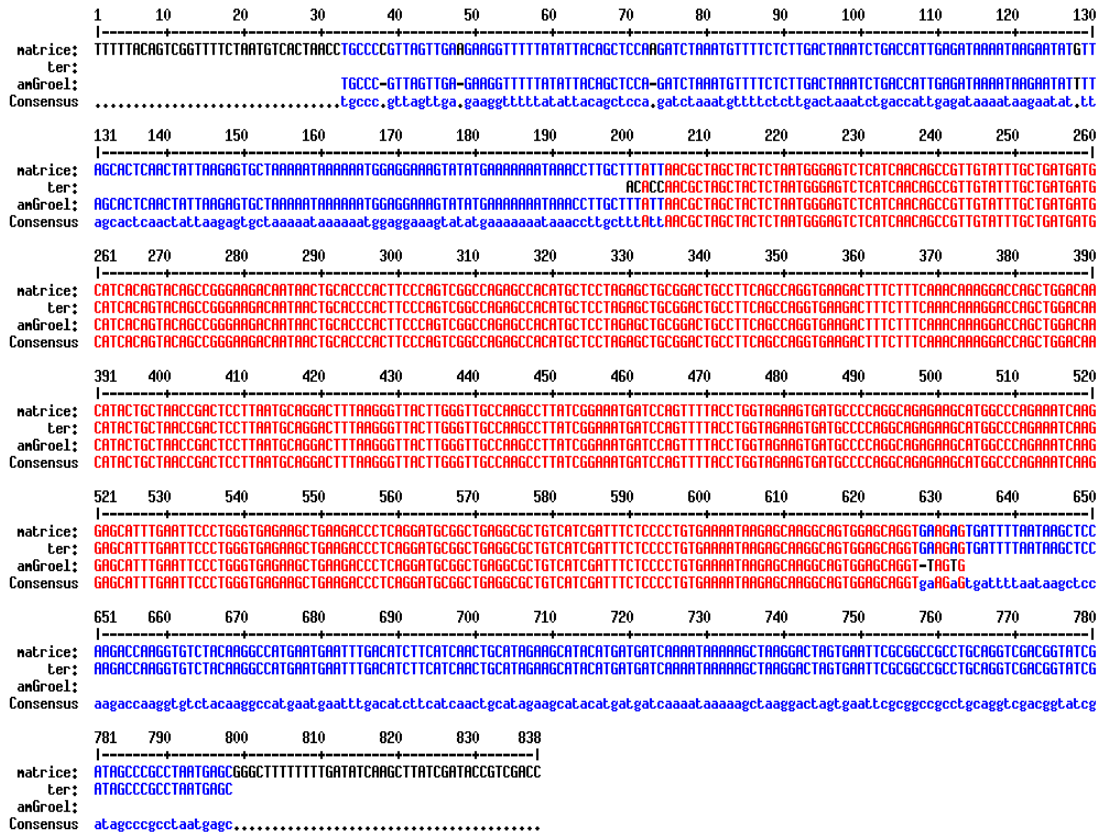


Figure 28: Résultats de l'électrophorèse de la digestion des 4 clones positifs d'IL-10 GroEL par SpeI et pvUII qui seront envoyés en séquençage.

Le résultat est satisfaisant puisque les 4 clones sont validés. Comme exemple, on peut voir ce résultat pour le clone 1 sur la figure 29. Ils contiennent bien le p.GroEL et le gène codant pour l'IL- 10.



Molecule: pGroEl:IL-10, 3538 bps DNA Circular
File Name: pLB350.cm5, dated 25 Mar 2013
Description: Ligation of IL-10 into Backbone
Printed: 1 to 3538 bps (Full)

```

      Aval      NspI
      XhoI      EarI
              SapI
1  tcgagtgcat attttcggca atcttctcaa tgagatgctc ttcagcatgt tcaatgatgt

      BseMII
      BspCNI
61  cgatttttta ttaaaacgtc tcaaaatcgt tctgagacg ttttagcggt tatttcgttt
121 agttatcggc ataatcgta aacagggcg taccgtagcg taaaagccct tgagcgtagc
181 gtgctttgca gcgaagatgt tgtctgtag attatgaaag ccgatgactg aatgaaataa
241 taagcgcagc gtccttctat ttcggttgga ggaggctcaa gggagtttga gggaatgaaa

      HaeII
      Eco47III
301 ttcctcatg ggtttgattt taaaattgc ttgcaatttt gccgagcggg agcgcctggaa
361 aatttttgaa aaaaattgg aatttgaaa aaaatggggg gaaaggaagc gaattttgct
      >>.....repC.....>
421 tccgtactac gacccccat taagtgccga gtgcccaatt ttgtgcaaaa aacgctctat
      >.....repC.....>
481 cccaactggc tcaagggttt gaggggtttt tcaatcgcca acgaatcgcc aacgttttgc
      >.....repC.....>
541 ccaacgtttt ttataaatct atatttaagt agctttattg ttgtttttat gattacaaag
      >.....repC.....>
601 tgatacacta attttataaa attatttgat tggagttttt taaatggtga tttcagaatc
      >>> repC
661 gaaaaaaaaga gttatgattt ctctgacaaa agagcaagat aaaaaattaa cagatatggc
721 gaaacaaaaa ggtttttcaa aatctgcggg tgccggcgta gctatagaag aatatgcaag

      BclI
781 aaaggaatca gaacaaaaaa aataagcgaa agctcgcggt tttagaagga tacgagtttt
841 cgctacttgt ttttgataag gtaatatatc atggctatta aaaatactaa agctagaat
      >>.....repA.....>
901 tttggatttt tattatatcc tgactcaatt cctaatgatt ggaaagaaaa attagagagt
      >.....repA.....>
961 ttgggcgat ctatggctgt cagtccttta cacgatatgg acgaaaaaaa agataaagat
      >.....repA.....>
1021 acatggaata gtagtgatgt tatacgaaat ggaaagcact ataaaaacc aactatcac
      >.....repA.....>
1081 gttatatata ttgcacgaaa tctgtaaca atagaaagcg ttaggaacaa gattaagcga
      >.....repA.....>

      NdeI
1141 aaattgggga atagttcagt tgctcatggt gagatacttg attatatcaa aggttcatat
      >.....repA.....>

```

pGroEl:IL-10

```

1201  gaatatttga BspHI ctcatgaatc aaaggacgct attgctaaga ataaacatat atacgacaaa
>.....repA.....>

1261  aaagatattt tgaacattaa tgattttgat attgaccgct atataacact tgatgaaagc
>.....repA.....>

1321  caaaaaagag aattgaagaa tttactttta gatatagtgg atgactataa tttggtaaat
>.....repA.....>

1381  acaaaagatt taatggcttt Bsu36I tattcgcctt aggggagcgg agtttggaaat tttaaatagc
>.....repA.....>

1441  aatgatgtaa aagatattgt HaeII ttcaacaac tctagcgcct ttagattatg gtttgagggc
>.....repA.....>

1501  aattatcagt gtggatatag BstAPI agcaagtat gcaaaggctc ttgatgctga aacgggggaa
>.....repA.....>

1561  ataaaatgac aaacaaagaa aaagagtat ttgctgaaaa tgaggaatta aaaaagaaa
>.repA.>>

1621  ttaaggactt aaaagagcgt attgaaagat acagagaaat ggaagttgaa TatI ttaagtacaa

1681  caatagattt attgagagga AccI gggattattg aataaataaa agccccctcg acgaaagtcg

1741  acggcaatag ttacccttat tatcaagata agaaagaaaa ggatttttcg ctacgctcaa

1801  atcctttaa aaaaacacaaa agaccacatt ttttaatgtg gtctttatc ttcaactaaa

1861  TaqII gcaccatta gttcaacaaa cgaaaattgg ataaagtggg atatntttaa aatatatatt

1921  tatgtttacag taatattgac ttttaaaaaa ggattgattc taatgaagaa agcagacaa

1981  taagcctcct aaattcactt tagataaaaa tttaggaggc atatcaaatg aactttaata
>>....cm.....>

2041  MunI EcoI aaattgattt agacaattgg aagagaaaag agatatttaa tcattatttg accaacaaa
>.....cm.....>

2101  cgacttttag tataaccaca gaaattgata ttagtgtttt ataccgaac ataaaacaa
>.....cm.....>

2161  aaggatataa atttaccct gcatttattt tcttagtgac aagggtgata aactcaaata
>.....cm.....>

2221  cagcttttag aactggttac aatagcgacg gagagttagg ttattgggat aagttagagc
>.....cm.....>

2281  cactttatac aatntttgat ggtgtatcta aaacattctc tggattttgg actcctgtaa
>.....cm.....>

2341  XmnI agaatgactt caaagagttt tatgatttat acctttctga tgtagagaaa tataatggtt
>.....cm.....>

2401  cggggaaatt gtttcccaa acacctatac ctgaaaatgc tttttctctt tctattatc
>.....cm.....>

```

pGroEL:IL-10

```

      BsaII
      BtgI
      NcoI
      StyI
      BmrI
2461 catggacttc atttactggg tttacttaa atatcaataa taatagtaat taccttctac
    >.....cm.....>

2521 ccattattac agcaggaaaa ttcattaata aaggtaattc aatatattta ccgctatctt
    >.....cm.....>

2581 tacaggtaca tcattctggt tgtgatgggt atcatgcagg attgtttatg aactctatc
    >.....cm.....>

      StuI
      TstI
2641 aggaattgtc agataggcct aatgactggc tttataata tgagataatg ccgactgtac
    >.....cm.....>

      BspMI
2701 tttttacagt cggttttcta atgtcactaa cctgccccgt tagttgaaga aggtttttat

      BglII
2761 attacagctc caagatctaa atgttttctc ttgactaaat ctgaccattg agataaaata
    >>.....ProGroEL.....>

2821 agaatatggt agcactcaac tattaagagt gctaaaata aaaaatggag gaaagtatat
    >.....ProGroEL.....>
                                           SEC:IL-10 >>

      NheI
2881 gaaaaaata aaccttgctt tattaacgct agctactcta atgggagtct catcaacagc
    >.....SEC:IL-10.....>

      NciI
      ScrFI
      BssKI
      NsiI
      TstI
      BspI
      TaqII
2941 cgttgatatt gctgatgatg catcacagta cagccgggaa gacaataact gcaccactt
    >.....SEC:IL-10.....>

      BmrI
      EaeI
      NspI
      ScrFI
      BssKI
      XmnI
3001 cccagtcggc cagagccaca tgctcctaga gctgcccact gccttcagcc aggtgaagac
    >.....SEC:IL-10.....>

      MspAII
      PvuII
3061 tttctttcaa acaaaggacc agctggacaa catactgcta accgactcct taatgcagga
    >.....SEC:IL-10.....>

      ScrFI
      BssKI
      SexAI
3121 cttaagggt tacttgggtt gccaagcctt atcggaatg atccagtttt acctggtaga
    >.....SEC:IL-10.....>

      ScrFI
      BsaII
      BssKI
      EcoRI
      TaqII
3181 agtgatgccc caggcagaga agcatggccc agaaatcaag gagcatttga attccctggg
    >.....SEC:IL-10.....>

```

pGroEl:IL-10

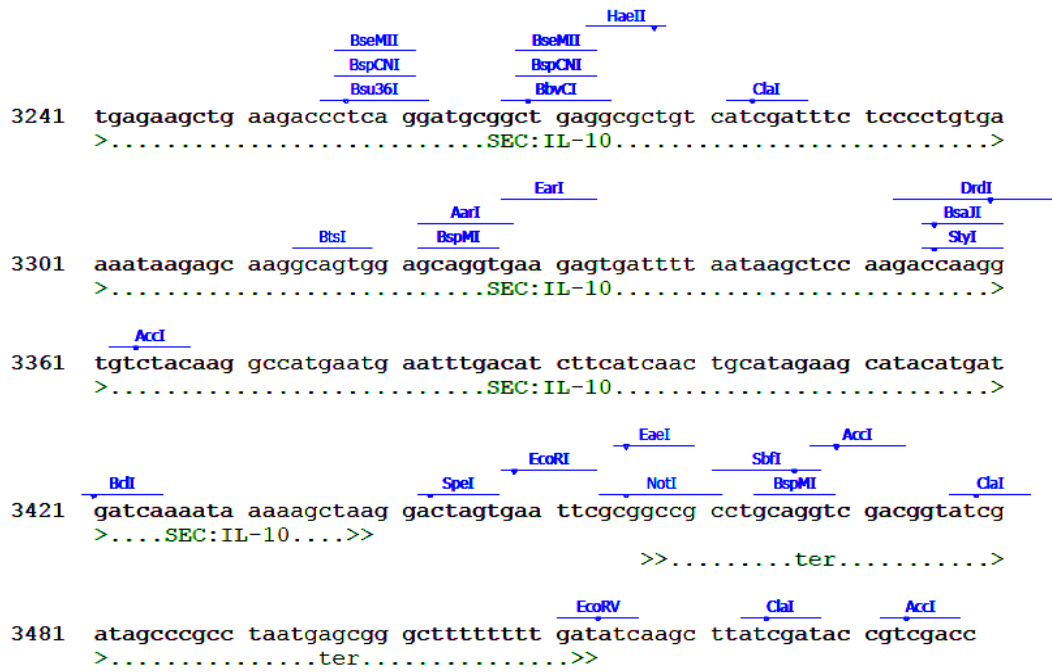


Figure 29: Séquençage du clone 1de la souche LL-pLB350 par MWG (Genomic Company, Allemagne).

La production et la sécrétion de cytokine IL-10 en utilisant le système SICE ont été analysées d'abord chez les cultures des clones non stressés de LL-pLB350 par la méthode de western blot suivie par un test ELISA.

Comme le montre la figure 30, deux bandes protéiques sont visibles : une bande majeure d'environ de 20 KDa dans le surnageant (S) et qui correspond à l'IL-10 chez les cultures stressées de LL-pLB350, et une bande mineure dans les culots (c) et qui correspond au précurseur SPExp4-IL-10.

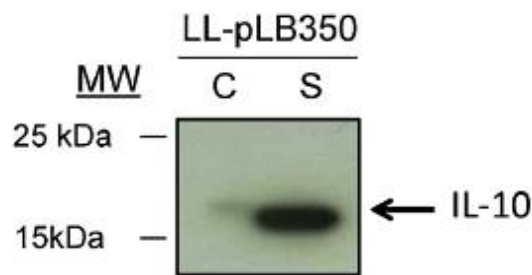


Figure 30: Production d'IL-10 (bande majeure d'environ de 20 KDa dans les surnageants (S) par la souche *Lactococcus lactis* (LL-pLB350) sous le contrôle du système SICE chez les cultures stressées de LL-pLB350 et de précurseur SPExp4-IL-10 (bande mineure dans les culots) (C).

La recherche concernant l'utilisation de BLGM (Bactéries Lactiques Génétiquement Modifiées) dans les traitements thérapeutiques des MICI est très prometteuse. Les travaux menés par l'équipe de Steidler concernant les effets anti-inflammatoires de *L. lactis* sécrétant l'IL-10 ont montré que l'administration de cette bactérie recombinante permettait de prévenir l'intégrité de l'épithélium intestinal et de diminuer de 50% l'inflammation des colites murines induites par du DSS (Dextran Sodium Sulfate) ainsi que des colites obtenues sur modèle de souris transgéniques KO IL-10 (Steidler *et al.*, 2000). Leurs travaux se poursuivent par des essais cliniques chez l'homme.

Les résultats obtenus sur la production et la sécrétion de cytokine IL-10 ont été également déterminées par Elisa dans les échantillons des surnageant (S). Comme le montre la figure 33, les échantillons des cultures de LL-pLB350 non stressées révèlent une accumulation d'IL10 à une concentration de 2,56 ng/mL.

Foligne et *al.* (2007) avaient effectué une analyse similaire d'une souche recombinante de *L. lactis* qui produit de l'IL-10 en utilisant un système d'expression constitutif. Ces auteurs avaient observé une concentration d'IL10 10 fois supérieure à celle notée dans ce travail (23,6 ng/mL contre 2,56 ng/mL). Ceci confirme une expression basale et une sécrétion d'IL-10 de notre système.

Ce phénomène de sécrétion d'IL-10 peut s'expliquer par le fait que, dans la présente expérience, *L. lactis* a été cultivé jusqu'à saturation dans le milieu GM17, qui est un milieu de culture riche. En effet, selon de telles conditions, les bactéries peuvent subir différents types de stress comme la fermentation qui induit une baisse du pH et donc une augmentation de l'acidité.

Selon nos résultats, il est permis d'affirmer que chez la souche recombinante de *L. lactis*, il existe une production basale d'IL-10 amplifiable par le système SICE à un niveau élevé détectable dans le surnageant (S).

L'inductibilité du système SICE a été ensuite confirmée sur les deux fractions culot et surnageant des cultures stressées de LL-pLB350. La quantité d'IL-10 synthétisée et retrouvée dans le culot (C) des cultures LL-pLB350 stressées est deux fois plus élevée que celle des cultures non stressées (40,72 ng/mL par rapport à 20,71 ng/mL) (fig.32).

Par ailleurs, il en est de même pour la quantité d'IL-10 détectée dans la fraction des surnageants (S) des cultures LL-pLB350 stressées qui s'est révélée légèrement plus élevée, atteignant une concentration maximale d'environ 901 pg/mL, que celle mesurée dans les surnageants des cultures non stressées qui est de l'ordre de 675 pg (fig.33).

Il est à noter que la quantité d'IL-10 sécrétée par les cultures LL-pLB350 non stressées est 2,5 fois plus élevée lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu riche comme le milieu GM17 (soit 2,56 ng/mL) que sur milieu minimum (soit 1 ng/mL) (fig.32 et 33). Cette différence pourrait s'expliquer par la plus faible biomasse des cultures de *L. lactis* dans le milieu minimum (DO₆₀₀=0,6) par rapport à celle des cultures sur milieu GM17 DO= 2,5).

Ces résultats démontrent la capacité de synthèse et de sécrétion d'IL10 par la souche LL-pLB350 lorsqu'elle est cultivée dans des conditions stressantes telles que la présence de sels biliaires ou tout autre stress inducteur de cette réaction.

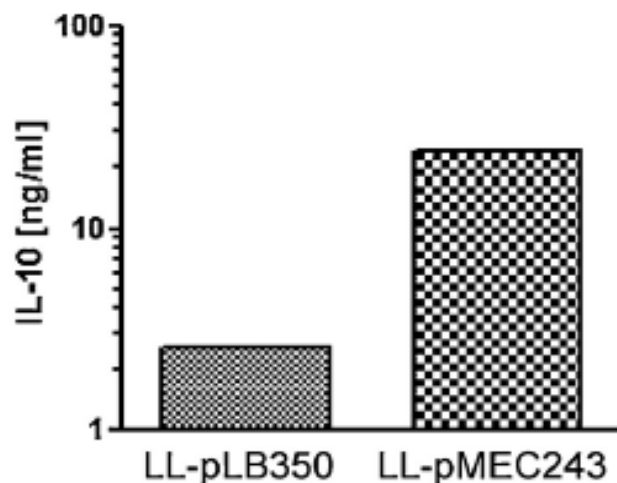


Figure 31: Quantification d'IL-10 sécrétée par la souche recombinante LL-pLB350 et par LL-pMEC243 produisant IL-10 sous le contrôle du système SICE déterminé par le test ELISA au niveau des surnageants.

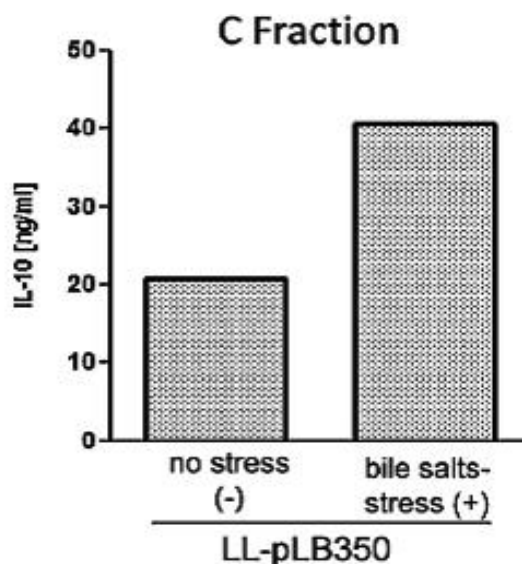


Figure 32 : Quantification d'IL-10 produite au niveau du culot (C) de la souche recombinante (LL-pLB350) stressée et non stressée par les sels biliaires.

III.4. Effet de la souche recombinante LL-PLB350 sécrétant l'interleukine 10 (IL-10) dans un modèle de colite induite par l'acide dinitrobenzène sulfonique ou DNBS chez la souris.

Pour valider le fonctionnement du système SICE *in vivo*, nous avons testé l'effet de la souche LL-pLB350 dans un modèle de colite induite par le DNBS. En effet, l'IL-10 a donné des résultats prometteurs dans des essais cliniques pour les traitements des maladies inflammatoires.

Une administration quotidienne de la souche LL-pLB350 conduit à une réduction significative des paramètres de la colite avec une réparation notable de la perte de poids des souris ($p < 0,05$) (fig. 34) et une diminution des scores macroscopiques ($p < 0,05$) (fig.35), par rapport aux lots de souris témoins qui ont reçu ETOH-PBS (Ethanol- Phosphate buffered Saline) et DNBS-LL-pLB44.

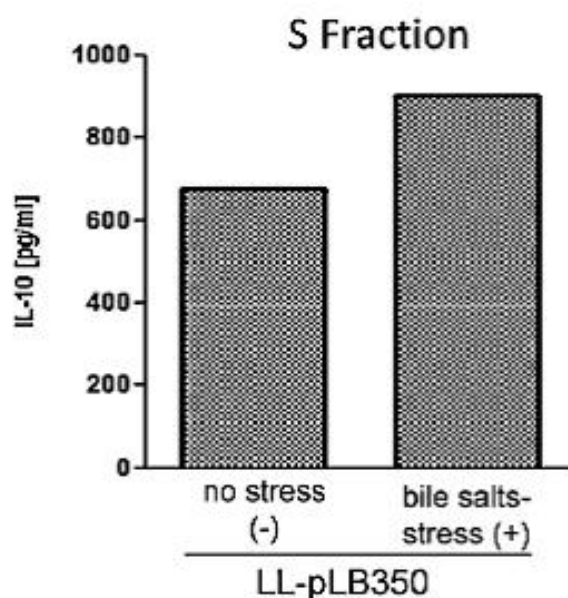


Figure 33 : Teneurs en IL-10 produite au niveau des surnagants (S) de la souche recombinante LL-pLB350 stressée et non stressée par les sels biliaires.

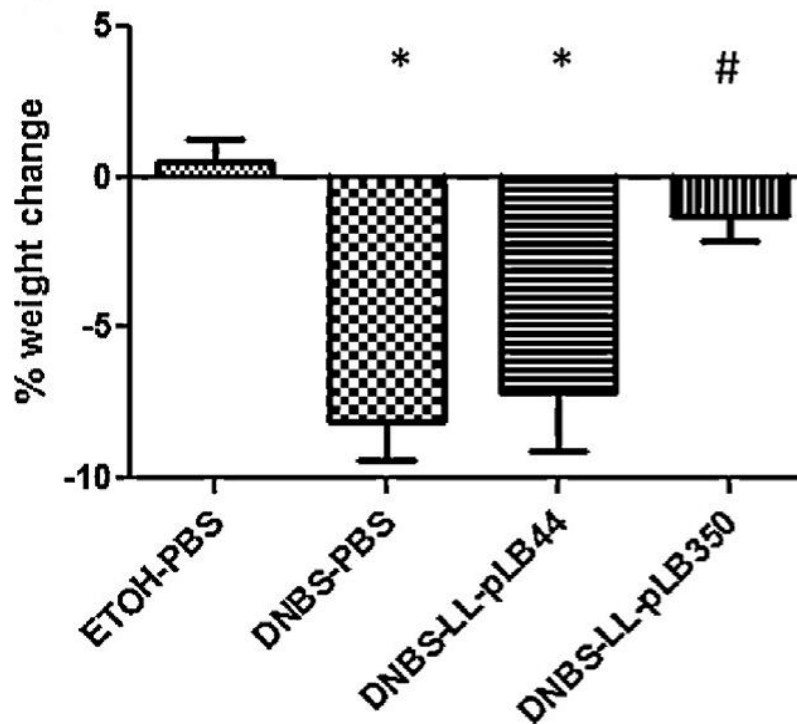


Figure 34: Effet thérapeutique de la souche recombinante LL-PLB350 sécrétant l'IL-10 murin (LLpLB350) sur les changements de poids des souris dans un modèle de colite induite par l'administration d'acide dinitrobenzène sulfonique (DNBS) par voie intra rectale.

Paradoxalement, la moyenne du score histologique de LL-pLB350 est d'au moins 75 et 60% inférieure à celle du groupe témoin ou de contrôle DNBS-PBS et 60% de moins que le DNBS-LL-pLB44 des souris traitées ($p < 0,05$) (fig. 36). Ces résultats confirment le potentiel d'application du système SICE pour délivrer l'IL-10 comme une stratégie alternative au traitement chimique de la colite induite uniquement chez la souris.

III.5. Production et sécrétion de l'antigène E7 du HPV-16 par la souche recombinante LL- pLB356

Le système SICE a également été utilisé pour produire une autre protéine d'intérêt médical, l'antigène E7 du HPV-16 qui est l'agent causal de l'infection la plus commune sexuellement transmissible et responsable de 90 à 99% des cas de cancer du col utérin (deuxième cause de décès liés au cancer chez les femmes à travers le monde) (Bermudez-Humaran et Langella, 2010).

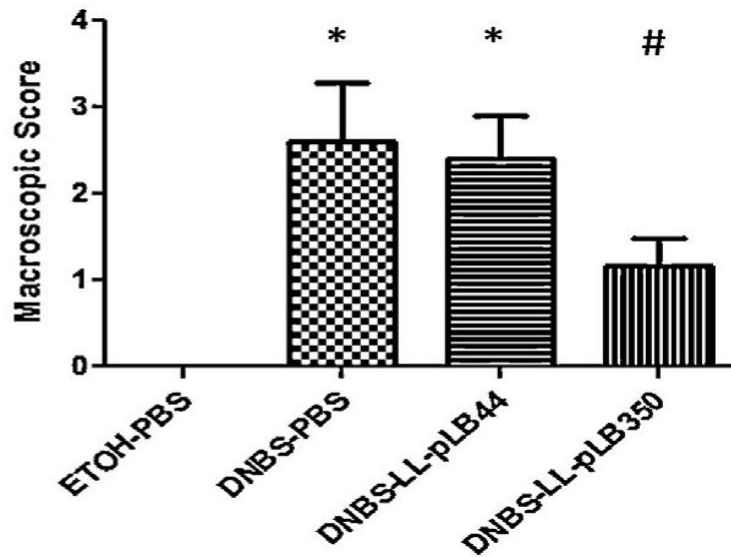


Figure 35: Sévérité des scores macroscopiques provoqués par la réactivation de la colite. Les différences significatives importantes (*) sont enregistrées entre les lots traités par du PBS (#) par rapport aux lots traités par LL-pLB350 ; ainsi que les groupes contrôles ((DNBS PBS et DNBS-LL-pLB44).

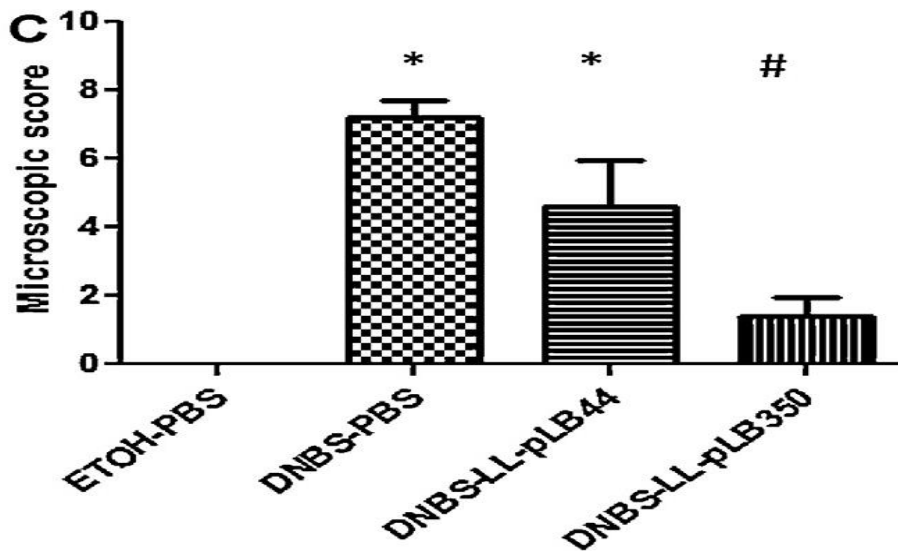


Figure 36: Evaluation de la sévérité provoquée par la réactivation de la colite sur les changements des scores microscopiques et les différences significatives marquées (*) entre les lots traités par du PBS (#) et l'éthanol (ETOH-PBS) par rapport aux lots traités par la souche LL-pLB350 et les groupes contrôles (DNBS-PBS et DNBS-LL-pLB44).

La production et la sécrétion de l'antigène E7 par la souche recombinante LL-pLB356 a été analysée et comparée par des expériences de Western blot à 30°C, qui est la température normale de croissance de *Lactococcus lactis* et à 37°C, qui est la température qui correspond, en fait, à un léger choc thermique pour cette souche (*L. lactis*), et qui nous place dans les conditions thermiques physiologiques du règne animal.

Avant l'analyse de la sécrétion d'E7, on a confirmé la séquence de notre souche recombinante LL-pLB356. Les séquences d'ADN sont analysées par la compagnie MWG (Genomic Company, Allemagne) qui a obtenu les séquences reportées à la figure 37.

La figure 38 montre les résultats de l'effet du système SICE (choc thermique) sur la sécrétion de l'antigène E7 par les cultures de *L. lactis* (LL-pLB356) dont les protéines des surnageants et des culots ont été analysées par western blot.

La protéine E7 est sécrétée par cette bactérie avec ou sans stress thermique, mais pas avec la même intensité. Dans le culot des cultures non stressées, il apparaît une très faible bande protéique correspondante au précurseur SPExp4-E7 de l'antigène E7 qui est, par contre, plus intense et bien visible dans le culot venant des cultures stressées.

En revanche, la bande protéique correspondante à l'antigène E7 est bien représentée dans les surnageants avec plus d'intensité dans ceux des cultures stressées thermiquement.

L'analyse densitométrique des bandes protéiques après immuno-détection (logiciel « Image J ») a montré que la concentration totale d'antigène E7 dans les cultures stressées thermiquement (37°C) est 2.5 à 3 fois plus élevée que celle des cultures non stressées (30°C).

Ces résultats indiquent que, comme précédemment observé avec l'IL-10, il existe un niveau basal de production d'antigène E7 qui peut être amplifié en utilisant le système de SICE après un choc thermique à 37 °C.

Ceci confirme la fonctionnalité du système. En outre, comme pour l'IL-10, environ 99% de la protéine E7 sont détectés dans la fraction du surnageant, laissant penser à une haute efficacité de sécrétion.

(pLB333-E7) → LL-pLB356

CCGACTGTACTTTTTACAGTCGGTTTTCTAATGTCACTAACCTGCCCGTTAGTTGAAGA
AGG

TTTTTATATTACAGCTCCAAGATCTAAATGTTTTCTCTTGACTAAATCTGACCATT
GAGATAAAAATAAGAATATGTTAGCACTCAACTATTAAGAGTGCTAAAAATAAAA
AATGGAGGAAAGTATATGAAAAAATAAACCTTGCTTTATTAACGCTAGCTACTC
TAATGGGAGTCTCATCAACAGCCGTTGTATTTGCTGATGATGCATCACAACATGG
AGATAACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCCAGAGACAACCTGAT
CTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGAT
GGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTT
GTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACAT
TCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTT
CTCAGAAACCATAACAGCTCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGGTC
GACGGTATCGATAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTTGATATCAAGCTTATCG
ATACCGTCGACC.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350								
matrice	-----													
Ter	-----													
ambroo_	-----													
Consensus	-----													

Molecule: pLB356, 3370 bps DNA Circular
File Name: pLB356.cm5, dated 29 Sep 2011
Description: Ligation of E7 into pGroEL
Printed: 1 to 3370 bps (Full)

```

      AvaI
      XhoI
      SapI
      NspI
1  tcgagtgcat attttcggca atcttctcaa tgagatgctc ttcagcatgt tcaatgatgt

      BseMII
      BspCNI
61  cgatTTTTTA ttaaAACGTC taaaAATCGT tTctgagacg ttttagcggt tatttcgTtt
121 agttatcggc ataatcgTta aaacagggcgt tatcgtagcg taaaagccct tgagcgtagc
181 gtgctttgca gCGaagatgt tGtctgTtag attatgaaag cGgatgactg aatgaaataa
241 taagcgcagc gTccttctat tTcggTtTgga ggaggctcaa gggagTttga gggaatgaaa

      Eco47III
301 tTccctcatg gGtttgattt taaaAATTGC tTgcaatttt gCcgagcggT agcgctggaa
361 aatttttgaa aaaaattTgG aattTgGaaa aaaatggggg gaaaggaagc gaattttgct
      >>.....repC.....>
421 tccgtactac gacccccat taagtGCCga gTgccaattt tTgtGCCaaa aacgctctat
      >.....repC.....>
481 cccaactggc tcaagggttT gaggggtTtt tcaatcgcca acgaatcgc aacgttttcg
      >.....repC.....>
541 ccaacgTttt ttataaatct atatttaagt agctttattg tTgtttttat gattacaaag
      >.....repC.....>
601 tgatacacta attttataaa attattTgat tggagTtttt taaatggTga tttcagaatc
      >>> repC
661 gaaaaaaaga gttatgattt ctctgacaaa agagcaagat aaaaaattaa cagatatggc
721 gaaacaaaaa ggTTTTTcaa aatctgcggT tgcggcgTta gctatagaag aatatgcaag

      BciVI
781 aaaggaatca gaacaaaaaa aataagcgaa agctcgcggt tttagaagga tacgagTttt
841 cgctacttgt ttttgataag gtaatatatc atggctatta aaaatactaa agctagaat
      >>.....repA.....>
901 tttggatttt tattatatcc tgactcaatt cctaattgatt ggaaagaaaa attagagagT
      >.....repA.....>
961 ttgggcgat ctatggctgt cagtccttta cacgatatgg acgaaaaaaaa agataaagat
      >.....repA.....>
1021 acatggaata gtagtgatgt tatacgaaat ggaaagcact ataaaaaacc aactatcac
      >.....repA.....>
1081 gttatatata ttgcacgaaa tcttgtaaca atagaaagcg ttaggaacaa gattaagcga
      >.....repA.....>

      NdeI
1141 aaattgggga atagttcagT tgctcatgTt gagatacttg attatatcaa aggttcatat
      >.....repA.....>

      BspHI
1201 gaatatttga ctcatgaatc aaaggacgct attgctaaga ataacatat atacgacaaa
      >.....repA.....>
```

pLB356

```
1261 aaagatattt tgaacattaa tgattttgat attgaccgct atataacact tgatgaaagc
>.....repA.....>
1321 caaaaaagag aattgaagaa tttactttta gatatagtgg atgactataa tttggtaaat
>.....repA.....>
1381 acaaaagatt taatggcttt Bsu36I tattgcctt aggggagcgg agtttggaaat ttaaatatcg
>.....repA.....>
1441 aatgatgtaa aagatattgt ttcaacaaac tctagcgctt ttagattatg gtttgagggc
>.....repA.....>
1501 aattatcagt gtggatatag BstAPI agcaagtat gcaaaggttc ttgatgctga aacgggggaa
>.....repA.....>
1561 ataaaatgac aaacaagaa aaagagtat ttgctgaaaa tgaggaatta aaaaaagaaa
>.repA.>>
1621 ttaaggactt aaaagagcgt attgaaagat acagagaaat ggaagttgaa ttaagtacaa
1681 caatagattt attgagagga gggattattg aataaataaa agccccctg acgaaagtcg
1741 acggcaatag ttacccttat tatcaagata agaaagaaaa ggatttttcg ctacgctcaa
1801 atccttttaa aaacacaaa agaccacatt ttttaatgtg gtctttattc ttcaactaaa
1861 gcaccatta gttcaacaaa cgaaaattgg ataaagtggg atatttttaa aatatatatt
1921 tatgttacag taatattgac ttttaaaaaa ggattgattc taatgaagaa agcagacaag
1981 taagcctcct aaattcactt tagataaaaa tttaggaggc atatcaaata aactttaata
>>.....cm.....>
2041 aaattgattt MunI agacaattgg aagagaaaag agatatttaa tcattatttg aaccaacaaa
>.....cm.....>
2101 cgacttttag tataaccaca gaaattgata ttagtgtttt ataccgaaac ataaaacaag
>.....cm.....>
2161 aaggatataa attttacct gcatttattt tcttagtgac aagggtgata aactcaaata
>.....cm.....>
2221 cagcttttag aactggttac aatagcgacg gagagttagg ttattgggat aagttagagc
>.....cm.....>
2281 cactttatac aattttgat ggtgatctta aaacattctc tggattttgg actcctgtaa
>.....cm.....>
2341 agaatgactt caaagagttt tatgatttat acctttctga tgtagagaaa tataatggtt
>.....cm.....>
2401 cggggaaatt gtttccaaa acacctatac ctgaaaatgc tttttctctt tctattattc
>.....cm.....>
BsaJI
BtgI
NcoI
StyI
BmrI
2461 catggacttc atttactggg ttttaacttaa atatcaataa taatagtaat taccttctac
>.....cm.....>
2521 ccattattac agcaggaaaa ttcattaata aaggtaattc aatatattta ccgctatctt
>.....cm.....>
```

pLB356

```

2581 tacaggtaca tcattctggt tgtgatgggt atcatgcagg attgtttatg aactctattc
>.....CM.....>

2641 aggaattgtc agataggcct aatgactggc ttttataata tgagataatg cgcactgtac
>.....CM.....>>

2701 tttttacagt cggttttcta atgtcactaa cctgccccgt tagttgaaga aggtttttat

2761 attacagctc caagatctaa atgttttctc ttgactaaat ctgaccattg agataaaata
>>.....ProGroEL.....>

2821 agaatatggt agcactcaac tattaagagt gctaaaaata aaaaatggag gaaagtatat
>.....ProGroEL.....>>
SEC:E7 >>

2881 gaaaaaata aaccttgctt tattaacgct agctactcta atgggagtct catcaacagc
>.....SEC:E7.....>

2941 cgttgatttt gctgatgatg catcacaaca tggagatata cctacattgc atgaatatat
>.....SEC:E7.....>

3001 gttagatttg caaccagaga caactgatct ctactggtat gagcaattaa atgacagctc
>.....SEC:E7.....>
BseMII
BspCNI

3061 agaggaggag gatgaaatag atggtccagc tggacaagca gaaccggaca gagcccatta
>.....SEC:E7.....>
AvaII
Sau96I
PvuII
BsaWI
BanII

3121 caatattgta accttttgtt gcaagtgtga ctctacgctt cggttgtgcg taaaagcac
>.....SEC:E7.....>

3181 acacgtagac attcgtactt tggaaagcct gttaatgggc aactaggaa ttgtgtgccc
>.....SEC:E7.....>
BsaAI
AflIII
BbsI

3241 catctgttct cagaacccat aacagctcca atcactagtg aattcgggc cgctgcagg
>.....SEC:E7.....>>
>>.....ter.....>
BseMII
BspCNI
SpeI
EcoRI
NotI
BsiEI
Eco52I
SbfI

3301 tcgacggtat cgatagcccg cctaagagc gggctttttt ttgatatcaa gcttatcgat
>.....ter.....>>
EcoRV

3361 accgtcgacc

```

Figure 37: Séquençage du clone 1 de la souche recombinante (LL-pLB356) par MWG (Genomic Company, Allemagne).

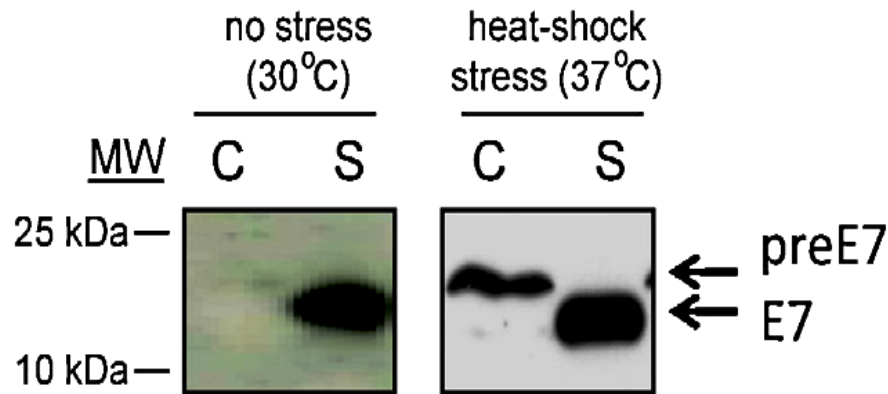


Figure 38: Induction thermique (contrôle du système SICE) de la production de l'antigène E7 par *L. lactis* (LL-pLB356) révélé par western blot dans les surnageants et les culots des cultures stressées (à droite) ou non stressées (à gauche) par la chaleur. La position de l'antigène E7 mature est indiquée par une flèche à droite et les positions des marqueurs de masse moléculaire sont indiquées sur la gauche. (C = culot et S = surnageant).

III.6. Vaccination intra nasale avec *L. lactis* recombinante produisant l'antigène E7 sous le contrôle d'un système SICE afin de protéger et lutter contre les tumeurs par HPV-16

Le papillomavirus humain de type 16 (HPV-16) est un des virus à potentiel oncogène que l'on retrouve (avec le type 18) dans plus de 90 % des cancers du col de l'utérus (300000 décès par an dans le monde). Les stratégies actuelles pour prévenir ou traiter l'infection par ce virus sont prometteuses mais coûteuses.

Dans ce travail, nous avons utilisé une bactérie, *Lactococcus lactis*, recombinante pour délivrer une protéine d'intérêt médical qui est l'antigène E7 du HPV- 16 (E7), protéine retrouvée systématiquement dans des carcinomes provoqués par des infections par des HPV et qui représente l'un des antigènes candidats pour le développement d'une thérapie anti-HPV.

Bermudez-Humaran et *al.*, (2003b ; 2004a, b ; 2005) avaient déjà démontré que l'administration intra-nasale d'une souche de *L. lactis* recombinante basée sur le système SICE exprimant l'antigène E7 induit une réponse immunitaire spécifique d'E7 chez des souris développant des tumeurs cancéreuses induites par une lignée tumorale exprimant E7 de l'HPV-16 (TC-1). La présente expérience fait suite aux travaux de ces auteurs, dans le même

laboratoire, et vise à tester le potentiel de la souche LL-pLB356 qui exprime E7 sous le contrôle du système SICE pour traiter la tumeur chez la souris.

Pour ce faire, la lignée cellulaire TC-1 a d'abord été injectée aux souris vaccinées avec, soit une souche sauvage de *L. lactis* (wt), soit la souche recombinante LL-pLB356. Dans ces conditions, les tumeurs qui apparaissent au bout de 7 jours seront mesurées une fois par semaine tel que cela a été décrit par l'équipe de Bermudez-Humaran citée précédemment.

Comme le montre la figure 39 ci-dessous, le volume de la tumeur des souris vaccinées avec la souche LL-pLB356 a été réduit ($\sim 1\text{cm}^3$) par rapport à ceux des souris immunisées par la souche LL-pLB44 ($\sim 2,7\text{ cm}^3$) ou du PBS ($2,9\text{ cm}^3$).

Un tel mode de vaccination aurait donc un potentiel curatif. Le mode d'administration joue, lui aussi, un rôle important. En effet, les travaux de Warrino et *al.*, (2004) et de Jong et *al.*, (2004) ont montré que seule la voie intra nasale stimule efficacement la prolifération des lymphocytes T CD4 au niveau local, elle-même influant sur la production de lymphocytes B et T cytotoxiques.

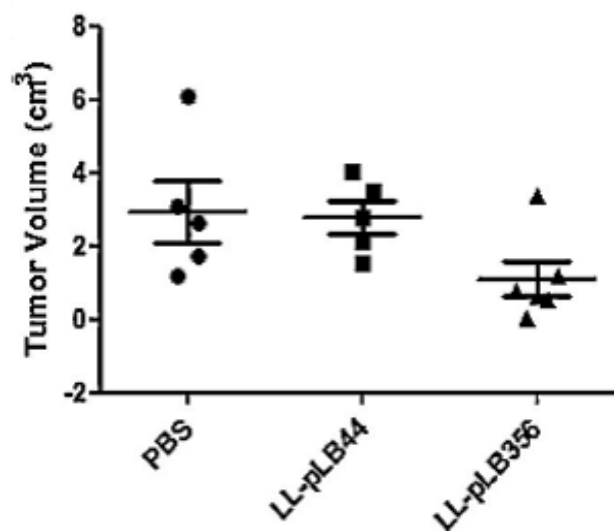


Figure 39 : Régression du volume de la tumeur induite chez les souris par injection de la lignée cellulaire TC1 sous l'effet d'une immunisation par la souche recombinante *L. lactis* LL-pLB356 par rapport aux lots de souris immunisées par la souche sauvage *L. lactis* LL-pLB44 ou par le PBS.

En outre, il n'y avait pas de mortalité chez les souris vaccinées par la souche recombinante, tandis qu'un taux de mortalité de l'ordre de 16 % a été observé chez les lots de souris qui ont reçu du PBS ou La souche LL-pLB44 (fig.40).

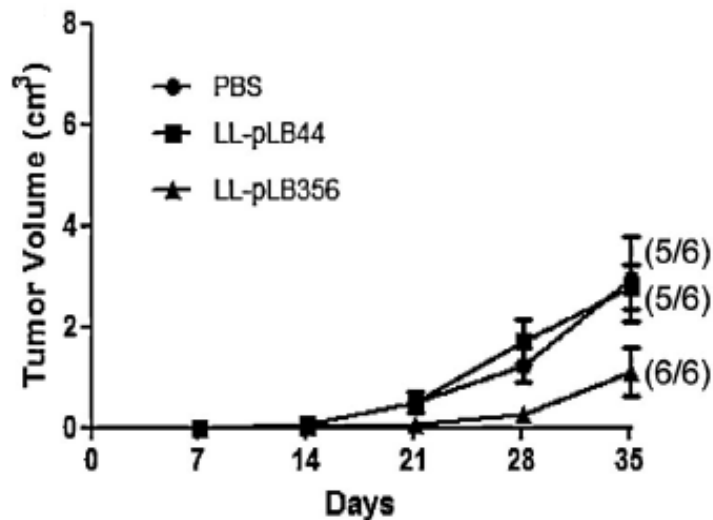


Figure 40 : Réduction de la mortalité des souris (entre parenthèses) et du volume de leur tumeur sous l'effet d'une immunisation avec la souche recombinante *L. lactis* LL-pLB356 par rapport à celle avec une souche *L. lactis* sauvage LL-pLb44 ou avec du PBS.

III.7. La lyse des cellules TC-1 par la médiation et activation des splénocytes des souris

Immunisées.

Pour élucider le mécanisme de protection de la souche recombinante de *L.lactis* sécrétant l'antigène E7 sous le contrôle du système SICE contre la tumeur provoquée par la lignée de cellule TC-1, nous avons d'abord déterminé si une réponse immunitaire cellulaire (production des cytokines IL-2 et INF gamma : Interleukine-2 et Interféron) a été induite chez les souris vaccinées. Sept jours après la dernière immunisation (J35), les souris ont été sacrifiées. Les quantités d'IL-2 INF gamma produites par les lymphocytes T ont été mesurées par ELISA.

Les échantillons préparés à partir de splénocytes restimulés *in vitro* avec la protéine E7 purifiée, comme le montre la figure 41, les splénocytes provenant de souris immunisées avec *L. lactis* recombinante LL-pLB356 produisent des niveaux d'IL-2, significativement ($p < 0,05$) plus élevés (4 X supérieur) que ceux des splénocytes de souris immunisées par le PBS et *L. lactis* sauvage LL-pLB44. Les résultats concernant la production de cytokine FN- γ chez les

souris immunisées avec la souche recombinante LL-pLB356 n'ont pas été reportés ici car ils ne présentent aucune différence significative avec les autres lots de souris immunisées au PBS ou avec la souche *L. lactis* sauvage.

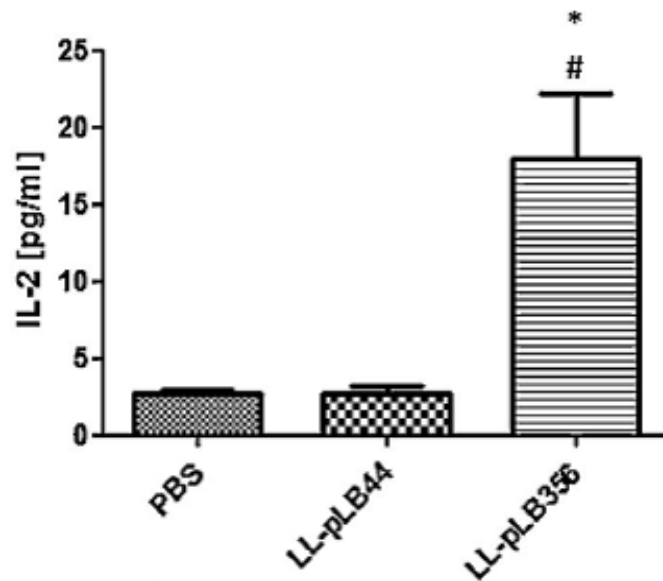


Figure 41 : Différences significatives ($P < 0,05$) des niveaux de production de cytokine IL2 par les splénocytes comme réponse immunitaire cellulaire protectrice contre les tumeurs entre la vaccination intra nasale des souris avec la souche recombinante *L. lactis* LL-pLB356 et celles réalisées avec la souche *L. lactis* sauvage LL- pLB44 ou le PBS. Des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont indiquées par un astérisque (*) entre les groupes vaccinés par PBS et LL- pLB356 ou par un signe dièse (#) entre les groupes immunisées par LL- pLB44 et LL- pLB356.

Nous avons ensuite déterminé si une réponse cytotoxique (CTL) a été induite chez les souris vaccinées. Pour ce faire, les splénocytes ont été isolés à partir de souris immunisées, 7 jours après la dernière administration, elles sont stimulées in vitro avec l'antigène E7 purifié. On procède ainsi à une co-incubation de splénocytes avec l'antigène E7 et les cellules ; et pour arrêter leur division cellulaire (TC-1), on rajoute de la Mitomycine. Les splénocytes stimulés ont ensuite été testés pour la reconnaissance et la lyse des cellules viables et fraîches TC-1.

Après 5 jours de coculture des splénocytes provenant des souris immunisées avec la souche recombinante LL-pLB356, il y a une nette prolifération, en comparaison avec les autres aux lots témoins de souris (contrôles).

Les cellules TC-1, formant une dense couche bien adhérente en présence de splénocytes de contrôle (souris traitées avec du PBS ou la souche sauvage LL-pLB44), ont presque ou complètement disparu en présence de splénocytes provenant de souris vaccinées avec la souche LL-pLB356, confirmant que ces splénocytes induisent une lyse très efficace des TC-1 in vitro.

Ces résultats suggèrent que l'immunité générée par *L. lactis* recombinante LL-pLB356 contre les cellules TC-1 implique l'activation d'une réponse antigène spécifique CTL.

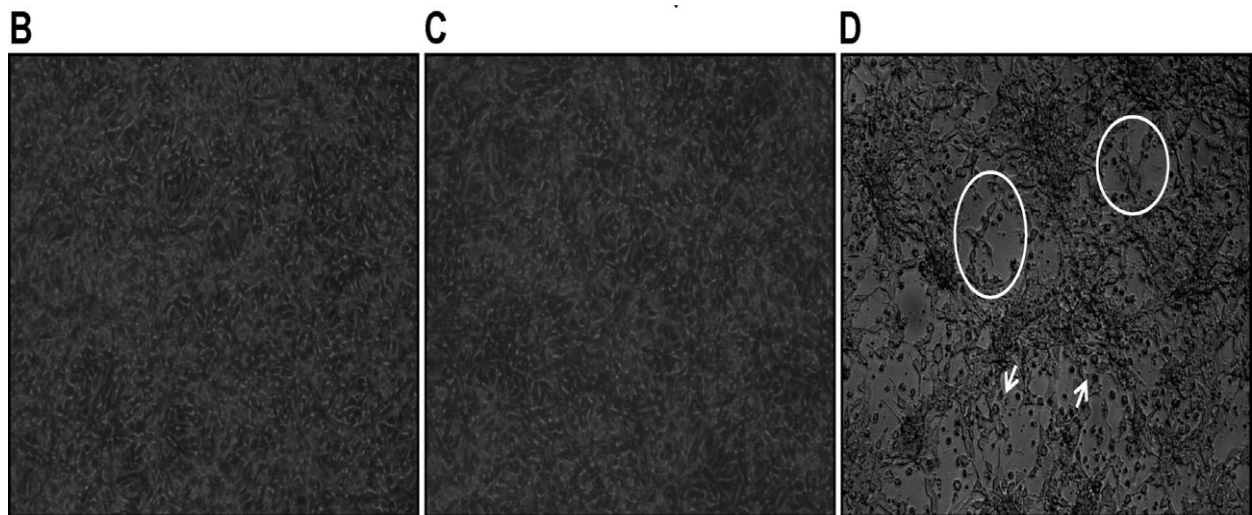


Figure 42 : Cytolyse des cellules tumorales TC-1 par des splénocytes provenant de souris immunisées par le PBS (**B**), *L. lactis* recombinante LL- pLB44 (**C**), ou *L. lactis* sauvage LL-pLB356 (**D**). La lyse des cellules TC-1 a été contrôlée au microscope et photographiée à 100 ×grossissement. Après 5 jours de coculture, les splénocytes issus de souris immunisées avec LL- pLB356 ont clairement proliféré (flèches blanches) par rapport aux lots témoins. En outre, les cellules TC-1, qui ont formé une couche dense fixée dans les panneaux B et C, ont presque complètement disparu dans le panneau D (cercles blancs), ce qui indique que les splénocytes de souris immunisées par LL- pLB356 induisent une lyse efficace des cellules TC-1

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons cherché à mettre en œuvre un système d'expression inductible dans le modèle de bactérie lactique recombinante « *Lactococcus lactis* », approprié pour la production et la livraison de protéines d'intérêt santé *in situ* au niveau des surfaces muqueuses. Il nous fallait, donc, concevoir et mettre en œuvre un système dans lequel l'expression de la protéine est induite lors de l'administration de *L. lactis* recombinante à l'hôte, ce qui va assurer la production et la livraison de la molécule d'intérêt *in situ*. Nous avons décidé de développer un système d'expression régulé par le stress ou SICE (Stress Induced Controlled expression).

En effet, lors de leur administration à l'hôte, les bactéries recombinantes vont se trouver confrontées à des conditions très différentes de celles de leur culture habituelle et, par conséquent, vont devoir subir divers types de stress : y compris le stress thermique si la température du corps du patient (37°C) à traiter est suffisamment élevée par rapport à la température de croissance optimale de ces bactéries.

Dans le cas d'une administration orale, le stress thermique peut s'accompagner d'un stress acide dû à l'acidité gastrique et à un stress biliaire dans le duodénum.

En outre, un tel système représente une alternative intéressante pour le traitement de certaines maladies telles que l'« Inflammatory Bowel Disease » ou IBD. Il permet la livraison de protéines thérapeutiques localement dans le tractus gastro-intestinal lors du passage des bactéries. Ceci permet une action localisée de la protéine et donc une plus grande efficacité par utilisation de modèles différents de vaccination de la muqueuse permettant la délivrance de la molécule d'intérêt (par exemple, l'antigène) localement à la surface des muqueuses (buccale ou nasale) .

Afin de développer le système de SICE, nous avons cherché tout au long de la littérature parmi les promoteurs de différents gènes de *L. lactis* (en particulier ceux qui découlent de la souche MG1363 induite dans des conditions de stress. Nous avons constaté que le promoteur de l'opéron groESL a répondu à nos conditions souhaitées. En effet, GroES et Gro EL sont deux protéines chaperonnes, rapidement induites par le stress thermique.

Par la suite, nous avons cloné le promoteur groESL de *L. lactis* MG1363 et validé sa capacité à cibler et contrôler l'expression de la protéine rapporteur modèle: la nucléase de *Staphylococcus* (Nuc). Nous avons, également validé la fonctionnalité du système SICE *in vivo* dans deux modèles murins différents de pathologies de l'homme :

- a) un modèle de thérapie contre les MICI.
- b) un modèle de vaccination contre la tumeur liée au HPV-16 par le clonage chez la souris de la cytokine IL-10 et l'antigène E7 HPV-16, respectivement.

En épilogue, nous pouvons dire que cette étude démontre l'utilisation potentielle d'un nouveau système d'expression régulé par le système SICE chez *L. lactis* recombinante pour fournir des protéines d'intérêt santé au niveau local, c'est à dire au niveau des surfaces muqueuses précisément. Cette plate-forme représente également une bonne alternative pour les applications futures dans les maladies humaines telles que le cancer et les inflammations intestinales.

PERSPECTIVES.

L'utilisation des organismes génétiquement modifiés dans les protocoles de traitement des maladies inflammatoires reste tributaire de l'évolution de la législation en la matière. Néanmoins, ce potentiel génomique de production et de sécrétion de molécules thérapeutiques est une faculté qui, à priori, existe chez les souches lactiques sauvages non pathogènes dont la découverte et l'isolement demeurent liés à l'investissement consenti en matière d'opérations de screening à grande échelle d nouveaux génomes bactériens pouvant avoir, en plus, le status GRAS.

Liste des Références Bibliographiques

-A-

1. **Adel-Patient K**, Nahori MA, Proust B, et al (2003). Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clin Exp Allergy*, 33(3): 376-85.
2. **Alexandersen S** (1996). Advantages and disadvantages of using live vaccines risks and control measures *Acta Vet Scand Suppl*, 90:89-100.
3. **Ameho, C.K.**, Adjei, A.A., Harrison, E.K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y. *et al.* (1997) Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*, **41**: 487-493.

-B-

4. **Baker, C.C.**, Phelps, W.C., Lindgren, V., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Howley, P.M (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*, 61: 962-971.
5. **Baumer, P** (2002). La maladie de Crohn. Information pour les patients et leur famille: *AFA*.
6. **Benbouziane B**, Ribelles P, Aubry C, Martin R, Kharrat P, Riazi A, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, (2013). Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J Biotechnology*, 168 :120-129.
7. **Bermúdez-Humarán LG**, Langella P, Miyoshi A, et al (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 68(2):917-22.
8. **Bermudez-Humaran, L.G.**, Langella, P., Commissaire, J., Gilbert, S., Le Loir, Y., L'Haridon, R., Corthier, G., (2003a), Controlled intra- or extracellular production of Staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 224: 307-313.
9. **Bermudez-Humaran, L.G.**, Langella, P., Cortes-Perez, N.G., Gruss, A., Tamez-Guerra, R.S., Oliveira, S.C., Saucedo-Cardenas, O., Montes de Oca-Luna, R., Le Loir, Y., (2003b). Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infection and Immunity*, 71 : 1887-1896.
10. **Bermúdez-Humarán, LG.**, Cortes-Perez, NG., Le Loir, Y., Gruss, A., Rodriguez-Padilla, C., Saucedo-Cardenas, O., Langella, P., Montes de Oca-Luna, R (2003c). Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Progress*, 19:1101-04.

11. **Bermúdez-Humarán LG**, Corthier G, Langella P (2004 a). Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res Devel Microbiology*, 8:147-60.
 12. **Bermúdez-Humarán LG**, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, et al (2004b). An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J Med Microbiol*, 53 : 427-33.
 13. **Bermudez-Humaran, L.G.**, Cortes-Perez, N.G., Lefevre, F., Guimaraes, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J.M., Gratadoux, J.J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S., Corthier, G., Gruss, A., Langella, P., (2005). A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *Journal of Immunology*, 175: 7297-7302.
 14. **Bermudez-Humaran, L.G.**, Cortes-Perez, N.G., Ah-Leung, S., Lefevre, F., Yang, G., Pang, Q., Wu, C., Zeng, Y., Adel-Patient, K., Langella, P., (2008). Current prophylactic and therapeutic uses of a recombinant *Lactococcus lactis* strain secreting biologically active interleukin-12. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14 : 80-89.
 15. **Bermúdez-Humarán LG** (2009). *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Hum Vaccin*, 5(4):264-7.
 16. **Bermudez-Humaran, L.G., Langella, P.**, (2009). Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux. *Revue francophones des laboratoires*, 417 : 79-89.
 17. **Beukema EL, Brown MP, Hayball JD** (2006). The potential role of fowlpox virus in rational vaccine design. *Expert Rev Vaccines*, 5(4):565-77.
 18. **Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al** (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11,(5):731-53.
 19. **Boyaka PN, McGhee JR** (2001). Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Adv Drug Deliv Rev*, 51(1-3):71-9.
 20. **Braat, H.**, Rottiers, P., Hommes, D.W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J.P. *et al* (2006). Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4(6):754-9.
- C-
21. **Carroll, IM.**, Andrus, JM., Bruno-Bárcena, JM., Klaenhammer, TR., Hassan, HM., Threadgill, DS (2007). Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 293 : 729-738.

22. **Castellsagué X** (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 110:S4-7.
23. **Cesta MF** (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34(5):599-608.
24. **Chang TL**, Chang TL, Chang CH, Simpson DA, *et al* (2003). Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci USA* 100,(20):11672-7.
25. **Chopin, A.**, Chopin, MC., Moillo-Batt, A., Langella, P. (1984). Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11, 260-263.
26. **Christensen D, Korsholm KS, Rosenkrands I, et al** (2007). Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, 6(5):785-96.
27. **Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells** (2008). Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(1):2-12.
28. **Cortes-Perez NG, Poquet I, Oliveira M, et al** (2006). Construction and characterization of a *Lactococcus lactis* strain deficient in intracellular ClpP and extracellular HtrA proteases. *Microbiology*, 152: 2611-8.
29. **Cortes-Perez, N.G.**, Lefevre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P., and Bermudez-Humaran, L. (2007). Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine*, 25: 6581-6588.

-D-

30. **Daudel D, Weidinger G, Spreng S** (2007). Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 6(1):97-110.
31. **De Jong, A.**, van Poelgeest, M.I., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Fleuren, G.J., Melief, C.J. *et al* (2004). Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*, 64: 5449-5455.
32. **De Ruyter, PG, OP Kuipers, MM Beerthuyzen, et al** (1996). Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 178:3434-39.
33. **Djordjevic GM, Klaenhammer TR** (1998). Inducible gene expression systems in *Lactococcus lactis*. *Mol Biotechnol*, 9(2):127-39.
34. **Dyson, N.**, Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243: 934-937.

-F-

35. **Foligne, B.**, Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamailard, M., Pot, B., Simonet, M., Daniel, C., 2007. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory Yersinia LcrV protein. *Gastroenterology*, 133 : 862–874.
36. **Foligne, B.**, Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S. *et al* (2007b). Correlation between in vitro and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol*, 13: 236-243.
37. **Fournet, J., and Dhumeaux, D. (2001)** Le livre blanc de l'hépatogastroentérologie. In. snfge (ed).
38. **Frees D, Ingmer H (1999)**. Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*, 31(1):79-87.

-G-

39. **Gasson, M.J.**, 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other *lactic streptococci* after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*, 154: 1–9.
40. **Gilliland SE**. Gilliland SE (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 7 (1-2):175-88.
- 41.

-H-

42. **Han, W., Mercenier, A., Ait-Belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., van, S., II et al** (2006). Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis*, 12: 1044-1052.
43. **Holmgren J, Czerkinsky C** (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*, 11(4 Suppl):S45-53.
44. **Holmgren J, Harandi AM, Czerkinsky C** (2003). Mucosal adjuvants and anti-infection and anti immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Expert Rev Vaccines*, 2(2):205-17.
45. **Hu KF, Lövgren-Bengtsson K, Morein B** (2001). Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 51(1-3):149-59.

-I-

46. **Illum L, Davis SS** (2001). Nasal vaccination: a non-invasive vaccine delivery method that holds great promise for the future. *Adv Drug Deliv Rev*, 51(1-3):1-3.
47. **Imaoka, A.**, Shima, T., Kato, K., Mizuno, S., Uehara, T., Matsumoto, S. *et al* (2008). Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol*, 14: 2511-2516.

48.

49. **Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, et al** (1990). Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun*, 58(9):2929-34.

-J-

50. **Jennings GT, Bachmann MF** (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*, 389(5):521-36.

-K-

51. **Karkhanis LU, Ross TM** (2007). Mucosal vaccine vectors: replication-competent versus replication-deficient poxviruses. *Curr Pharm Des*, 13(19):2015-23.
52. **Kim SJ, Jun DY, Yang CH, et al** (2006). Expression of *Helicobacter pylori* cag12 gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(3):462-70.
53. **Kim, S.G., Batt, C.A** (1993). Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* groESL operon. *Gene*, 127 :121–126.
54. **Kitajima, S.,** Morimoto, M., Sagara, E., Shimizu, C., and Ikeda, Y (2001). Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Exp Anim*, 50: 387-395.
55. **Klijn, A.,** Mercenier, A., and Arigoni, F(2005). Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 491-509.
56. **Krüger C,** Hu Y, Pan Q, et al (2002). In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol*, 20(7):702-6.
57. **Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, et al** (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*, 270(45):27299-304.
58. **Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, et al** (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*, 270(45):27299-304.

-L-

59. **Lack G** (2008). Clinical practice. Food allergy. *N Engl J Med*;359(12):1252-60.
60. **Lakhdari,O.,** Cultrone, A., Tap, J., Gloux, K., Bernard, F., Ehrlich, S.D. et al (2010). Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-kB modulation in the human gut. *PLoS One*, 5:13092.
61. **Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, et al** (1996). Direct screening of recombinants in gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *J Bacteriol*, 1;178(14):4333.

62. **Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, et al** (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 180(7):1895-903.
63. **Lee, H.S., Han, S.Y., Bae, E.A., Huh, C.S., Ahn, Y.T., Lee, J.H., and Kim, D.H** (2008). Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int Immunopharmacol*, 8: 574-580.
64. **Ljungh A, Wadström T**(2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*, 7(2):73-89.
65. **Lycke N** (2005). Targeted vaccine adjuvants based on modified cholera toxin. *Curr Mol Med*,5(6):591-7.

-M-

66. **Mater DD, Corthier G** (2004). Response of lactic acid bacteria to the digestive environment. *J Clin Gastroenterol*, 38 (6 Suppl):S64-6.
67. **Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N. et al** (2005). Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*, 140: 417-426.
68. **Martín R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, Sokol H, Verdu EF, Bercik P, Bermúdez-Humarán LG, Langella P** (2014).The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis.* (3):417-30.
69. **Metzger DW** (2009). IL-12 as an adjuvant for the enhancement of protective humoral immunity. *Expert Rev Vaccines*, 8(5):515-8.
70. **Mielcarek N, Alonso S, Loch C** (2001). Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Adv Drug Deliv Rev*, 51 (1-3):55-69.
71. **Mierau I, Kleerebezem M** (2005). 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(6):705-17.
72. **Morello, E., Bermudez-Humaran, L.G., Llull, D., Sole, V., Miraglio, N., Langella, P., Poquet, I.,** 2008. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14, 48–58.
73. **Moss B** (1991). Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science*, 252(5013):1662-7.

-N-

74. **Neutra MR, Kozlowski PA** (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*, 6(2):148-58.
75. **Norton PM, Brown HW, Wells JM, et al** (1996). Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 14(2-3):167-77.
76. **Norton PM, Brown HW, Wells JM, et al**. Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*,14(2-3):167-77.
77. **Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, et al** (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res*, 2(1):102-11.

-O-

78. **O'Garra A** (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8:275-83.
79. **Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R**(1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98: 694-702.

-P-

80. **Patterson LJ, Robert-Guroff M** (2008). Replicating adenovirus vector prime/protein boost strategies for HIV vaccine development. *Expert Opin Biol Ther*, 8(9):1347-63.
81. **Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, et al** (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, 179(9):3068-72.
82. **Poquet I, Saint V, Seznec E, et al** (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol*, 35(5):1042-51.

-R-

83. **Reveneau N, Geoffroy MC, Loch C, et al** (2002). Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine*, 20 (13-14):1769-77.
84. **Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, et al** (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol*, 15(7):653-7.

-S-

85. **Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M. et al** (1998). Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol*, 44: 93-106.
86. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.**, (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
87. **Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, et al** (2008). An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*, 26 Suppl 10:K53-61.
88. **Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J., and Remaut, E** (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb Technol*, 27:761-765.
89. **Schultz, M., Strauch, U.G., Linde, H.J., Watzl, S., Obermeier, F., Gottl, C. et al** (2004). Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11: 372-378.
90. **Sheil, B., MacSharry, J., O'Callaghan, L., O'Riordan, A., Waters, A., Morgan, J. et al** (2006). Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin Exp Immunol*, 144: 273-280.
91. **Siegers K, Entian KD** (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol*, 61(3):1082-9.
92. **Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D** (2007). Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev Vaccines*, 6(5):797-808.
93. **Smotkin, D., and Wettstein, F.O**(1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4680-4684.
94. **Société Nationale Française de Gastroenterologie (1999a)** Rectocolite hémorragique. In.
95. **Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.J. et al**(2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 16731-16736.
96. **Stackebrandt E, Teuber M** (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3):317-24.

-T-

97. **Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M., and Ito, Y** (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 63: 1465-1469.

-U-

98. **Ulaeto D, Hruby DE** (1994). Uses of vaccinia virus in vaccine delivery. *Curr Opin Biotechnol*, 5(5):501-4.

-V-

99. **Van Asseldonk M, de Vos WM, Simons G** (1993). Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase. *Mol Gen Genet*, 40:428-434.
100. **Van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R.J., de Vos, W.M., and Simons, G** (1990). Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis subsp. lactis* MG1363. *Gene*, 95: 155-160.
101. **Van der Vossen JM, van der Lelie D, Venema G** (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol*.53(10):2452-7.
102. **Vesa, T., Pochart, P., and Marteau, P** (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther*, 14: 823-828.
103. **Villinger F** (2003). Cytokines as clinical adjuvants: how far are we? *Expert Rev Vaccines*, 2(2):317-26.

-W-

104. **Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P., and Beck, P.L.** (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 96: 29-36.
105. **Warrino, D.E., Olson, W.C., Knapp, W.T., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S. et al** (2004). Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res*, 10: 3301-3308.
106. **Warrino, D.E., Olson, W.C., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S., Da Silva, D.M. et al** (2005). Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Hum Immunol*, 66: 762-772.
107. **Watterlot, L., Rochat, T., Sokol, H., Cherbuy, C., Bouloufa, I., Lefevre, F., Gratadoux, J.J., Honvo-Hueto, E., Chilmonczyk, S., Blugeon, S., Corthier, G., Langella, P., Bermudez-Humaran, L.G.,** (2010). Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS. *International Journal of Food Microbiology*, 144 : 35-41.

108. **Wells JM, Mercenier A** (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol*, **6**(5):349-62.
109. **Wells JM, Wilson PW, Norton PM, et al** (1993). *Lactococcus lactis*: highlevel expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol*, **8**(6):1155-62.
110. **Wu C, Yang G, Bermúdez-Humarán LG, et al** (2006). Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Int Immunopharmacol*, **6**(4):610-5.

-Y-

111. **Yamada, Y., Marshall, S., Specian, R.D., and Grisham, M.B** (1992). A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*, **102**: 1524-1534.

-Z-

112. **Zwerschke, W., and Jansen-Durr, P** (2000). Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res*, **78**: 1-29.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications :

- **Benbouziane B**, Ribelles P, Aubry C, Martin R, Kharrat P, Riazi A, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, (2013). Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J Biotechnology* 168 :120-129.
- Ribelles P1, **Benbouziane B**, Langella P, Suárez JE, Bermúdez-Humarán LG, (2013). Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(3):1395.

Communications orales avec comité de lecture :

- **Bouasria Benbouziane**, Bermúdez-Humarán LG, Langella P et Riazi A,(2012).Construction of recombinant lactic acid bacteria able to express in intestinal mucosa therapeutic molecules under the control of bile salts-inducible promoteur. *III Journées Scientifiques de la faculté SNV.Univ Mostaganem.*
- **Bouasria Benbouziane**, Bermúdez-Humarán LG, Langella P et Riazi A, (2013). Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs de molécules thérapeutiques. *IV èmes Journées Scientifiques de la faculté SNV. Univ Mostaganem.*

Communications affichées :

- **Bouasria Benbouziane**, Bermúdez-Humarán LG, Langella P et Riazi A, (2012). Construction of recombinant strain of *Lactococcus lactis* able to express heterologous therapeutic molecules locally in the musocalsurfaces. *18 ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques à Clermont-Ferrand.*
-
- **Bouasria Benbouziane** et Riazi A, (2010). Elaboration d'un lait fermenté avec souches bénéfiques. *XVI èmes Journées Nationales de Microbiologie à UHB Chlef.*
- **Bouasria Benbouziane** et Riazi A, (2009). Etude des effets protecteurs de quelque souche de probiotiques isolée vis-à-vis *Salmonella enteritidis* chez les souris conventionnelles. *XIVèmes Journées Nationales de Microbiologie à Univ Tlemcen.*