



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université Henri Poincaré, Nancy I
Faculté des Sciences et Techniques

Master Microbiologie
Parcours Biotechnologies Microbiennes
Année universitaire 2009-2010

Conception de constructions génétiques permettant l'utilisation
de *Clostridium acetobutylicum* dans une thérapie contre le cancer

Mémoire présenté par **François Wasels**

Travaux dirigés par Monsieur le Professeur Philippe Soucaille



Sommaire

Sommaire

Abréviations

Introduction	1
Préambule	1
1. Les tumeurs et leurs traitements.....	1
2. Historique de l'utilisation des <i>Clostridia</i> dans les thérapies anticancéreuses	3
3. Protéines d'intérêt thérapeutique chez <i>Clostridium novyi-NT</i>	4
3.1. Phospholipase C (NT01CX0979)	4
3.2. Lipase (NT01CX2047)	5
4. Choix de l'espèce bactérienne à utiliser pour une thérapie.....	6
5. Utilisation de <i>C. acetobutylicum</i> dans les thérapies anticancéreuses	6
6. La souche $\Delta perR$ de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	7
7. Présentation du projet et des objectifs du stage	8
Matériels et Méthodes	9
1. Souches et plasmides utilisés	9
2. Milieux de culture et conditions de croissance	9
2.1. <i>Escherichia coli</i>	9
2.2. <i>Clostridium acetobutylicum</i>	9
2.3. Détection d'activités enzymatiques sur milieu solide.....	10
2.4. Evaluation des concentrations cellulaires	10
3. Techniques de génie génétique	10
3.1. Isolement et manipulation des acides nucléiques	10
3.1.1. Transformation d' <i>E. coli</i>	10
3.1.2. Préparations d'ADN plasmidique chez <i>E. coli</i>	11
3.1.3. Transformation de <i>C. acetobutylicum</i>	11
3.1.4. Enzymes.....	11
3.2. Techniques d'analyse des acides nucléiques	12
3.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose	12
3.2.2. Amplification de fragments d'ADN	12
4. Techniques analytiques – Purifications et dosages enzymatiques	12
4.1. Purification des protéines de fusion	12
4.2. Dosage des protéines.....	13
4.3. Identification des activités enzymatiques sur milieu solide.....	13
4.3.1. Identification de l'activité phospholipase C	13
4.3.2. Identification de l'activité lipase.....	13
4.4. Dosage des activités enzymatiques	13
4.4.1. Activité phospholipase.....	13
4.5. Analyses en gel SDS-PAGE des protéines en conditions dénaturantes	14
4.6. Western Blot	14

Résultats	15
1. Choix de la souche de <i>C. acetobutylicum</i>	15
2. Choix des gènes de <i>C. novyi-NT</i> à exprimer chez <i>C. acetobutylicum</i>	15
3. Construction des plasmides	16
4. Purification des protéines d'intérêt	17
4.1. Phospholipase C tronquée	17
4.2. Lipase	18
5. Caractérisation enzymatique de la phospholipase C	19
6. Expression des protéines de <i>C. novyi-NT</i> chez <i>C. acetobutylicum</i>	19
6.1. Expression hétérologue de la phospholipase C NT01CX0979 tronquée	19
6.2. Expression hétérologue de la lipase NT01CX2047	20
7. Délétion de la cassette de résistance à l'érythromycine dans la souche MGCcac15ΔperR ...	20
Discussion	22

Références Bibliographiques

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
APS	persulfate d'ammonium
ATCC	american type culture collection
BSA	albumine de sérum bovin
D.O. _{X nm}	densité optique à X nm
FRT	flip recombinase target : cible de la flip recombinase
Da	dalton
K _M	constante de Michaelis
nt	nucléotides
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
Pb	paire de bases
PLAT	domaine retrouvé dans les protéines polycystine-1, lipoxygenase et toxine α
PLPC	phospholipase C
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
SDS	sodium dodecyl sulfate
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
UI	unité internationale
V _{max}	Vitesse maximale

La dénomination des acides aminés suit le code à une ou trois lettres.

Introduction

Préambule

Plus du quart des habitants des pays développés seront atteints d'une tumeur au cours de leur vie, et leur traitement est une priorité dans le domaine de la médecine. Outre les approches classiques utilisées lors des thérapies, d'autres stratégies sont envisagées et notamment l'utilisation de bactéries, en particulier celles du genre *Clostridium*.

Dans cette introduction, nous présenterons tout d'abord brièvement les principaux traitements utilisés pour combattre les tumeurs, puis plus particulièrement ce qui a été réalisé concernant l'emploi de différentes espèces de *Clostridium* en thérapie. Deux protéines d'intérêt identifiées dans ce genre bactérien et qui ont été caractérisées pour leurs capacités anti-tumorales seront ensuite présentées, ainsi que le vecteur bactérien *Clostridium acetobutylicum*, choisi pour les exprimer dans les cellules tumorales.

1. Les tumeurs et leurs traitements

L'un des principaux challenges pour l'élaboration d'une thérapie anticancéreuse est le développement d'une approche létale pour les tissus cancéreux, et inoffensive pour les tissus sains.

De nombreuses approches ont été imaginées dans l'optique de combattre les tumeurs. Les principales sont la chirurgie, lors de laquelle on procède à l'excision de la zone tumorale; la chimiothérapie qui consiste en l'utilisation de molécules chimiques permettant d'empêcher la croissance de la tumeur; et enfin la radiothérapie lors de laquelle les cellules cancéreuses vont être irradiées. Ces différentes techniques peuvent être utilisées indépendamment ou conjointement, selon les circonstances.

Dans de nombreux cas, ces méthodes sont suffisantes pour éradiquer les tumeurs, ou du moins pour contrôler la maladie. Il existe cependant des types de tumeurs et des cas particuliers pour lesquels ces approches sont inefficaces. Pour cette raison, de nouvelles approches sont en cours d'investigation.

Le concept de la thérapie consistant à exposer les cellules tumorales à un facteur toxique tout en épargnant les cellules saines s'avère particulièrement complexe. Au cours des dernières années, la tendance a été d'utiliser des protéines présentant des activités intéressantes et de les diriger spécifiquement dans les zones tumorales. Les stratégies diffèrent selon que les protéines utilisées ont un effet direct, comme les cytokines, ou un effet indirect, en étant capable de générer des substances cytotoxiques à partir de précurseurs inactifs. Ces agents ont pu montrer leur efficacité, mais la difficulté réside dans le fait de les diriger spécifiquement contre les tumeurs.

Dans un premier temps, les protéines d'intérêt furent fusionnées à des anticorps dirigés contre des antigènes censés être présents uniquement sur les cellules tumorales (Bagshawe, 1987). Plus récemment, avec la notion de thérapie génique, l'approche utilisée a consisté à délivrer les gènes codant pour les protéines thérapeutiques, en faisant appel à des vecteurs viraux (Dobbelstein, 2003).

Cependant, de nombreuses difficultés apparaissent lors de l'utilisation de ce type de vecteurs. En effet, un manque de spécificité pour les cellules cancéreuses a été observé, même lorsque ces virus sont délivrés dans la zone tumorale par injection directe. De plus, ils sont relativement inefficaces pour se disperser à travers toute la masse tumorale (Minton, 2003).

Des solutions ont récemment été proposées tel l'utilisation de virus ne pouvant se répliquer que dans les cellules tumorales (Short et Curiel, 2009).

De même, des systèmes non viraux permettant de délivrer des gènes d'intérêt sont en cours de développement, basés par exemple sur l'utilisation de liposomes (Kaasgaard et Andresen, 2010).

Enfin, une autre approche consistant à utiliser l'environnement de la tumeur comme un marqueur de spécificité a été développée. Une des particularités de ces tissus est le fait qu'on y trouve des zones hypoxiques, c'est à dire des zones dans lesquelles la présence d'oxygène est moindre que dans des tissus normaux, dits normoxiques. Cette particularité a conduit à placer devant les gènes codant des protéines d'intérêt des séquences régulatrices permettant l'expression de ces protéines uniquement en conditions d'hypoxie (Greco *et al.*, 2002).

Cette particularité qu'ont les tumeurs de contenir des zones hypoxiques est aussi l'une des raisons de l'observation de résistance des cellules cancéreuses aux traitements que sont la radiothérapie et la chimiothérapie (Harris, 2002). En effet les tumeurs à un stade avancé de développement sont moins sensibles à ces traitements. Une des causes majeures de cet échec thérapeutique semble être la faible vascularisation de certaines zones dans les tumeurs. En effet, l'efficacité des radiations ionisantes nécessite la présence d'oxygène, acheminé par les vaisseaux sanguins. De même, les molécules à effets chimiothérapeutique ont besoin d'atteindre la zone où elles sont nécessaires, et requièrent donc également une vascularisation suffisamment importante de la zone à traiter.

Dans le cas des radiothérapies, qui est un mode traitement employé majoritairement (Harrison *et al.*, 2002), il a été montré que des cellules hypoxiques sont jusqu'à trois fois plus résistantes aux radiations ioniques que des cellules normoxiques (Teicher, 1995). Dans les tumeurs, le manque d'oxygène est dû au fait que les vaisseaux sanguins sont structurellement et fonctionnellement anormaux, ce qui entraîne un flux sanguin non homogène, et donc un apport non optimal d'oxygène. De ce fait, la présence de régions hypoxiques dans les tumeurs est une cause majeure de l'échec des traitements de type radiothérapie.

Cet état d'hypoxie est également un environnement idéal pour la croissance de bactéries anaérobies strictes, telles que celles appartenant au genre *Clostridium*. En effet, l'apparition d'infections, conséquence de la colonisation des tumeurs par ces bactéries est souvent l'un des premiers signes de la présence de cellules malignes chez un patient (Wei *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des études ont pu montrer que lors d'injections par voie intraveineuse de spores de *Clostridium*, ces dernières se dispersent dans tous le corps, mais ne vont germer et croître que dans les zones hypoxiques présentes dans les tumeurs (Minton, 2003).

Cette approche apporte également des avantages non négligeables comparés à l'utilisation de virus. Ainsi, le gène codant la protéine d'intérêt n'a plus besoin d'être intégré dans le génome des cellules humaines pour être actif. De plus, le traitement peut être stoppé à tout moment par l'utilisation d'antibiotiques.

L'ensemble de ces raisons et la prédisposition des spores de *Clostridium* à germer uniquement dans les régions hypoxiques des zones tumorales en font un vecteur idéal pour la distribution de gènes codant des protéines d'intérêt dans l'optique d'une thérapie anticancéreuse.

2. Historique de l'utilisation de *Clostridium* dans les thérapies anticancéreuses

Le genre *Clostridium* est l'un des plus importants chez les procaryotes, comprenant des firmicutes sporulantes en forme de bâtonnet. Il contient certaines espèces pathogènes productrices de toxines telles que *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* et *Clostridium perfringens*, mais la majorité des espèces de ce genre n'est pas pathogène, et est retrouvée dans les sols (Barbé *et al.*, 2005). Certaines espèces peuvent également avoir un intérêt industriel, par exemple *Clostridium acetobutylicum* et *Clostridium butyricum*. Outre le fait qu'elles soient strictement anaérobies, l'une des particularités de ces bactéries réside dans leur capacité à se différencier morphologiquement et à sporuler. Cette faculté est un facteur important de virulence des pathogènes de ce genre, et peut conduire par exemple à des intoxications alimentaires causées par *C. botulinum*. Ses spores étant résistantes aux traitements utilisés durant les processus de fabrication de produits alimentaires, elles vont conduire à des cas de botulisme. D'un autre côté, cette capacité de sporulation, alliée au fait qu'elles sont strictement anaérobies ouvre des perspectives intéressantes dans l'optique de la mise en place de thérapies anticancéreuses faisant appel à ces bactéries (Lambin *et al.*, 1998).

L'idée d'utiliser le genre *Clostridium* dans le traitement des tumeurs n'est pas récente. Dès les années 1920-1930, des expériences ont été conduites suite aux observations de la diminution de la taille de tumeurs chez des rats infectés par ces bactéries (Torrey et Kahn, 1927 ; Connel, 1935).

En 1955, Malmgren et Flanigan ont démontré la sélectivité de *Clostridium tetani* pour les zones hypoxiques présentes dans les tumeurs en inoculant à des souris atteintes de tumeurs ou saines des spores de cette bactérie. Ils observèrent que les souris saines survivaient alors que la totalité des souris porteuses de tumeurs mouraient. Cette mortalité est causée par la sécrétion de la toxine tétanique par la bactérie lors de la croissance de cette dernière dans les régions hypoxiques uniquement présentes dans les tumeurs.

Depuis, de nombreuses études ont été réalisées, et ont montré entre autre qu'après la diminution de la zone tumorale cette dernière pouvait recommencer sa croissance. En effet, les cellules cancéreuses en périphérie de la tumeur ne sont pas ciblées par la bactérie puisque présentes dans des zones dans lesquelles la présence d'oxygène est suffisante pour empêcher leur croissance (Möse et Möse, 1964). Par ailleurs, il a également été montré que l'injection de spores d'espèces de *Clostridium* non pathogène, telles que celles de *Clostridium sporogenes*, n'est pas toxique chez l'Homme (Carey *et al.*, 1967).

Il y a une dizaine d'années, une équipe américaine a utilisé une autre espèce de ce genre bactérien dans le but de concevoir une thérapie anticancéreuse : *Clostridium novyi* (Dang *et al.*, 2001). Les auteurs ont pu observer les très bonnes capacités de colonisation des tumeurs de cette espèce bactérienne, en les comparant à celles d'autres bactéries anaérobies telles que différentes espèces de *Clostridium* et des bactéries appartenant aux genres *Lactobacilliae* et *Bifidobacteriae*.

La bactérie *C. novyi* est un pathogène et son utilisation provoque la mort des souris auxquelles elle est injectée, en raison de l'expression de plusieurs toxines.

L'espèce *C. novyi* est divisée en plusieurs sous-espèces en fonction des toxines qu'elles synthétisent. Dang et ses collaborateurs ont utilisé pour leur étude la souche ATCC19402, qui appartient au type A de cette espèce, et qui exprime les toxines α , γ , δ et ϵ (Hatheway *et al.*, 1990). Parmi celles-ci, seule la première est létale pour l'homme. Le gène codant cette toxine

est situé sur un épisode (Eklund *et al.*, 1974). Afin de pouvoir utiliser cette souche en s'affranchissant des problèmes de toxicité, les auteurs ont tout d'abord cherché à curer la souche de cet épisode et ont obtenu la souche *C. novyi-NT* (NonToxigenic).

Plusieurs stratégies basées sur l'utilisation de cette espèce ont été mises au point, parmi lesquelles l'injection de spores de cette bactérie conjointement à l'utilisation de molécules à effet chimiothérapeutique (Cheong *et al.*, 2006). Dans ce cas précis, les auteurs ont pu identifier un gène d'intérêt permettant d'agir de manière indirecte sur les tumeurs, en permettant de rompre les membranes de liposomes contenant des molécules à effet chimiothérapeutique, et en libérant leur contenu dans les seules zones où les cellules sont capables de croître, les tumeurs.

Cependant, une approche utilisant *C. novyi-NT* comme un agent anti-tumoral est pour l'instant en suspens en raison du manque de connaissances concernant la physiologie et la génétique de cet organisme, et l'impossibilité à ce jour de la modifier génétiquement.

3. Protéines d'intérêt thérapeutique chez *Clostridium novyi-NT*

En raison des capacités de colonisation et de réduction des tumeurs de cette espèce bactérienne, son génome a été séquencé (Bettegowda *et al.*, 2006). Certaines des protéines spécifiquement exprimées au sein des tumeurs et potentiellement impliquées dans la faculté de la bactérie à lyser les cellules tumorales ont pu être identifiées. Les plus intéressantes sont une phospholipase C et une lipase, codées respectivement par les gènes *NT01CX0979* et *NT01CX2047*.

3.1. Phospholipase C (*NT01CX0979*)

Les phospholipases C sont caractérisées par leur site de clivage dans les phospholipides (figure 1, page 4 bis), qui les distinguent d'autres phospholipases telles que celles de type A et D, également produites chez certaines bactéries (Titball, 1993).

Deux phospholipases C ont à ce jour été identifiées dans le génome de *C. novyi-NT*, codées par les gènes *NT01CX0979* et *NT01CX1638* (Bettegowda *et al.*, 2006). La première correspond à la toxine γ de *C. novyi* qui, au contraire de la toxine α , se trouve sur le chromosome. Elle a été décrite comme étant hémolytique, nécrosante et ayant une activité de type lécithinase (Hatheway, 1990). Cette enzyme nécessite la présence de zinc, et est très proche des phospholipases C de *C. difficile* (Tsutsui *et al.*, 1995) et de *C. haemolyticum* (Hauer *et al.*, 2004), qui correspondent respectivement aux toxines α et β de ces organismes. Ces deux toxines, au contraire de la toxine γ de *C. novyi*, sont létales.

Cette enzyme, tout comme un grand nombre de ses homologues chez d'autres espèces de *Clostridium* est constituée de deux domaines (figure 2, page 4 ter). En N-terminal se trouve le domaine catalytique PLPC (phospholipase C) et en C-terminal un domaine PLAT (polycystin-1, lipoxygénase and alpha toxin). Le premier contient le site actif responsable du clivage des phospholipides tandis que le second semble être impliqué dans la reconnaissance du substrat.

Le domaine C-terminal est en partie responsable des différences observées entre les phospholipases des différentes espèces de *Clostridium*. Des altérations dans sa séquence vont influencer sur des paramètres tels que la capacité de l'enzyme à être létale. Ainsi, le remplacement de la tyrosine 331 de l'enzyme de *C. perfringens* par un résidu isoleucine dans

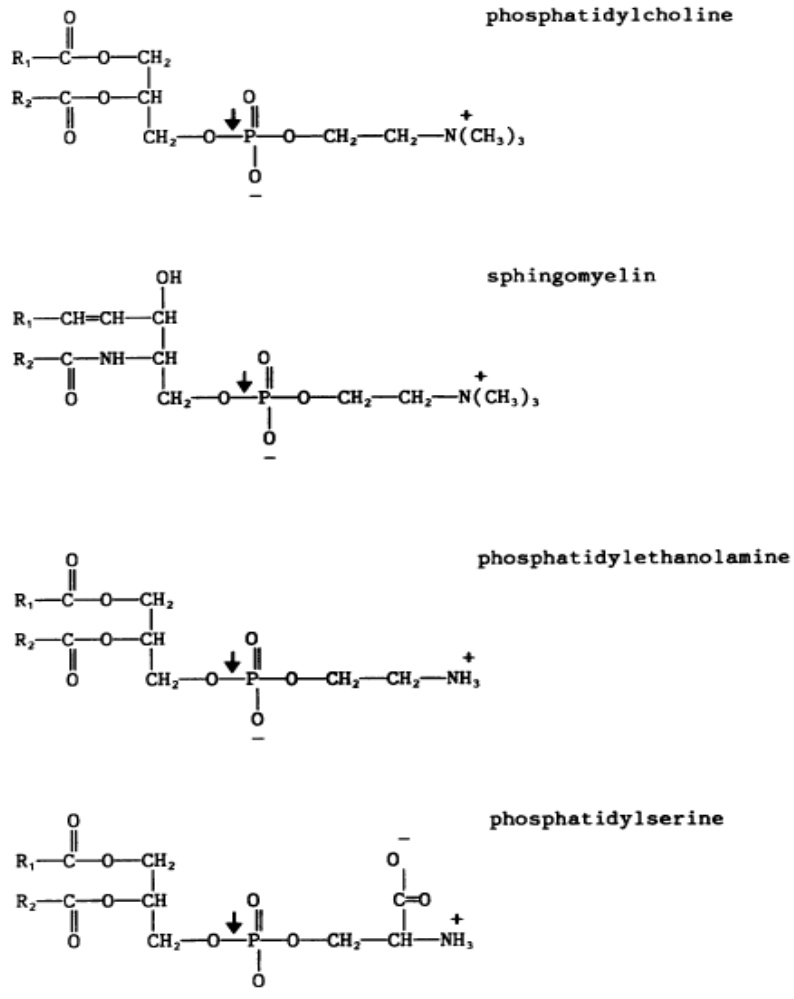


Figure 1 : sites de clivage des principaux phospholipides par les enzymes de type phospholipase C. Le site de coupure est indiqué par une flèche. (Titball 1993)

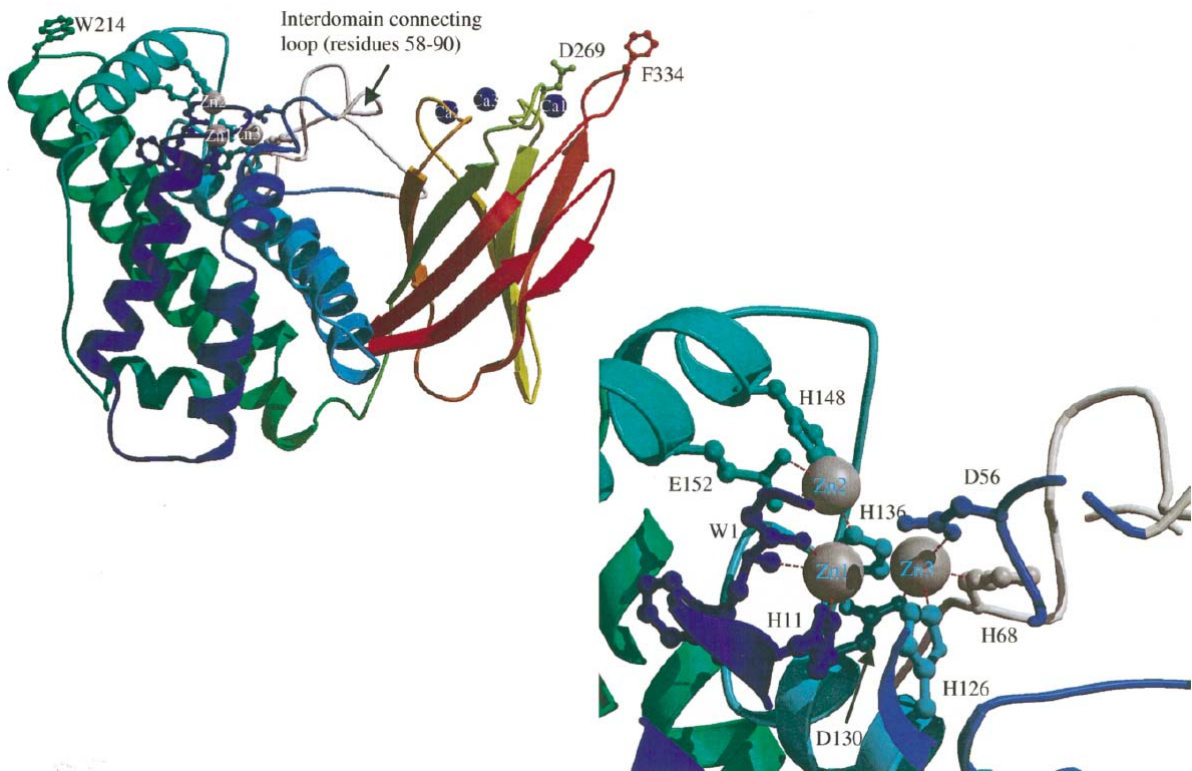


Figure 2 : Structure des phospholipases C du genre *Clostridium* (ici *C. perfringens*).

Ces protéines sont constituées de deux domaines. En N-terminal se trouvent des hélices α constituant le domaine PLPC. En C-terminal, des feuillets β constituent le domaine PLAT.

En médaillon, le site catalytique de l'enzyme, situé dans le domaine N-terminal, responsable du clivage de l'enzyme, et qui nécessite la présence d'ions Zn^{2+} .

Illustration tirée de Jepson et Titball, 2000.

l'enzyme de *C. novyi-NT* est responsable de la différence de toxicité observée entre ces deux protéines (Jepson et Titball, 2000).

Le domaine PLAT est remarquable car sa structure tridimensionnelle est semblable à celle de protéines eucaryotes, telles que la lipase pancréatique humaine et la 15-lipoxygénase de lapin (Bateman et Sandford, 1999). Cette similarité pourrait être à l'origine de la toxicité que provoquent ces protéines en interagissant avec des cellules eucaryotes. Ainsi, il a été montré que la toxine α de *C. perfringens* utilise son domaine C-terminal pour se fixer aux membranes de cellules eucaryotes. Elle prend alors la place des protéines qui possèdent un domaine structurellement semblable, tels que les protéines avec un domaine C2, la phosphokinase C par exemple.

La phospholipase C de *C. novyi-NT* a été caractérisée d'un point de vue enzymatique, et ses différents substrats ont été déterminés (Taguchi et Ikezawa, 1974). Cependant, le gène codant cette protéine n'a encore jamais été cloné. Elle est capable d'agir sur la phosphatidylcholine, la sphingomyéline, le lysophosphatidylglycerol, la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol et le phosphatidylglycerol.

Lors du séquençage du génome de *C. novyi-NT*, le transcriptome de cette souche a également été déterminé (Bettegowda *et al.*, 2006). Grâce à ces données, il a pu être mis en évidence que la phospholipase C est fortement exprimée lors de l'infection de souris porteuse de tumeur, ce qui indique qu'elle joue probablement un rôle dans les capacités anti-tumorales propres à cette espèce bactérienne.

3.2. Lipase (NT01CX2047)

D'autres protéines potentiellement intéressantes dans l'optique d'être utilisées dans une thérapie anticancéreuse ont pu être identifiées lors du séquençage du génome de *C. novyi-NT*.

Une d'elles en particulier a retenu l'attention du groupe ayant étudié ce génome, la lipase NT01CX2047, qui a été caractérisée par la suite (Cheong *et al.*, 2006). Tout comme la phospholipase C NT01CX0979, cette protéine voit son niveau d'expression augmenter fortement lors de l'infection de tumeurs, et semble donc impliquée dans les capacités de colonisation des cellules cancéreuses par *C. novyi-NT*.

Cette protéine a été identifiée comme étant impliquée dans les capacités hémolytiques de *C. novyi-NT* et une stratégie basée sur cette capacité a alors été imaginée. En effet, des molécules à effets chimiothérapeutiques encapsulées dans des préparations liposomales pourraient être relarguées en présence d'une activité hémolytique, capable de rompre les bicouches lipidiques.

Les lipases ne sont normalement pas des enzymes capables de rompre de telles membranes, puisque celles-ci contiennent des phospholipides. En outre, il apparaît que le gène codant cette protéine ne présente pas une homologie forte avec son plus proche analogue, une lipase de *C. tetani*, puisque l'identité de séquence protéique entre elles n'est que de 50%.

Il a également été montré que l'activité liposomase n'est pas dépendante de l'activité lipase, puisque les mutations dans le gène codant cette protéine qui vont abolir la capacité de l'enzyme à agir sur les lipides n'ont qu'un effet limité sur sa capacité à rompre les membranes des liposomes. Ceci serait dû au fait que ce sont des interactions physiques entre la protéine et la membrane qui vont provoquer une perturbation de cette dernière, et conduire à sa rupture, et non une quelconque activité enzymatique à proprement parler.

Afin de savoir si une approche utilisant des spores de *C. novyi-NT* conjointement à des molécules à effet chimiothérapeutique pourrait conduire à des résultats intéressants, des souris porteuses de tumeurs ont été traitées en combinant des spores à de la doxorubicine, un agent provoquant des dommages de l'ADN, encapsulé ou non dans des liposomes. La simple observation de la toxicité inhérente à l'emploi de doxorubicine seule, qui conduisait à la mort de tous les sujets traités en moins de deux semaines confirmait la nécessité d'adresser ces molécules aux zones tumorales uniquement. A contrario, l'utilisation de doxorubicine encapsulée et de spores de *C. novyi-NT* permettait d'obtenir des résultats encourageants. En effet, les tumeurs de l'ensemble des souris disparaissaient lors du traitement, et 65% des spécimens survivaient à celui-ci. La séquestration de l'agent chimiothérapeutique permet de prévenir ses effets toxiques. Son relargage ne peut se faire que dans les zones où les cellules de *Clostridium* sont capables de croître, c'est à dire les zones hypoxiques présentes dans les tumeurs. Ce sont dans ces zones que *C. novyi-NT* est capable de croître et de produire la lipase apte à dégrader les liposomes. En conséquence, les cellules saines ne sont pas exposées à l'agent chimique, qui n'agit que sur les cellules malignes.

L'identification d'une activité liposomase ouvre des perspectives de stratégies thérapeutiques utilisant des capacités autres que la lyse directe des cellules cancéreuses par les bactéries, puisque de nombreuses molécules peuvent virtuellement être encapsulées dans des liposomes.

Cette protéine présente donc un intérêt évident dans la conception d'une thérapie anti-tumorale, et son expression permettrait d'utiliser toutes sortes de molécules chimiques encapsulées dans des liposomes, dans le but de les distribuer de manière zone-spécifique (figure 3, page 6 bis).

4. Choix de l'espèce bactérienne à utiliser pour une thérapie

Les gènes codant les protéines d'intérêt de *C. novyi-NT* pourraient être clonés et exprimés dans un organisme présentant les mêmes particularités que possède cet organisme. En particulier, le fait d'être un organisme strictement anaérobie et possédant la capacité de sporuler. D'un autre côté, l'organisme choisi devra être non pathogène, et facilement modifiable génétiquement. Enfin, idéalement, cet organisme devra être proche de *C. novyi-NT* afin de faciliter l'expression de gènes provenant de cet organisme. L'espèce *C. acetobutylicum* remplit l'ensemble de ces critères, d'autant plus que de nombreux outils génétiques performants ont été mis au point pour cet organisme au cours des dernières années (Soucaille *et al.*, 2006 ; Heap *et al.*, 2007).

Cet organisme présente les mêmes caractéristiques que les autres espèces de son genre, citées précédemment, à savoir qu'il s'agit d'une bactérie gram positive, en forme de bâtonnet et capable de sporuler. Elle est couramment utilisée en industrie pour la production d'acétone, d'éthanol et de butanol, et a connu un regain d'intérêt récemment dans l'optique de la production de biocarburants.

5. Utilisation de *C. acetobutylicum* dans les thérapies anticancéreuses

L'espèce *C. acetobutylicum* a déjà été utilisée lors d'études précédentes concernant la conception de thérapies anticancéreuses (Lambin *et al.*, 1998 ; Theys *et al.*, 1999 ; Theys *et al.*, 2001 ; Dang *et al.*, 2001). La souche ATCC824 de *C. acetobutylicum* a été utilisée dans ces travaux et a été séquencée en 2001 (Nölling *et al.*, 2001).

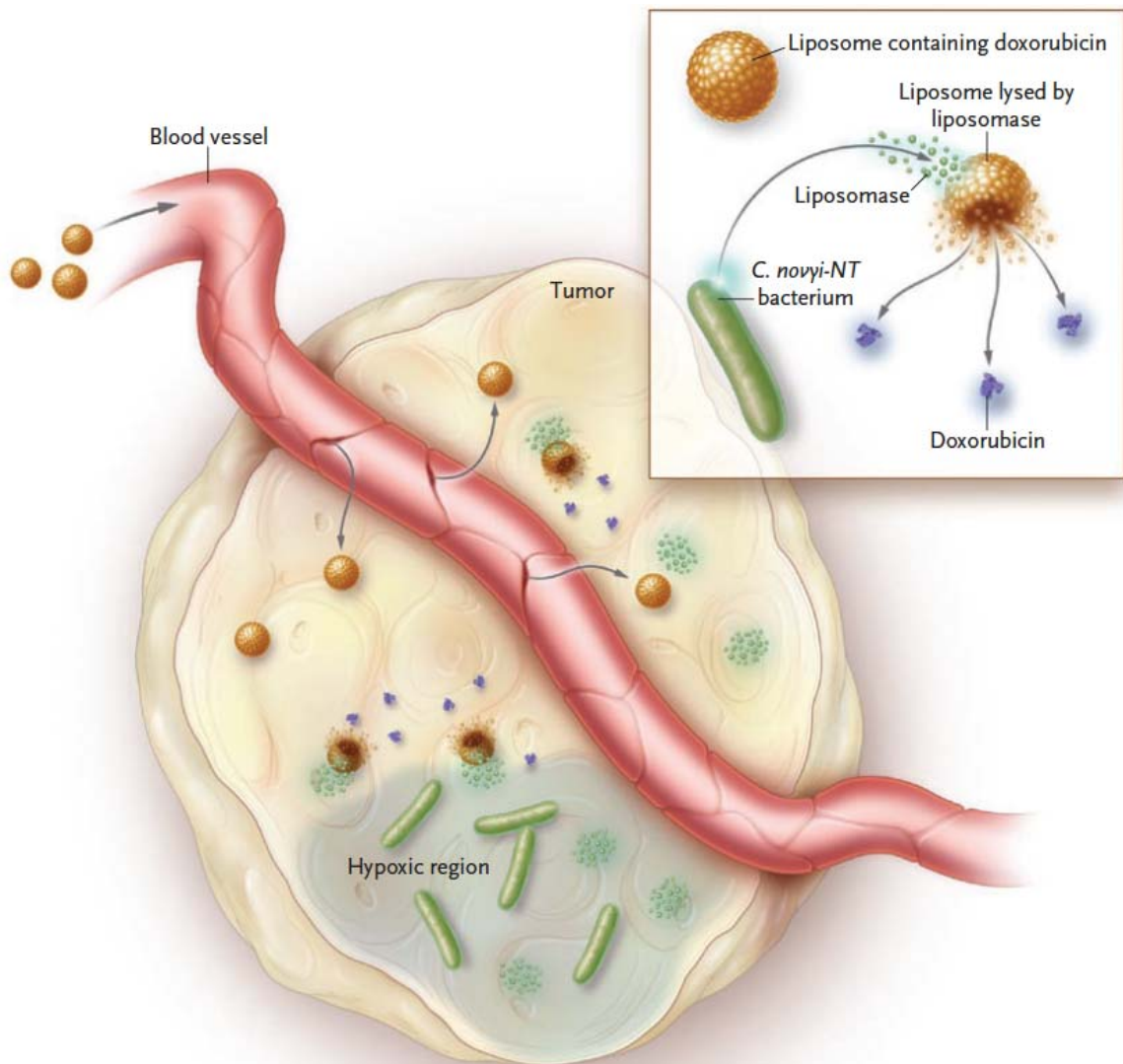


Figure 3 : Utilisation conjointe de spores de *Clostridium* exprimant une protéine à activité liposomase et de molécules à effet thérapeutique encapsulées dans des liposomes.
Doxorubicine : agent chimiothérapeutique capable d'endommager les molécules d'ADN.
Illustration tirée de Juliano, 2007.

Lors des études réalisées par Lambin, Theys et leurs collaborateurs, cette souche avait été employée pour exprimer des protéines d'intérêt thérapeutique tel qu'un facteur nécrosant des tumeurs de souris (mTNF- α), une cytokine présentant de nombreux effets anti-tumoraux (Sidhu et Bollon, 1993) ou encore une cytosine deaminase provenant d'*E. coli* permettant de convertir une prodrogue inoffensive pour les cellules humaines, la 5-fluorocytosine (5-FC) en drogue active, la 5-fluorouracile (5-FU), un agent chimiothérapeutique extrêmement toxique (Yazawa *et al.*, 2002).

Les auteurs ont conçu des constructions génétiques permettant l'expression de ces protéines dans la souche ATCC824. Ils n'ont cependant pas testé leur capacité de colonisation et de lyse des tumeurs *in vivo*.

Dang et ses collaborateurs ont quant à eux comparé les capacités naturelles de différentes espèces de *Clostridium*, de *Bifidobacteriae* et de *Lactobacilli* à coloniser les tumeurs. Ils se sont par la suite uniquement concentrés sur *C. novyi* et *Clostridium sordelii*, pour qui les résultats étaient les plus prometteurs.

On peut supposer que les bons résultats obtenus avec *C. novyi-NT*, une espèce protéolytique, sont dus à l'expression de protéines aux capacités cellolytiques, permettant une bonne colonisation des tissus tumoraux. Ces protéines ne sont pas présentes chez *C. acetobutylicum*, qui fait partie des espèces de *Clostridium* dites solvotogéniques. Cela peut expliquer pourquoi cette espèce est moins efficace pour coloniser les tumeurs. L'expression de protéines impliquées dans les capacités de colonisation de *C. novyi* pourrait améliorer son efficacité d'action contre les cellules tumorales.

6. La souche Δ perR de *Clostridium acetobutylicum*

En 2008, Hillmann et ses collaborateurs ont construit une souche mutante de *C. acetobutylicum* ATCC824 dans laquelle la protéine PerR n'est plus exprimée.

Les protéines de type PerR font partie de la famille des protéines de type Fur (Ferric Uptake Regulator) (Bsat *et al.*, 1998). Des études antérieures concernant des homologues chez des organismes tels que *Bacillus subtilis* (Helmann *et al.*, 2003), *Synechocystis* sp. (Li *et al.*, 2004) et *Streptococcus pyogenes* (Brenot *et al.*, 2007) avaient déjà montré que cette protéine agit principalement comme un répresseur de la synthèse de gènes impliqués dans la réponse de la cellule à la présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Dans le cas de *C. acetobutylicum*, PerR agit comme un régulateur de la synthèse de nombreux gènes. Ainsi, l'expression de 87 gènes est modifiée d'un facteur supérieur à 3 dans un mutant Δ perR (Hillmann *et al.*, 2009). Parmi ceux-ci, on retrouve l'ensemble des gènes dont l'expression est stimulée par la présence d'oxygène. Comme chez les organismes cités ci-dessus, PerR agit en réprimant leur synthèse en anaérobiose. Une séquence consensus, nommée boîte PerR, à été identifiée en amont des gènes dont l'expression est la plus affectée par l'absence du régulateur. Cela suggère une interaction directe entre ce dernier et les gènes qu'il réprime.

Cette protéine agit comme un senseur et la présence d'oxygène va provoquer une dérégulation des gènes impliqués dans les voies de détoxification de la cellule.

L'effet de la délétion de ce régulateur a plusieurs effets. Le plus notable est une diminution de la sensibilité vis-à-vis de l'oxygène et de ses dérivés toxiques. Ainsi, il apparaît qu'un mutant Δ perR est capable de tolérer des quantités 7 fois plus importantes d'H₂O₂ qu'une souche exprimant le régulateur.

De plus, des expériences complémentaires ont montré qu'une souche Δ perR est capable

de croître sur milieu solide en présence d'oxygène si les 48 premières heures de culture se font en anaérobiose. Ceci n'est pas le cas pour une souche sauvage de *C. acetobutylicum*, qui est incapable de se développer et de survivre en milieu oxygéné.

Cette tolérance accrue à l'oxygène de la souche *ΔperR* pourrait présenter un intérêt dans la conception d'une thérapie anti tumorale. Elle pourrait permettre l'accession de la bactérie synthétisant les protéines d'intérêt à des zones que nous qualifierons de moins hypoxiques, correspondant par exemple à des tumeurs solides de taille moins importante que celles ciblées par les bactéries de type *Clostridium* utilisées jusqu'à présent. Tout l'intérêt de l'utilisation d'une telle souche réside dans le fait de parvenir à obtenir une tolérance idéale à l'oxygène, lui permettant de croître dans des zones faiblement hypoxiques, et donc de réduire au minimum le nombre de cellules tumorales non affectées par les traitements conventionnels. Cependant, il est évident que la souche bactérienne ne devra pas pouvoir se développer dans les zones normalement oxygénées, sans quoi tout l'intérêt de l'utilisation d'une bactérie anaérobie serait perdu.

7. Présentation du projet et des objectifs du stage

Au vu de l'ensemble de ces informations, un projet de recherche a été initié. Il consiste en la construction d'une souche de *C. acetobutylicum* capable de coloniser et lyser les tumeurs de manière efficace et sélective.

Pour cela, il a été décidé de permettre la synthèse des deux protéines d'intérêt de *C. novyi-NT* codées par les gènes *NT01CX2047* et *NT01CX0979* chez *C. acetobutylicum* afin d'observer l'effet de leur expression sur la capacité de la bactérie à coloniser et à agir sur les tumeurs.

Par ailleurs, dans le but de coloniser des tumeurs de taille moins importante que ce qui a pour l'instant été décrit dans la littérature, la souche de *C. acetobutylicum* utilisée n'exprimera plus le régulateur PerR, la rendant ainsi plus tolérante à l'oxygène. En effet, nous espérons permettre ainsi la colonisation de tumeurs dans lesquelles les régions hypoxiques sont moins importantes, et donc inaccessibles à des souches de *Clostridium* sensibles à l'oxygène. Cependant, il faudra également s'assurer que le fait d'améliorer la tolérance de cette bactérie ne lui permette pas de croître en dehors des régions tumorales.

Dans le cadre de ce projet, mon stage avait pour objectifs :

- Le clonage des gènes *NT01CX2047* et *NT01CX0979* de *C. novyi-NT*, dans un vecteur navette permettant leur expression à la fois dans *E. coli* et dans *C. acetobutylicum*.
- La caractérisation biochimique de la lipase et de la phospholipase C de *C. novyi-NT*.
- L'expression de ces protéines fusionnées à une étiquette de type Strep-tag, de manière à pouvoir les purifier pour produire des anticorps dirigés contre elles, permettant la détection des protéines non étiquetées chez *C. acetobutylicum* et lors de tests sur des organismes modèles tels que les souris.
- Confirmer que ces protéines sont correctement exprimées et exportées dans la souche sauvage de *C. acetobutylicum* sauvage et dans le mutant n'exprimant plus PerR.

Matériels et Méthodes

1. Souches et plasmides utilisés

L'ensemble des souches de *C. acetobutylicum* et d'*E. coli* utilisées, leurs caractéristiques, ainsi que l'ensemble des plasmides utilisés et construits lors de cette étude sont présentés dans le tableau 1 en page 9 bis. Le clonage des gènes de *C. novyi-NT* a été réalisé en utilisant comme matrice l'ADNg de cette bactérie, fourni par Bert Vogelstein du Howard Hughes Institute (Baltimore, USA).

2. Milieux de culture et conditions de croissance

2.1. *Escherichia coli*

La composition des milieux de culture utilisés pour la croissance des souches d'*E. coli* est présentée en page 9 ter.

Le milieu LB a été utilisé pour la culture des souches d'*E. coli*. Après autoclave (20 min à 121°C), il est éventuellement supplémenté avec des antibiotiques (ampicilline à 100 µg.ml⁻¹, chloramphénicol à 30 µg.ml⁻¹, streptomycine à 70 µg.ml⁻¹) dans le cas de cultures de souches transformées par des plasmides portant un ou plusieurs gènes de résistance à ces antibiotiques.

Le milieu SOC est un milieu riche utilisé pour la culture des cellules *E. coli* TOP10 et BL21 (DE3) lors de la préparation de cellules compétentes, selon le protocole décrit par Inoue *et al.* en 1990, ainsi que pour la régénération des cellules transformées, après un choc thermique ou une électroporation.

Les cultures sont réalisées à 37°C, sous agitation dans le cas de cultures liquides, sauf indication contraire.

2.2. *Clostridium acetobutylicum*

La composition des milieux de culture utilisés pour la croissance des souches de *C. acetobutylicum* est présentée en page 9 quater.

Les cultures en milieu liquide se font en milieu riche CGM. La sporulation des souches se fait en milieu liquide synthétique MS. Après autoclave (20 min à 121°C), ces milieux sont éventuellement supplémentés avec les antibiotiques appropriés (thiamphénicol à 10 µg.ml⁻¹, érythromycine à 40 µg.ml⁻¹).

La régénération des cellules transformées après électroporation se fait en milieu riche 2YTG.

C. acetobutylicum est une bactérie anaérobie stricte, le maintien des conditions anaérobies sévères est un prérequis pour la croissance. Ainsi, l'ensemble des milieux liquides est dégazé avant stérilisation. Pour cela, le milieu est porté à ébullition, puis dégazé à chaud avec de l'azote pendant 20 minutes. Afin de vérifier qu'il n'y a pas de traces d'oxygène, un indicateur coloré, la résazurine, est ajouté au milieu de culture avant ébullition, à une concentration de 1 mg.ml⁻¹.

Les cultures en milieu solide sont réalisées sur milieu RCA. La sporulation sur milieu solide est réalisée par étalement sur MS + agar. Ces milieux sont équilibrés sous atmosphère anaérobie 24h avant utilisation.

Souche ou plasmide	Caractéristiques principales ^a	Source ou référence
Souches		
<i>E. coli</i> TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG λ</i>	(Invitrogen)
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [argU proL Cam ^r] [argU <i>ileY leuW Strep/Spec</i> ^r]	(Stratagene)
<i>C. acetobutylicum</i> MGCcac15	ATCC824 Δ <i>cac1502</i>	Soucaille <i>et al.</i> 2006
<i>C. acetobutylicum</i> MGCcac15Δ <i>perR</i>	ATCC824 Δ <i>cac1502 ΔperR::mIsR</i>	Hillmann <i>et al.</i> 2008
Plasmides		
pSOS94	promoteur <i>ptb</i> , operon acetone, Ap ^r , MLS ^r , <i>repL</i> , origine ColE1	Girbal <i>et al.</i> 2003
pSOS95	promoteur <i>thlA</i> , operon acetone, Ap ^r , MLS ^r , <i>repL</i> , origine ColE1	Tummala <i>et al.</i> 1999
pSOS95del	promoteur <i>thlA</i> , Ap ^r MLS ^r <i>repL</i> , origine ColE1	Tummala <i>et al.</i> 2003
pCST long linker	promoteur <i>thlA</i> , <i>thlA</i> , <i>Strep</i> -tag II long linker, Ap ^r , MLS ^r , <i>repL</i> , origine ColE1	Soucaille <i>et al.</i> Non publié
pS2047	promoteur <i>thlA</i> , NT01CX2047, Ap ^r MLS ^r <i>repL</i> , origine ColE1	Cette étude
pS0979	promoteur <i>thlA</i> , NT01CX0979tr, Ap ^r MLS ^r <i>repL</i> , origine ColE1	Cette étude
pS2047::0979	promoteur <i>thlA</i> , NT01CX2047, NT01CX0979tr, Ap ^r MLS ^r <i>repL</i> , origine ColE1	Cette étude
pPTB2047::0979	promoteur <i>ptb</i> , NT01CX2047, NT01CX0979tr, Ap ^r MLS ^r <i>repL</i> , origine ColE1	Cette étude
pCST2047	promoteur <i>thlA</i> , NT01CX2047, <i>Strep</i> -tag II long linker, Ap ^r , MLS ^r , <i>repL</i> , origine ColE1	Cette étude
pCST0979	promoteur <i>thlA</i> , NT01CX0979tr, <i>Strep</i> -tag II long linker, Ap ^r , MLS ^r , <i>repL</i> , origine ColE1	Cette étude
pCLF1	promoteur <i>thlA</i> , <i>FLP1</i> , <i>catP</i> , <i>repL</i> , origine ColE1	Soucaille <i>et al.</i> 2006

Tableau 1 : Souches et plasmides utilisés lors de l'étude.

^a Abréviations : Ap^R, gène de résistance à l'ampicilline ; MLS^R, gène de résistance au macrolide-lincosamide-streptogramine B ; *catP*, gène de résistance au thiamphénicol/chloramphénicol ; *thlA*, thiolase de *C. acetobutylicum* ; *ptb*, phosphotransbutyrylase de *C. acetobutylicum* ; NT01CX2047, gène codant la lipase de *C. novyi-NT* ; NT01CX0979tr, gène codant le domaine PLPC de la phospholipase C de *C. novyi-NT* ; *repL*, origine de répllication chez les bactéries gram⁺ : ColE1, origine de répllication chez les bactéries gram⁻ ; *FLP1*, flip recombinase de *Saccharomyces cerevisiae*.

Milieux de culture utilisés pour la culture d'*Escherichia coli* :**Composition du milieu LB :**

Bactotryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	170 mM
H ₂ O	qsp 1l

Pour la préparation de milieu solide, 15g d'agar sont ajoutés.

Composition du milieu SOC :

Bactotryptone	20g
Extrait de levure	5g
NaCl	10 mM
Glucose	20 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ , 6H ₂ O	10 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	10 mM
H ₂ O	qsp 1l

Milieux de culture pour la culture de *Clostridium acetobutylicum* :**Composition du milieu synthétique (MS) à base de glucose :**

Glucose	330 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
K ₂ HPO ₄	3 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 mM
FeSO ₄ , 7H ₂ O	40 µM
CH ₃ COOH	40 mM
H ₂ O	qsp 1l

Le pH est ajusté à 6,50 avec du NH₃.

Avant autoclave, le milieu est complété avec :

Acide ρ -aminobenzoïque	60 µM
Biotine	160 nM

Avant utilisation, ajout de cystéine (4 mM final).

Composition du milieu RCA (Reinforced Clostridium Agar)

Clostridial Nutrient Medium (Fluka™)	33g
Agar	15g
H ₂ O	qsp 1l

Le pH est ajusté à 5,8 à l'aide d'HCl.

Composition du milieu 2YTG

Extrait de levure	10g
Bactotryptone	16g
NaCl	70 mM
Glucose	30 mM
H ₂ O	qsp 1l

Avant utilisation, ajout de cystéine (4 mM final).

Composition du milieu CGM (Clostridial Growth Medium)

Extrait de levure	6,25g
KH ₂ PO ₄	7 mM
K ₂ HPO ₄	5,5 mM
MgSO ₄	2 mM
MnSO ₄	0,07 mM
FeSO ₄	0,05 mM
NaCl	20 mM
Asparagine	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
H ₂ O	qsp 1l

pH ajusté à 6,60 +/- 0,05 à l'ammoniac

Avant ensemencement, ajout de glucose (300 mM final) et de cystéine (4 mM final).

2.3. Détection d'activités enzymatiques sur milieu solide

Des tests sur boîte ont été réalisés afin de détecter les activités lipase et phospholipase des cellules transformées avec les vecteurs permettant l'expression de l'une ou l'autre des protéines de *C. novyi*. Ces tests ont été réalisés sur des milieux supplémentés avec un substrat de ces enzymes.

Pour tester la capacité d'une souche bactérienne à exprimer de manière extracellulaire une protéine à activité phospholipase, du jaune d'œuf a été ajouté aux milieux de culture solides conventionnels que sont le LB et le RCA, respectivement dans le cas de cultures d'*E. coli* et de *C. acetobutylicum*. Celui-ci contient des lécithines (ou phosphatidylcholine) qui sont un des substrats des phospholipases. La phosphatidylcholine est clivée par les enzymes de type phospholipase C en phosphorylcholine et en un diglycéride insoluble qui va coprécipiter en présence de vitelline, une protéine qui est également présente dans le jaune d'œuf, ce qui provoque la formation d'un complexe dit lecitho-vitellin opaque et visible à l'œil nu (Gubash, 1991).

Pour réaliser ce milieu, les œufs sont lavés dans l'éthanol 70% pendant une heure, puis le contenu du jaune d'œuf (sans le vitellus) est prélevé de manière stérile. Un volume de solution saline (NaCl 0,85%) est ajouté pour obtenir une émulsion. Cette dernière est ajoutée au milieu solide en surfusion (environ 10% vol/vol) juste avant de couler les boîtes.

Dans le cas de l'étude de la capacité d'une souche bactérienne à exprimer une protéine extracellulaire à activité lipase, les milieux de cultures solides sont cette fois supplémentés avec de l'acide tributyrrique 1% v/v (Hasan *et al.*, 2009). Sur de tels milieux, la lyse des lipides est détectable par la formation de halos clairs entourant les colonies les exprimant.

2.4. Evaluation des concentrations cellulaires

La croissance cellulaire est suivie par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre Libra S11 (Biochrom) à 620 nm pour *C. acetobutylicum* et à 550 nm pour *E. coli*.

3. Techniques de génie génétique

3.1. Isolement et manipulation des acides nucléiques

3.1.1. Transformation d'*E. coli*

Les cellules compétentes sont des cellules dont la transformation par des plasmides est facilitée par divers traitements chimiques, thermiques ou électriques.

Pour les préparations de plasmides et de produits de ligation, des cellules TOP10 (Invitrogen™) ont été utilisées. Dans le cas d'expression de protéines hétérologues, des cellules BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Stratagene™) ont été utilisées.

La grande majorité des vecteurs utilisés portant le gène codant une β -lactamase, leur insertion dans *E. coli* a été contrôlée par la faculté de la souche transformée à croître sur un milieu contenant de l'ampicilline.

Un protocole de transformation rapide a été utilisé, dans lequel 50-200 ng de plasmide ou de produit de ligation sont ajoutés à 50 μ l de cellules compétentes d'*E. coli*. L'ensemble est placé sur glace pendant 5 min, puis subit un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes,

avant d'être replacé sur glace pendant 2 minutes. Les cellules sont alors étalées sur boîte LBA, et incubées à 37°C pendant 16h.

Dans le cas de transformation d'*E. coli* avec des plasmides portant des gènes de résistance à d'autres antibiotiques, les cellules sont incubées dans du milieu SOC à 37°C pendant une heure afin de permettre leur régénération et la synthèse des protéines conférant la résistance aux antibiotiques, avant l'étalement sur milieu solide et incubation à 37°C pendant 16h.

3.1.2. Préparations d'ADN plasmidique chez *E. coli*

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du QIAprep™ Spin kit (Qiagen™), en suivant les recommandations du fabricant. Elles permettent d'obtenir une préparation d'ADN très propre, destinée à être manipulée (*e.g.* digestion, ligation) ou à être incorporée chez *E. coli* par transformation.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du GenElute™ HP Plasmid Midiprep kit (Sigma-Aldrich™), en suivant les recommandations du fabricant. Elles sont utilisées pour obtenir une grande quantité de matériel plasmidique, nécessaire pour transformer *C. acetobutylicum*.

3.1.3. Transformation de *C. acetobutylicum*

L'ADN plasmidique est introduit dans *C. acetobutylicum* par électroporation selon le protocole décrit par Mermelstein et Papoutsakis en 1993.

Brièvement, un aliquote d'un stock de spores conservé à -80°C est utilisé pour inoculer une préculture de 30 ml de milieu CGM. Après un choc thermique de 15 min à 80°C, celle-ci est placée à 37°C sans agitation sur la nuit, de manière à atteindre une D.O._{620nm} avoisinant 3,0. Une culture de CGM de 60 ml estensemencée à partir de cette préculture, de manière à obtenir une D.O._{620nm} initiale de 0,2, puis est incubée à 37°C sans agitation jusqu'à atteindre une D.O._{620nm} comprise entre 0,8 et 1,2. La culture est alors placée dans la glace et rentrée sous hotte anaérobie. Les cellules sont culottés par centrifugation, lavées dans un tampon d'électroporation froid (saccharose 270 mM, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 3 mM pH 7,4), centrifugées à nouveau, puis reprises dans 500 µl de tampon d'électroporation froid. Cette suspension est ensuite placée dans une cuve d'électroporation de 0,4 mm de largeur (Eurogentec). L'ADN plasmidique est alors ajouté (4 à 40 µg). L'ensemble est mis 2 min dans la glace puis l'électroporation est réalisée à l'aide d'un appareillage Gene Pulser® II (Biorad) avec les paramètres suivants : 1,8 kV, 50 µF, 600 Ω. Les cellules sont régénérées pendant 5h dans un milieu riche 2YTG à 37°C sans agitation, puis étalées sur milieu RCA contenant les antibiotiques appropriés et incubées pendant 36h à 37°C.

3.1.4. Enzymes

Les endonucléases de restriction ainsi que les enzymes de modification de l'ADN (*e.g.* ligase) utilisées proviennent de chez New England Biolabs™. Elles ont été utilisées selon les indications du fournisseur.

3.2. Techniques d'analyse des acides nucléiques

3.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

La séparation et l'analyse des tailles des fragments d'ADN sont réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0,8 à 2% d'agarose selon la taille des fragments, dans un tampon Tris acétate 20 mM EDTA 0,5 mM). Les échantillons sont chargés avec du glycérol (5% final) avant dépôt. Le marqueur de taille 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs™) a été utilisé. L'ADN est visualisé aux ultraviolets ($DO=254$ ou 312 nm) après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthydiu à $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Les fragments d'ADN sont extraits à partir de gel d'agarose contenant du SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™). L'exposition est faite sur une table Safe Imager™ blue light transilluminator (Invitrogen™) permettant une visualisation des fragments d'ADN à environ 470 nm. La purification des acides nucléiques est réalisée à l'aide du QIAquick® Gel extraction kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant.

3.2.2. Amplification de fragments d'ADN

L'amplification de séquences nucléotidiques d'intérêt destinées à être clonées a été réalisée à l'aide de la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzyme).

Les PCR de contrôle (*e.g.* PCR sur colonies) ont été réalisées en utilisant la DreamTaq™ Green DNA Polymerase (Fermentas).

L'appareillage utilisé consiste en 2 thermocycleurs : Mastercycler personal (Eppendorf) et Techgene (Techne).

Le détail des oligonucléotides utilisés est présenté dans le tableau 2 en page 12 bis.

4. Techniques analytiques – Purifications et dosages enzymatiques

4.1. Purification des protéines de fusion

Les protéines fusionnées au *Strep*-tag II, exprimées chez *E. coli* BL21 ont été purifiées sur un appareillage ÄKTAprime plus (GE Healthcare).

La suspension cellulaire, correspondant au culot de centrifugation d'une culture de 500 ml de la souche exprimant la protéine d'intérêt repris dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0,1M glycérol 10%, est désintégrée par une sonde à ultrasons (Vibracell 71434). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Les acides nucléiques sont précipités par l'addition de streptomycine sulfate à 10 mM final et centrifugation.

De l'avidine (10 mM final) est ajoutée au surnageant de sonication pour empêcher la fixation de la biotine et des protéines biotinylées sur la matrice d'affinité. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, l'extrait protéique est filtré (filtres Sartorius de $5 \mu\text{M}$), puis est injecté sur une colonne StrepTrap™ HP (GE Healthcare) pré-équilibrée avec un tampon PBS (Na_3PO_4 20 mM, NaCl 280 mM, KCl 6 mM) pH 7,4. La colonne est lavée avec ce même tampon, puis la protéine d'intérêt est éluée avec du PBS – desthiobiotine 2,5 mM.

Nom	Séquence	Description
0979_F	5'-TTAAGGATCCGAGAGG GGGAGTAATATATGAAG-3'	Amorce amont permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif du gène <i>NT01CX0979</i> de <i>C. novyi-NT</i>
0979_F_opéron	5'-GCGGCCGCTTTTTCCCGGGGA GAGGGGAGTAATATATGAAG-3'	Amorce amont permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif du gène <i>NT01CX0979</i> de <i>C. novyi-NT</i> , et son insertion en aval de la séquence codante du gène <i>NT01CX2047</i> de <i>C. novyi-NT</i>
0979_R_trunc	5'-TTAAGGCGCCTTATGGTAA TAAATCTTTAGATACATC-3'	Amorce aval permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif d'une partie du gène <i>NT01CX0979</i> de <i>C. novyi-NT</i> , permettant l'obtention d'une protéine tronquée
0979_R_trunc_ST	5'-TTAACCCGGGTGGTAAT AAATCTTTAGATACATC-3'	Amorce aval permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif d'une partie du gène <i>NT01CX0979</i> de <i>C. novyi-NT</i> , permettant l'obtention d'une protéine tronquée, fusionnée à un <i>Strep</i> -tag II en C-ter
2047_F	5'-GGATCCTGAAAGGGG AATTAAGAACATGC-3'	Amorce amont permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif du gène <i>NT01CX2047</i> de <i>C. novyi-NT</i>
2047_R	5'-GGCGCCAAAAAGCGCCGCTTA TTCAGTTACAGGAAGATTTCTA-3'	Amorce aval permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif du gène <i>NT01CX2047</i> de <i>C. novyi-NT</i>
2047_R_ST	5'-TTAACCCGGGTTCAGTTA CAGGAAGATTTCTAAG-3'	Amorce aval permettant le clonage de la séquence codante et du RBS putatif du gène <i>NT01CX2047</i> de <i>C. novyi-NT</i> fusionnée à un <i>Strep</i> -tag II en C-ter
P-perR-0	5'-AAAAAACTGCAGTGTAATACA TTGTAGTAGATGCTCCACC-3'	Amorce amont permettant d'étudier la région environnant le gène <i>perR</i> sur le chromosome de <i>C. acetobutylicum</i>
P-perR-5	5'-AAAAAACTGCAGGAACTCT GAAGTTTAATGATAGTGACG-3'	Amorce aval permettant d'étudier la région environnant le gène <i>perR</i> sur le chromosome de <i>C. acetobutylicum</i>
pSOS95_prom	5'-TAAGTTGTTAGAGAAAACGTATA-3'	Amorce permettant d'étudier la région située en aval du promoteur sur les plasmide pSOS95 et pCST
pSOS95_ter	5'-CCGCTCACAATTCCACACAACATACG-3'	Amorce permettant d'étudier la région située en amont du terminateur présent sur les plasmides pSOS95 et pCST

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés lors de cette étude.

4.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines purifiées est déterminée par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode évite les interférences avec les acides nucléiques et avec les réactifs possédant des groupements thiols. L'extrait acellulaire est mélangé à 0,2 ml de réactif concentré (Biorad). La courbe étalon est réalisée avec des solutions de sérum albumine bovine (BSA). L'absorbance est lue à 595 nm après 10 minutes d'incubation.

4.3. Identification des activités enzymatiques sur milieu solide

4.3.1. Identification de l'activité phospholipase C

L'évaluation de la capacité de la phospholipase C tronquée purifiée à agir sur la phosphatidylcholine a pu être déterminée grâce à des tests sur un milieu solide supplémenté avec du jaune d'œuf, selon le même principe que celui exposé auparavant (paragraphe 2.3).

Dans le cas de l'étude de surnageant de sonication ou de produit de purification de culture d'*E. coli* exprimant la phospholipase C tronquée de *C. novyi-NT*, un échantillon de celui-ci est déposé dans un puits sur un milieu LB+10% v/v de jaune d'œuf. Après incubation sur la nuit à 37°C, la présence d'une activité phospholipase peut être observée par l'apparition d'un halo entourant le puits.

4.3.2. Identification de l'activité lipase

Comme pour l'activité phospholipase C, l'activité lipase a pu être détectée en déposant des extraits cellulaires de cultures d'*E. coli* ou de *C. acetobutylicum* dans des puits sur un milieu RCA+1% v/v tributyrine. Après incubation sur la nuit à 37°C, l'activité peut être observée par la formation d'un halo entourant le puits.

4.4. Dosage des activités enzymatiques

4.4.1. Activité phospholipase

L'activité phospholipase de la protéine NT01CX0979 tronquée de *C. novyi-NT* a pu être dosée par des tests utilisant comme substrat le dérivé de la choline qui est le O-(4-Nitrophenyl-phosphoryl)-choline (Sigma). L'action de la phospholipase C purifiée sur cette molécule provoque le relargage de ρ -nitrophénol, qui peut être détecté à 410 nm. C'est un substrat non naturel, déjà utilisé pour étudier des enzymes de type phospholipase C provenant d'autres espèces de *Clostridium* (Karasawa *et al.*, 2002).

Une quantité fixe d'enzyme est incubée à 37°C dans un milieu réactionnel de 1 ml final contenant du tampon Tris-HCl pH 7,2 glycérol 60% ainsi que le substrat à des concentrations variant de 10 à 160 mM. La libération de ρ -nitrophénol est suivie pendant 10 min à 410 nm, et la quantité de ce produit est estimée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $1,51 \times 10^4 \text{ l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Katayama *et al.*, 1990). Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion de 1 μmole de substrat par minute.

4.5. Analyses en gel SDS-PAGE des protéines en conditions dénaturantes

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS, à l'aide du système Mini Protean Gel II® (Bio-Rad). Un gel de concentration (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, acrylamide-bisacrylamide 5%, SDS 0,05%, APS 0,1%, TEMED 0,1%) précède le gel de séparation (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, acrylamide-bisacrylamide 12%, SDS 0,05%, APS 0,1%, TEMED 0,1%). Les échantillons sont déposés avec un tampon de dépôt (Tris-HCl 60mM, Glycérol 10%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,01% final). La migration est réalisée dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 250 mM, SDS 0,1%) à une tension de 150V. Le marqueur de taille utilisé est le PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Après migration le gel est coloré dans une solution d'acide acétique 10%, éthanol 40%, bleu de Coomassie 0,3%. La décoloration est réalisée par plusieurs lavages dans une solution d'acide acétique 10%, éthanol 40%.

4.6. Western Blot

Les protéines fusionnées au *Strep*-tag II ont pu être spécifiquement détectées par hybridation à la *Strep*-Tactin® conjugué à une peroxydase (IBA). Après avoir été séparées par électrophorèse sur gel, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (Amersham Biosciences) dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, méthanol 20%) à une tension de 60V pendant 90 minutes, à l'aide du système Mini Trans Blot® (Bio-Rad).

La membrane est ensuite saturée par une solution bloquante (PBS-Tween 0,5%, BSA 3%) pendant une heure à température ambiante, ou sur la nuit à 4°C. La membrane est alors lavée à trois reprises avec 20 ml de PBS-T (PBS-Tween 0,1%), puis incubée 10 minutes dans 10 ml de PBS-T contenant 10 µl de biotin blocking buffer (IBA), permettant de prévenir la détection des protéines biotinylées. La *Strep*-Tactin HRP (horse radish peroxidase, IBA) est alors ajoutée à une dilution de 1:100000, et la membrane est incubée 1h à température ambiante sous agitation légère. Enfin, la membrane est lavée dans du PBS-T puis dans du PBS.

La révélation se fait en utilisant les réactifs du kit Amersham ECL Plus (GE Healthcare), permettant l'émission d'un signal fluorescent, détecté sur un appareil Storm 860 Phosphoimager Scanner (Molecular Dynamics).

Résultats

1. Choix de la souche de *C. acetobutylicum*

La souche de *C. acetobutylicum* utilisée lors de cette étude est la souche MGCcac15, un mutant $\Delta cac1502$ de la souche ATCC 824. Cette dernière a été choisie car son génome a été entièrement séquencé (Nöbling *et al.*, 2001), et il s'agit d'une souche de *C. acetobutylicum* couramment utilisée, en particulier dans de précédentes études concernant les possibilités d'utilisation de bactéries anaérobies dans des thérapies anti-tumorales (Lambin *et al.*, 1998 ; Dang *et al.*, 2001 ; Theys *et al.*, 1999 ; Theys *et al.*, 2001). En outre, le gène *cac1502* codant l'enzyme de restriction Cac824I, sa délétion permet une transformation facilitée de la souche avec des plasmides méthylés dans *E. coli*. Enfin, les derniers outils génétiques développés pour le genre *Clostridium* ont prouvé leur efficacité en ce qui concerne la manipulation de cette souche (Soucaille *et al.*, 2006 ; Heap *et al.*, 2007).

2. Choix des gènes de *C. novyi-NT* à exprimer chez *C. acetobutylicum*

Le séquençage du génome de *C. novyi-NT* a permis d'identifier plusieurs protéines potentiellement impliquées dans la capacité de cette bactérie à coloniser et réduire les tumeurs (Bettegowda *et al.*, 2006). Parmi celles-ci, deux lipases (NT01CX0630 et NT01CX2047) et une phospholipase C (NT01CX0979) semblent jouer un rôle déterminant.

Lors de cette même étude, il a également été prédit que ces protéines sont exportées dans le milieu extracellulaire, par l'intermédiaire de la reconnaissance de peptides signaux. Cette information confirme leur fonction supposée, qui nécessite une interaction directe avec les cellules cancéreuses.

La phospholipase C, codée par le gène *NT01CX0979* correspond à la toxine γ de *C. novyi*. Cette protéine présente une forte homologie de séquence avec d'autres phospholipases de *Clostridium* (figure 4 en page 15 bis), en particulier avec des protéines correspondant à des toxines létales, telles que la toxine α de *C. difficile* et la toxine β de *C. haemolyticum*. Bien que la phospholipase C de *C. novyi* n'ait elle-même pas été définie comme étant létale (Hatheway, 1990), ces fortes homologies de séquence nous ont conduit à ne pas exprimer la protéine dans son intégralité, et à nous intéresser en premier lieu à son seul domaine catalytique.

Ce type d'enzymes est constitué de deux domaines. En N-terminal se trouve le domaine catalytique, et en C-terminal se trouve un domaine PLAT impliqué dans la reconnaissance du substrat. Il a été montré chez *C. difficile* que le domaine N-ter isolé permet à lui seul de remplir les fonctions catalytiques de l'enzyme, sans présenter le caractère létal original (Nagahama *et al.*, 1994). En effet, il semble que ce soit le domaine PLAT qui soit responsable de la toxicité de cette protéine.

Nous avons décidé dans un premier temps d'étudier la protéine sous une forme tronquée, et de l'exprimer chez *C. acetobutylicum* et *E. coli*. Pour cela, des oligonucléotides ont été choisis de manière à n'amplifier que la séquence codant le domaine N-terminal de la phospholipase C de *C. novyi-NT*.

Concernant les protéines de type lipase, celle codée par le gène *NT01CX2047* a été caractérisée récemment (Cheong *et al.*, 2006), et son intérêt dans la conception d'approches anti-tumorales a été clairement mis en avant à ce moment. Il a donc été décidé d'exprimer également cette protéine en clonant le gène qui la code sur un vecteur et en introduisant celui-ci chez *C. acetobutylicum* et *E. coli*.

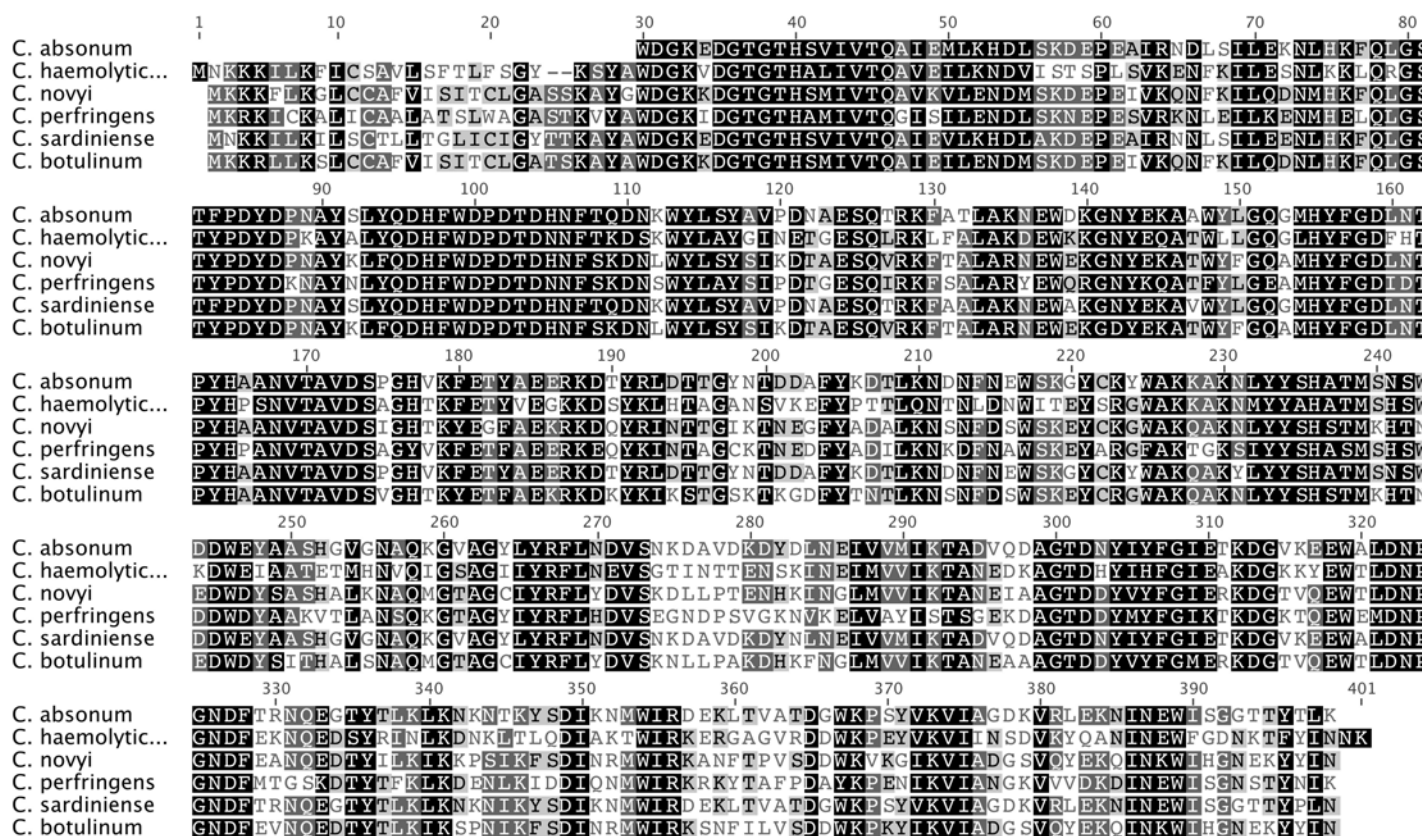


Figure 4 : Alignement des séquences protéiques de phospholipases C de plusieurs espèces de *Clostridium*.

Protéines alignées : toxine α de *C. absonum*, toxine β de *C. haemolyticum*, toxine γ de *C. novyi-NT*, toxine α de *C. difficile*, phospholipase C de *C. sardiniense*, phospholipase C de *C. botulinum*.

Ces deux protéines, dont l'implication dans les capacités cellolytiques de *C. novyi-NT* a été démontrée sont donc les deux candidats retenus que nous avons utilisés pour concevoir une première génération de souches de *C. acetobutylicum* aptes à coloniser les tumeurs.

3. Construction des plasmides

Différentes constructions ont été réalisées. Tout d'abord, des vecteurs navettes permettant l'expression chez *E. coli* et *C. acetobutylicum* de chacun des deux gènes, ainsi qu'une construction dans laquelle les 2 gènes sont organisés en opéron, permettant l'expression simultanée des deux protéines. L'ensemble des séquences codant pour les gènes d'intérêt ont été placées sous contrôle du promoteur de la thiolase de *C. acetobutylicum*, qui est un promoteur fort chez les 2 espèces bactériennes. Ces vecteurs, pS::0979, pS::2047 et pS::2047-0979, permettent respectivement l'expression de la phospholipase C NT01CX0979 tronquée, de la lipase NT01CX2047, et de ces deux protéines.

Une autre construction a également été réalisée dans laquelle les gènes placés en opéron sont sous le contrôle d'un autre promoteur, celui du gène codant la phosphotransbutyrylase de *C. acetobutylicum*. Ce promoteur permet une expression plus importante que celui du promoteur thiolase au cours des premières heures de culture (Girbal *et al.*, 2003). Le vecteur obtenu est le plasmide pPTB::2047-0979.

Enfin, deux autres vecteurs navettes permettant l'expression de chacune des protéines fusionnées à une étiquette de type *Strep*-tag II ont également été construits. Ces vecteurs, pCST::0979 et pCST::2047 permettent respectivement l'expression de la phospholipase et de la lipase étiquetées.

Les amplifications des séquences codant pour la lipase NT01CX2047 et le domaine N-terminal de la phospholipase C NT01CX0979 ont été réalisées en utilisant comme matrice l'ADNg de *C. novyi-NT*.

Les cartes de l'ensemble des vecteurs construits sont présentées en figure 5, page 16 bis. Le détail des étapes conduisant à la construction de l'un des vecteurs, le pCST::0979 qui permet l'expression de la phospholipase C tronquée et étiquetée est présenté en figure 6, page 16 ter. Les amplicons obtenus ont tout d'abord été sous-clonés dans le vecteur pCR@4Blunt-Topo® (Invitrogen). L'ensemble des fragments a été séquencé afin de vérifier l'absence de mutations. Par la suite, ils ont été extraits à l'aide d'enzymes reconnaissant les sites de restriction introduits lors des réactions de PCR. Les fragments résultants ont alors été clonés dans les vecteurs appropriés. Les vecteurs pS dérivent du vecteur originel pSOS95, le vecteur pPTB::2047-0979 dérive du pSOS94, les vecteurs permettant l'expression des protéines fusionnées dérivent du pCST.

Les contrôles de la validité des constructions réalisées ont été faits à l'aide de la détermination des profils de restriction d'une part, et de réactions de PCR d'autre part.

Les digestions de contrôle ont été conduites sur les minipréparations d'ADN plasmidique en utilisant deux couples d'enzymes de restriction : BamHI/EcoRI et NdeI/SmaI. Les plasmides pSOS94, pSOS95 et pCST contiennent des sites uniques pour BamHI et EcoRI de part et d'autre du site où est inséré le fragment d'intérêt. Ces trois vecteurs possèdent également un site unique pour NdeI. Seul le vecteur pCST possède un site de coupure pour SmaI. Enfin, on trouve dans la séquence du gène codant la lipase un site de restriction reconnu par NdeI. Ces données sont résumées, et les tailles des fragments de restriction attendus sont présentées dans le tableau 3 en page 16 quater. Les produits de digestion ont été

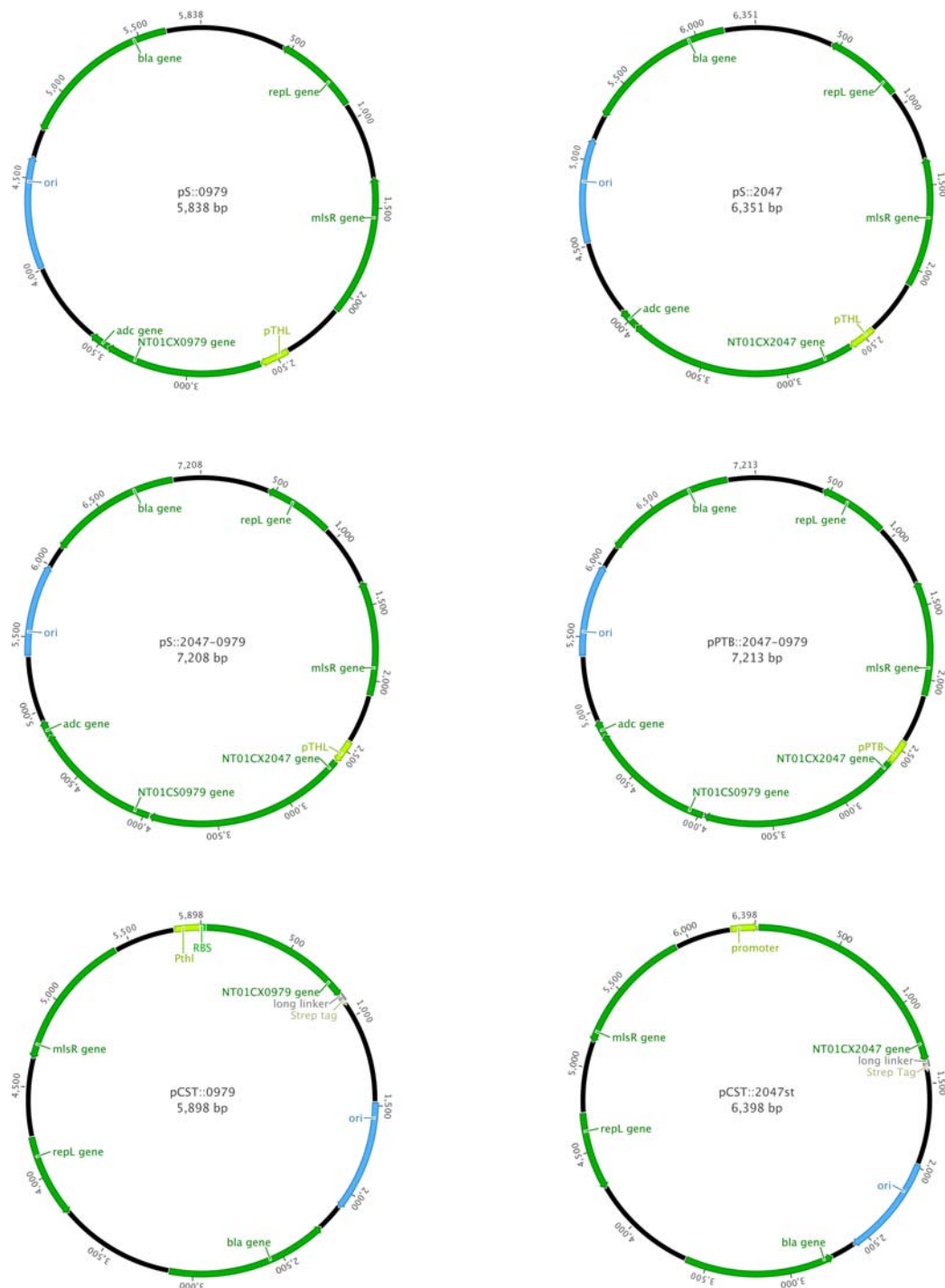


Figure 5 : Plasmides construits.

Les plasmides pS::0979 et pS::2047 permettent l'expression respective de la phospholipase C tronquée et de la lipase NT01CX2047 de *C. novyi-NT* sous contrôle du promoteur thiolase de *C. acetobutylicum*.

Le plasmide pS::2047-0979 permet l'expression des deux protéines sous contrôle du promoteur de la thiolase de *C. acetobutylicum*.

Le plasmide pPTB::2047-0979 permet l'expression des deux protéines sous contrôle du promoteur de la phosphotransbutyrylase de *C. acetobutylicum*.

Les plasmides pCST::0979 et pCST::2047 permettent respectivement l'expression de la phospholipase C tronquée et de la lipase de *C. novyi-NT* fusionnées en C-ter à un *Strep*-Tag.

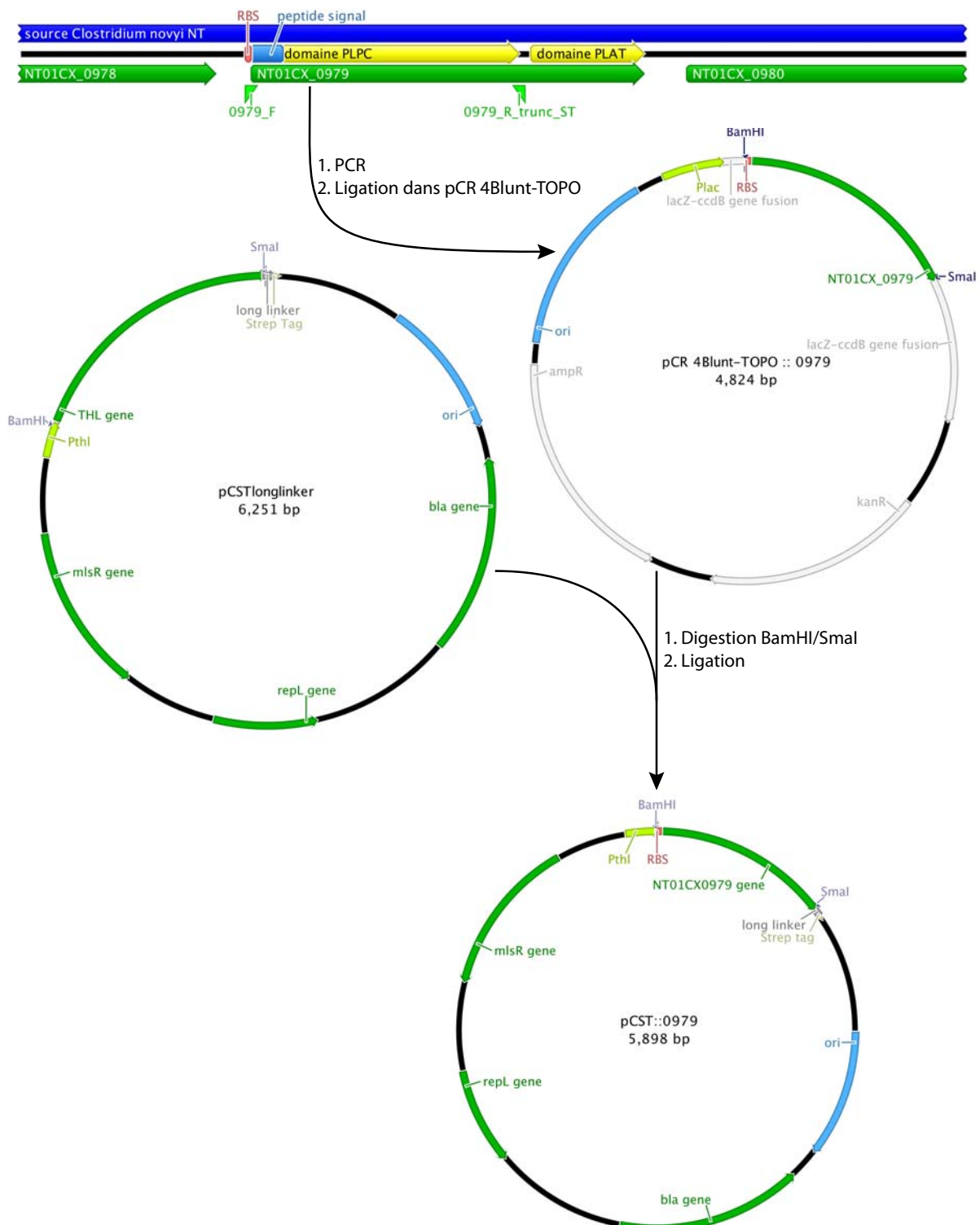


Figure 5 : Construction du vecteur pCST::0979.

La séquence codant le domaine N-terminal de la phospholipase C, correspondant au domaine PLPC de cette protéine a été amplifiée, de même que la région en amont du gène contenant le RBS putatif du gène, grâce aux oligonucléotides 0979_F et 0979_R_trunc_ST. Le produit de cette amplification a été inséré dans le vecteur pCR®4Blunt-Topo® (Invitrogen) puis séquencé afin de valider la séquence de l'amplicon. Le fragment d'intérêt a ensuite été excisé à l'aide d'enzymes de restriction reconnaissant des sites introduits grâce aux oligonucléotides 0979_F et 0979_R_trunc_ST, puis ligué dans le vecteur pCST digéré au préalable avec les mêmes enzymes de restriction.

	Nombre de sites reconnus par				Taille des fragments attendus	
	BamHI	EcoRI	NdeI	SmaI	BamHI/EcoRI	NdeI/SmaI
pCST	1	1	1	1	1435;4824	2644;3609
pS::0979	1	1	1	0	1022;4824	5840
pS::2047	1	1	2	0	1535;4824	2958;3403
pCST::0979	1	1	1	1	1082;4824	2644;3256
pCST::2047	1	1	2	1	1582;4824	355;2644;3403
pPTB::2047-0979	1	1	2	1	2392;4829	371;3403;3438
pS::2047-0979	1	1	2	1	2392;4824	371;3408;3438

Tableau 3 : Nombre de sites de restriction reconnus par les enzymes BamHI, EcoRI, NdeI et SmaI dans chacun des plasmides construits ainsi que dans le plasmide de contrôle pCST. Tailles théoriques des fragments obtenus suite à des digestions des plasmides construits par les couples d’enzymes de restriction BamHI/EcoRI et NdeI/SmaI.

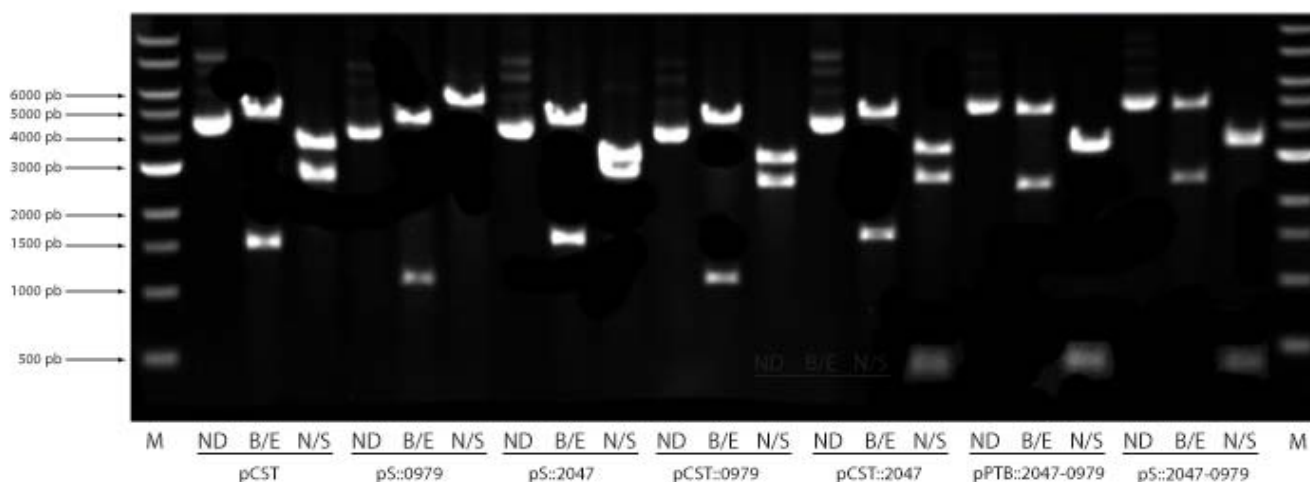


Figure 7 : Profils de restriction sur gel d’agarose 0,8% obtenus suites aux digestions enzymatiques des plasmides construits.

M : DNA ladder 1kb (NEB) ;

ND, non digéré ; B/E, digestion BamHI/EcoRI ; N/S, digestion NdeI/SmaI ;

déposés sur un gel d'agarose, et le résultat de leur migration est présenté en figure 7, page 16 quater. Les tailles des fragments de restriction obtenus sont conformes à ce qui est attendu, ce qui valide ce contrôle.

Les PCR de contrôle ont été réalisées en utilisant également comme matrice l'ADN plasmidique minipréparé. Le plasmide pSOS95 original, permettant l'expression de l'opéron acétone a été utilisé comme contrôle négatif. Les amplifications ont été réalisées en utilisant d'une part une amorce capable de s'hybrider sur l'ensemble des vecteurs construits au niveau du terminateur de la transcription situé en aval du gène cloné, pSOS95ter. D'autre part, les amorces utilisées pour l'amplification des gènes clonés et s'hybridant en amont de ceux-ci ont été utilisées, à savoir 2047_F et 0979_F.

Les hybridations des amorces sur les vecteurs sont présentées en figure 8, page 17 bis pour plus de clarté. La migration des produits des réactions de PCR obtenus est présentée en figure 9, page 17 bis. Les résultats obtenus sont conformes à ce qui est attendu, à savoir l'amplification du gène codant la partie N-terminale de la phospholipase C à partir des plasmides pS::0979, pS::2047-0979, pPTB::2047-0979 et pCST::0979, l'amplification du gène codant la lipase à partir des plasmides pS::2047 et pCST::2047, et l'amplification de l'opéron constitué des deux gènes à partir des vecteurs pS::2047-0979 et pPTB::2047-0979.

4. Purification des protéines d'intérêt

4.1. Phospholipase C tronquée

Une fois la validité des constructions confirmée, le vecteur permettant l'expression de la phospholipase tronquée fusionnée en C-ter à un *Strep*-tag II a été introduit dans la souche BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL permettant l'expression de la protéine malgré le biais de codons existant entre les deux genres bactériens. La protéine possédant un signal d'export actif chez *C. novyi* lui permettant de franchir la membrane plasmique interne, il est probable que cette protéine exprimée chez *E. coli* soit dirigée dans le périplasma de cette bactérie. Toutefois, elle a été purifiée à partir d'un extrait protéique issu d'un traitement aux ultrasons et contenant donc les protéines périplasmiques mais aussi intracellulaires des cellules cultivées.

Après la culture et la préparation de l'extrait protéique, celui-ci a été injecté sur une colonne d'affinité permettant la rétention des protéines étiquetées avec un *Strep*-tag et le chromatogramme correspondant à la purification est présenté en figure 10, page 17 ter. On peut y voir que la protéine étiquetée a été retenue sur la colonne puis éluée dans les fractions 4 et 5, ainsi que dans une moindre mesure dans la sixième fraction.

Les différentes étapes de la purification ont été représentées sur un gel de polyacrylamide, présenté en figure 11, page 17 ter. On observe la présence de la protéine purifiée dans les fractions d'éluion, à la taille attendue, déterminée grâce au logiciel ProtParam (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>), et qui est d'environ 30,8 kDa.

Afin de savoir si la protéine purifiée est active, des tests ont été réalisés sur milieu solide LB supplémentée avec du jaune d'œuf, afin d'observer l'activité lécithinase. Plusieurs fractions correspondant aux étapes de purification ont été déposées dans des puits à même la gélose. Ces échantillons correspondent au surnageant de sonication, à l'extrait de protéines non retenues, et aux fractions 4, 5 et 6 dans lesquelles la phospholipase a été éluée. Le résultat de cette expérience est présenté dans la figure 12, page 17 ter. On peut voir que, conformément à ce qui est attendu, l'activité lécithinase est retrouvée dans le surnageant de

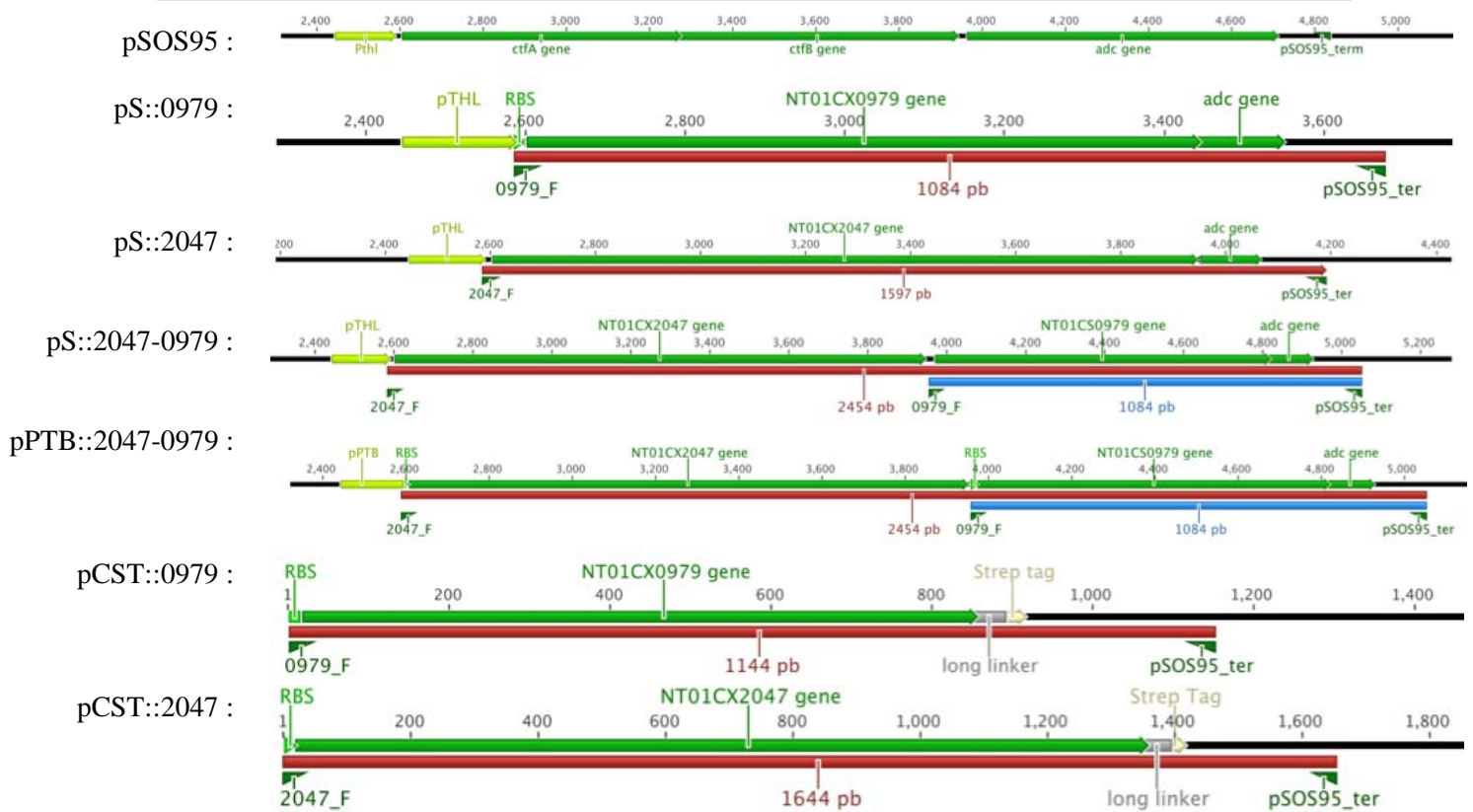


Figure 8 : hybridation des oligonucléotides sur les plasmides construits.

Les tailles des produits d'amplifications (en rouge et en bleu) obtenus à partir des oligonucléotides 0979_F, 2047_F et pSOS95_ter (en vert foncé) sont indiquées.

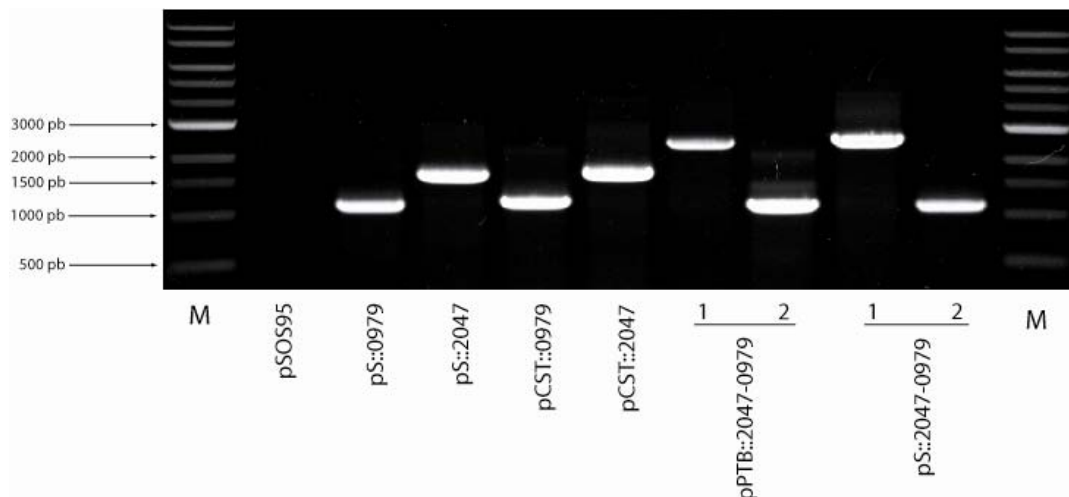


Figure 9 : résultats des PCR réalisées sur l'ADN plasmidique des constructions génétiques.

Pour toutes les amplifications, l'oligonucléotide pSOS95_ter a été utilisé. Pour le contrôle utilisant pSOS95, les oligonucléotides 2047_F et 0979_F ont également été utilisés. L'oligonucléotide 0979_F a été utilisé pour les amplifications sur pS::0979, pCST::0979, et pour les réactions dont le produit est présenté dans les lignes numérotées 2 pour les plasmides pPTB::2047-0979 et pS::2047-0979. Enfin, l'oligonucléotide 2047_F a été utilisé pour les amplifications sur pS::2047, pCST::2047 et pour les réactions dont le produit a été déposé dans les lignes notées 1 pour les plasmides pPTB::2047-0979 et pS::2047-0979.

M : DNA ladder 1 kb (NEB)

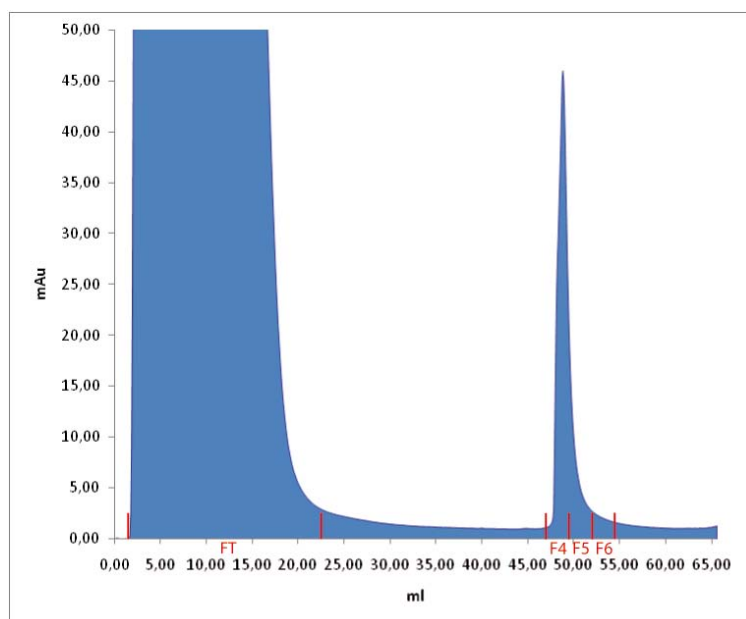


Figure 10 :
Chromatogramme de la purification de la phospholipase C tronquée de *C. novyi-NT* fusionnée au *Strep*-tag II et exprimée chez *E. coli*, sur colonne d'affinité StrepTrap™ HP (GE Healthcare). FT, protéines non retenues sur la colonne d'affinité. FX, fraction d'élution #X.

Figure 11 :
Bilan de purification de la phospholipase C tronquée de *C. novyi* sur gel de polyacrylamide 12%.
M : PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).
SSO, surnageant de sonication ;
SSS, SSO+streptomycine sulfate ;
SSSA, SSS+ avidine ; FT, protéines non retenues sur la colonne ; FX, fraction d'élution #X.

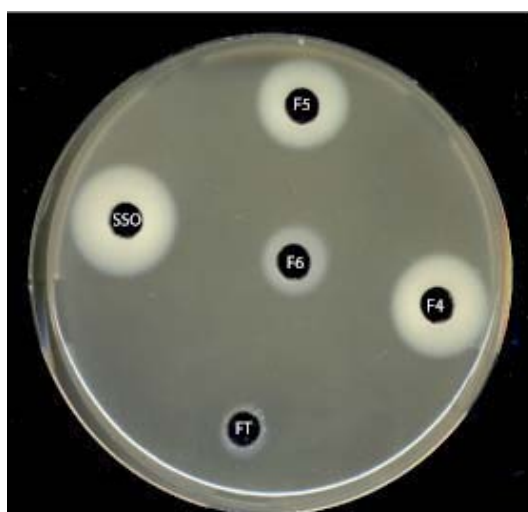
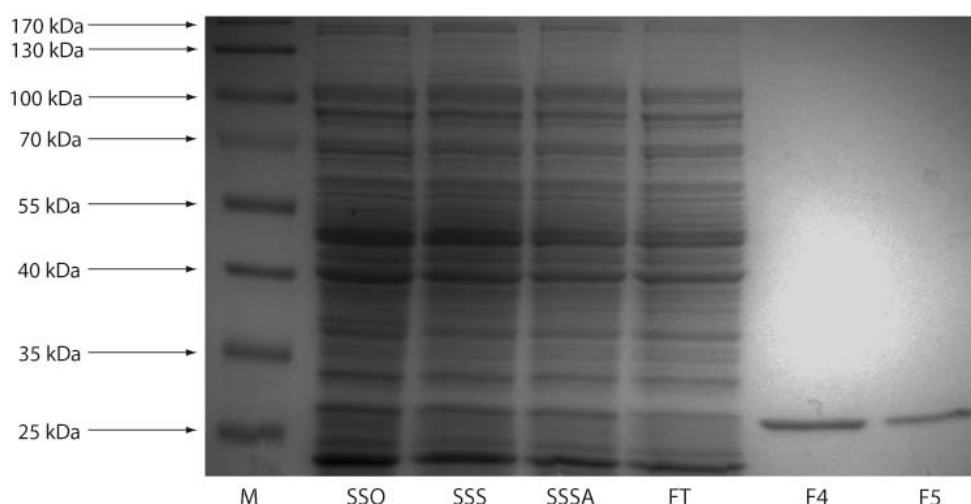


Figure 12 :
Test d'activité sur milieu LB supplémenté avec du jaune d'œuf de l'activité phospholipase C présente dans les fractions d'élution.
SSO, surnageant de sonication ; FT, protéines non retenues sur la colonne ; FX, fraction d'élution #X.

sonication qui contient l'ensemble des protéines intracellulaires. Cette activité est absente dans la fraction correspondant aux protéines non retenues, ce qui indique que la totalité des protéines d'intérêt ont été retenues sur la colonne d'affinité. Enfin, les activités observées pour les fractions 4, 5 et 6 sont conformes à ce qui est attendu à partir du chromatogramme et du gel SDS-PAGE, à savoir que la concentration protéique la plus importante se trouve dans la fraction 4, qu'elle est légèrement plus faible dans la fraction 5, et enfin qu'elle est très faible dans la fraction 6.

Pour réaliser des tests enzymatiques, la fraction #4 a été utilisée, et sa concentration protéique a été déterminée par la technique du dosage de Bradford. Cette quantité a été estimée à 30 µg/ml.

4.2. Lipase

L'approche utilisée pour purifier la lipase de *C. novyi-NT* est la même que celle qui a été employée pour la phospholipase C de ce même organisme. Le vecteur pCST::2047 a été utilisé pour permettre l'expression de la protéine dans la souche BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL. Ce vecteur permet l'expression de la protéine fusionnée en C-ter à un *Strep*-tag II.

Des expériences préliminaires consistant en l'étude du devenir de la protéine dans la cellule ont permis de démontrer que celle-ci ne se retrouve pas dans le surnageant de centrifugation après sonication des cellules l'exprimant (Figure 13 page 18 bis). Un western-blot a été réalisé sur les culots et surnageants de sonication de cultures de cellules BL21 CodonPlus (DE3)-RIPL portant dans un premier cas le vecteur pSOS95del, dans un second cas le pCST::0979 et dans un dernier cas le pCST::2047. Le pSOS95 est identique au pCST, hormis le fait qu'il ne permet pas la fusion de protéines à un *Strep*-tag. Son dérivé, le pSOS95del est un vecteur vide, dans lequel aucun gène n'est sous contrôle du promoteur thiolase. Les vecteurs pCST::0979 et pCST::2047 permettent l'expression respective de la phospholipase C tronquée et de la lipase, toutes deux étiquetées avec un *Strep*-Tag.

Nous observons que la phospholipase C tronquée est présente à la fois dans le culot et le surnageant de sonication, ce qui a permis sa purification. Dans le cas de la lipase, il apparaît clairement qu'elle n'est présente que dans la fraction correspondant au culot de sonication.

Ceci est interprété comme le fait que la protéine forme des corps d'inclusion au sein d'*E. coli*. Par ailleurs, plusieurs bandes spécifiques à la culture d'*E. coli* exprimant la lipase sont détectées dans le culot de sonication, en particulier à des tailles d'environ 25 kDa. Un autre signal est également détecté à une taille inférieure. L'explication retenue concernant la présence de ces bandes est qu'elles sont le résultat de la protéolyse de la lipase, conduisant à l'obtention de protéines tronquées, étiquetées avec un *Strep*-Tag et donc détectables.

Notre but étant de produire une protéine active, nous avons cherché à modifier les conditions de culture de telle sorte que nous synthétisions la protéine sous forme soluble afin qu'elle soit présente dans la phase aqueuse après les étapes de séparation du contenu et des débris cellulaires. Une alternative aurait été de solubiliser la protéine à partir des corps d'inclusion, sans avoir cependant la certitude d'obtenir une forme active.

Pour ce faire, nous avons réalisé des cultures à 25°C dans le but de provoquer une croissance et une synthèse protéique moins rapide, permettant un meilleur repliement de la protéine d'intérêt, au cas où cette étape serait responsable de la formation de corps d'inclusion. Une comparaison des culots et surnageants de sonication de cultures réalisées à

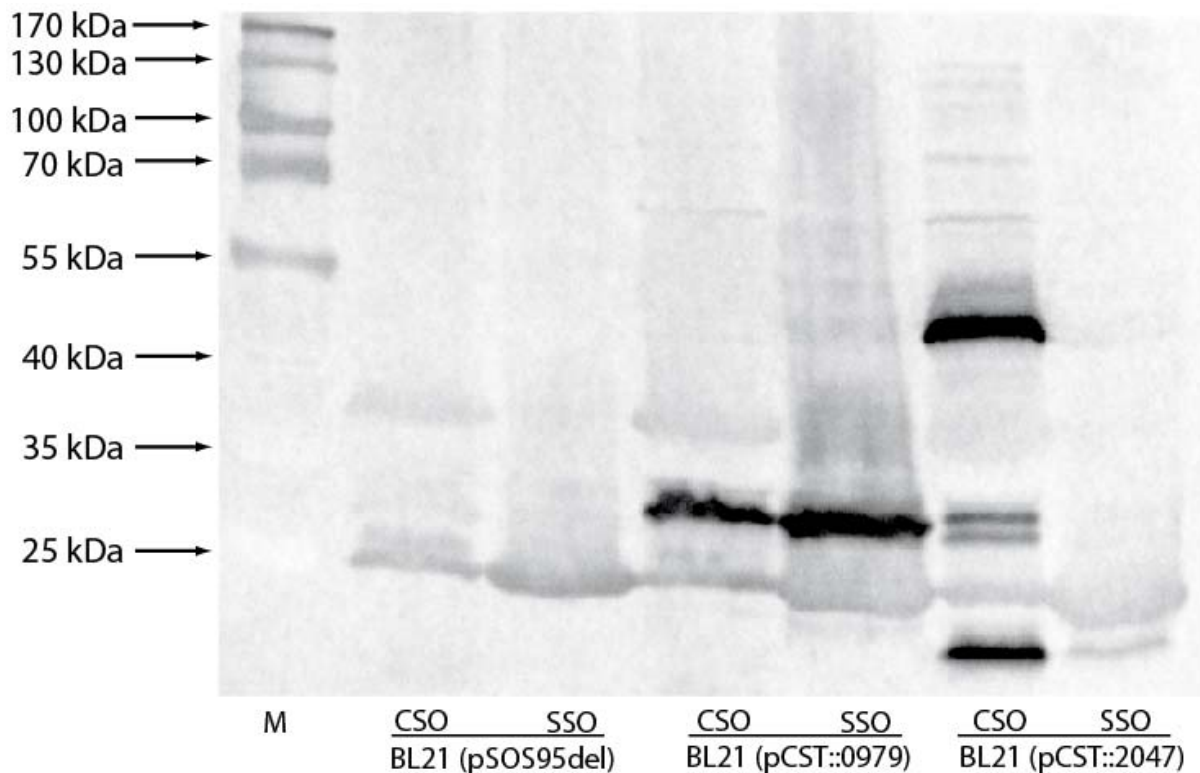


Figure 13 : Western-blot réalisé sur les culots et surnageants de sonication de cultures d'*E. coli* BL21 (DE3)-RIPL, par hybridation à la *Strep*-Tactin® conjugué à une peroxydase (IBA). BL21 (pSOS95del), cellules contenant le plasmide de contrôle pSOS95del ; BL21 (pCST::0979), cellules contenant le plasmide permettant l'expression de la phospholipase C tronquée de *C. novyi-NT* fusionnée à un *Strep*-tag II ; BL21 (pCST::2047), cellules contenant le plasmide permettant l'expression de la lipase NT01CX2047 fusionnée à un *Strep*-tag II. M : PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). CSO, culot de sonication ; SSO, surnageant de sonication.

37 et à 25°C ont permis de confirmer qu'une partie des protéines produites se trouve sous forme soluble lors d'une culture à 25°C (résultat non présenté).

Le chromatogramme correspondant à la purification réalisée en injectant sur colonne le surnageant de sonication résultant de la culture réalisée à 25°C est présenté en figure 14, page 19 bis. Nous observons un pic lors de l'élution dans la fraction 5 principalement, qui est cependant relativement faible.

Les extraits ont été déposés sur un gel de polyacrylamide (figure 15, page 19 bis) en conditions dénaturantes. Un western-blot a également été réalisé avec les extraits correspondant à chaque étape de la purification. La lipase n'est pas détectable sur le gel de polyacrylamide. En revanche, la protéine est bien détectée dans la fraction #5 par l'expérience d'hybridation (figure 16, page 19 bis). Deux bandes sont observées et correspondent vraisemblablement aux deux formes de la protéine, avec et sans le peptide d'adressage. Ainsi, la taille théorique de la protéine possédant ce peptide est de 51,1 kDa tandis que la protéine sans peptide a une taille théorique de 48,3 kDa.

La quantité de protéines présente dans la fraction #5 a été évaluée par la méthode de Bradford, et une concentration protéique de 2,5 µg/ml a été déterminée.

Afin de savoir si la protéine purifiée présente une activité de type lipase, un test sur milieu solide supplémenté en tributyrine a été réalisé. Cinquante µl du surnageant de sonication, de la fraction non retenues sur colonne, et des fractions d'élution 4 et 5 ont été déposés dans des puits, d'une manière similaire à ce qui a été fait pour la phospholipase tronquée sur milieu supplémenté en jaune d'œuf. Aucun halo n'a pu être observé, même après des temps d'incubation de 48h à 37°C (résultat non présenté).

5. Caractérisation enzymatique de la phospholipase C

Des tests d'activité ont été réalisés sur la phospholipase C tronquée à l'aide du O-(4-Nitrophenyl-phosphoryl)choline, un substrat synthétique des enzymes de type phospholipase. Les valeurs d'activités présentées dans la figure 17, page 19 ter ont été déterminées en utilisant des concentrations croissantes de substrat pour une quantité fixe d'enzyme.

Nous observons une proportionnalité entre les activités et la quantité de substrat, indiquant que nous utilisons des concentrations en substrat très éloignées des conditions saturantes permettant la détermination des paramètres cinétiques tels que le K_M et la V_{max} . Les activités spécifiques obtenues sont exprimées en $mUI \cdot mg^{-1}$ et sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour des phospholipase C d'autres espèces de *Clostridium* lors d'autres études (Karasawa *et al.*, 2002).

6. Expression des protéines de *C. novyi-NT* chez *C. acetobutylicum*

6.1. Expression hétérologue de la phospholipase C NT01CX0979 tronquée

Le vecteur pS::0979 portant le gène codant le domaine PLPC de la phospholipase C de *C. novyi-NT* a été introduit chez la souche MGCcac15 de *C. acetobutylicum* n'exprimant plus le système de restriction propre à cette espèce. Sa présence a été confirmée par PCR sur colonie. Des cellules ont été étalées sur boîte supplémentée avec du jaune d'œuf de manière à

Figure 14 : Chromatogramme de la purification de la lipase NT01CX2047 de *C. novyi-NT* fusionnée au *Strep*-tag II et exprimée chez *E. coli*, sur colonne d'affinité StrepTrap™ HP (GE Healthcare). FT, protéines non retenues sur la colonne d'affinité. FX, fraction d'élution #X.

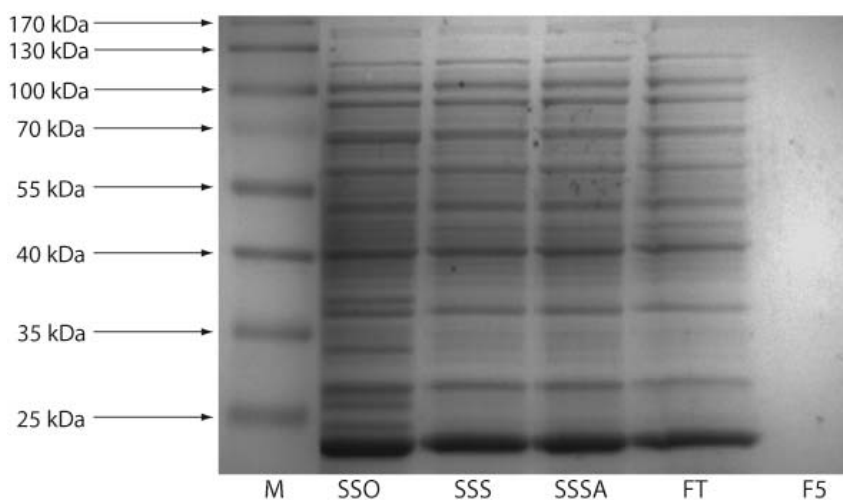
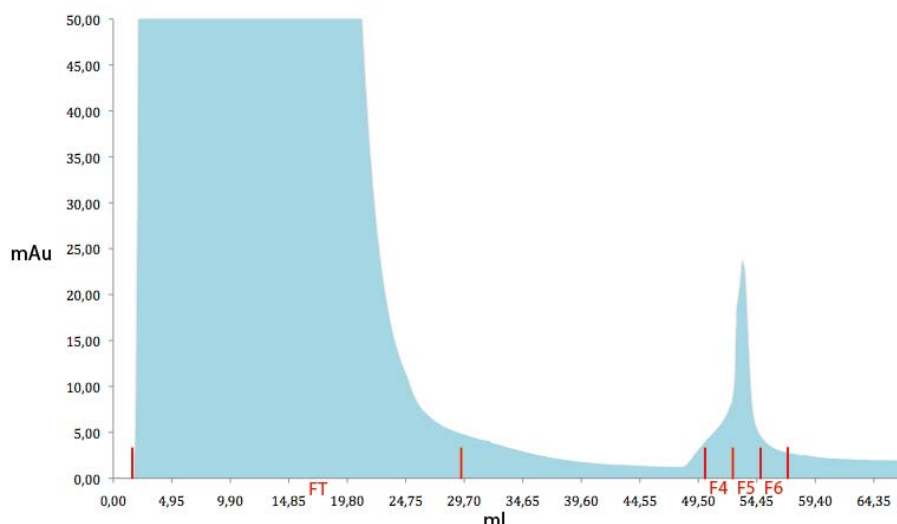
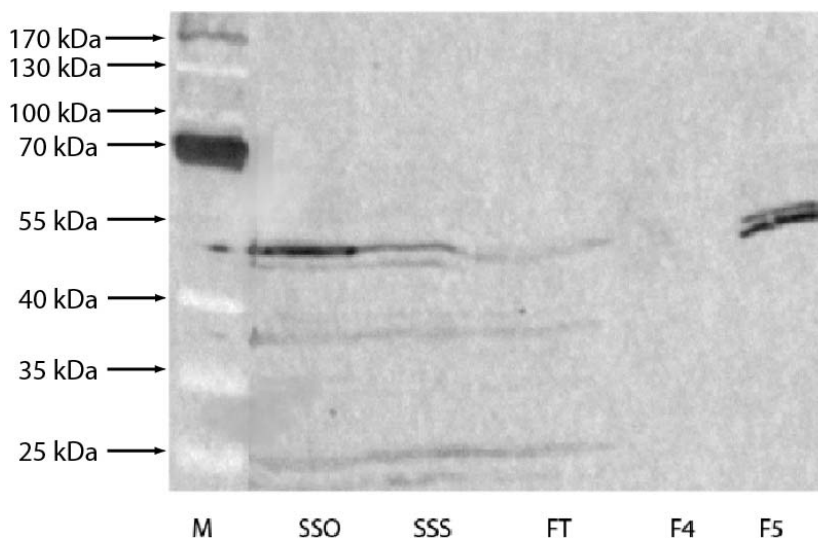


Figure 15 : Bilan de purification de la lipase NT01CX2047 de *C. novyi* sur gel de polyacrylamide 12%.

M : PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).
 SSO, surnageant de sonication ; SSS, SSO+streptomycine sulfate ; SSSA, SSS+avidine ; FT, protéines non retenues sur la colonne ; F5, fraction d'élution #5.

Figure 16 : Western-blot réalisé sur les différents échantillons de la purification de la lipase NT01CX2047 de *C. novyi-NT*, par hybridation à la *Strep*-Tactin® conjugué à une peroxydase (IBA). M : PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). SSO, surnageant de sonication ; SSS, SSO+streptomycine sulfate ; SSSA, SSS+avidine ; FT, protéines non retenues sur la colonne ; FX, fraction d'élution #X.



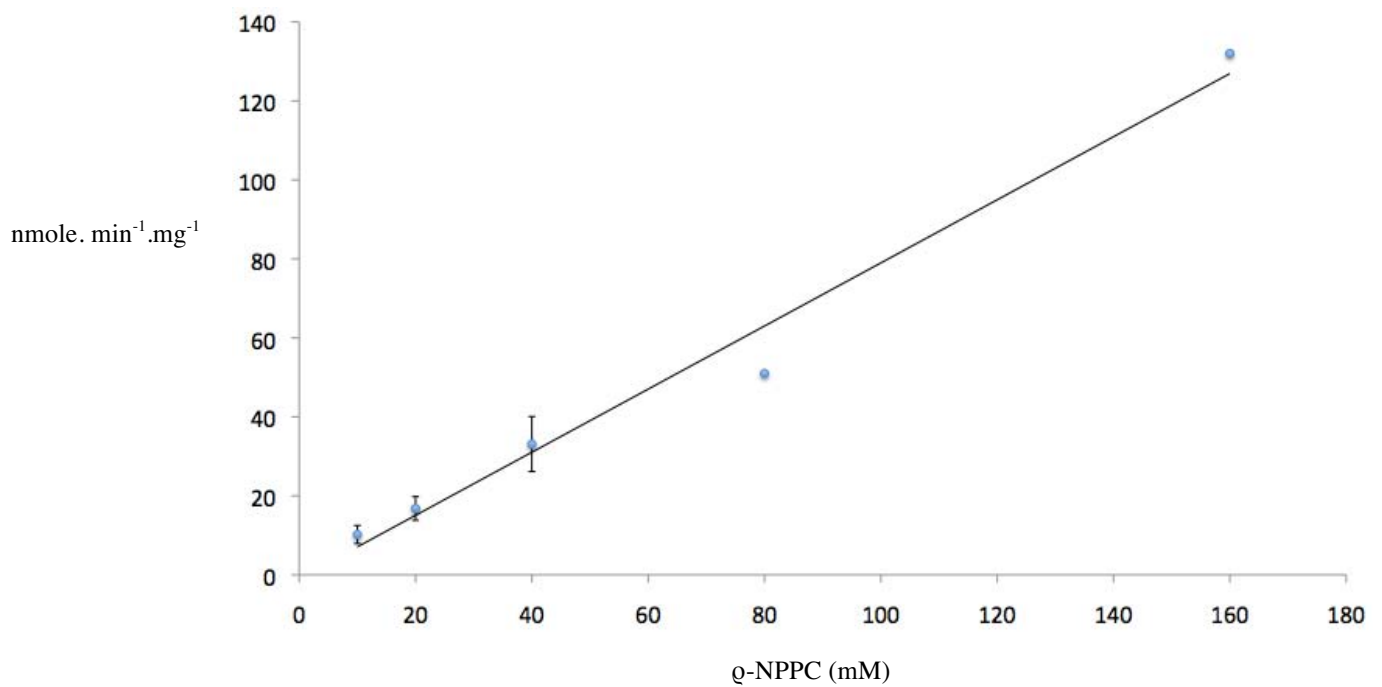


Figure 17 : Activité de la phospholipase C tronquée de *C. novyi-NT* en fonction de la quantité en substrat (q-NPPC).

Les activités sont exprimées en mUI.mg de protéine⁻¹(nmole. min⁻¹.mg⁻¹).

obtenir des clones isolés. En parallèle, la même expérience a été réalisée avec la souche MGCcac15 transformée avec le plasmide pSOS95del, afin d'avoir un contrôle correspondant à la souche transformée avec un vecteur vide. Les résultats sont présentés en figure 18, page 20 bis. Il apparaît que dans le cas de la souche portant le plasmide permettant l'expression de la phospholipase tronquée, nous observons un halo autour des colonies, caractéristique de la production extracellulaire d'une enzyme à activité phospholipase, qui n'est pas retrouvé dans le cas du contrôle. La phospholipase semble donc être correctement exprimée et exportée dans cette souche.

6.2. Expression hétérologue de la lipase NT01CX2047

De même que pour la phospholipase C tronquée, le vecteur pS::2047 portant le gène codant la lipase NT01CX2047 de *C. novyi-NT* a été introduit chez la souche MGCcac15 de *C. acetobutylicum*. Sa présence a été confirmée par PCR sur colonie. Des cellules ont été étalées sur boîte supplémentée avec de la tributyrine de manière à obtenir des clones isolés. En parallèle, la même expérience a été réalisée avec la souche MGCcac15 transformée avec le plasmide pSOS95del, afin d'avoir un contrôle correspondant à la souche transformée avec un vecteur vide. Des halos ont été observés dans les deux cas, présentant des diamètres sensiblement identiques (résultats non présentés). Aucune activité lipolytique due à l'expression de la lipase n'est donc observée.

7. Délétion de la cassette de résistance à l'érythromycine dans la souche MGCcac15 Δ perR

La souche construite par Hillmann *et al.* en 2008 et qui n'exprime plus le régulateur PerR a été conçue grâce à une technique mise au point récemment (Soucaille *et al.*, 2006), au cours de laquelle le gène cible est remplacé par une cassette de résistance à l'érythromycine.

La première étape de délétion du gène consiste en l'introduction dans la cellule d'un vecteur sur lequel se trouve la cassette de résistance flanquée des séquences que l'on retrouve de part et d'autre du gène cible sur le chromosome de la bactérie. Suite à un double événement de recombinaison, le gène est remplacé par la cassette de résistance.

La deuxième étape consiste en la délétion de cette cassette. De part et d'autre de celle-ci sont situés des sites FRT (FLP recombinase target) reconnus par la Flip recombinase, qui est exprimée suite à l'introduction du vecteur pCLF portant le gène qui code cette protéine dans la cellule.

La souche obtenue auprès du groupe qui l'a conçue possédait encore la cassette de résistance à l'érythromycine. Sachant que la totalité des vecteurs utilisés chez *Clostridium* construits au cours de cette étude possède pour leur sélection le gène conférant la résistance à l'érythromycine, leur utilisation est rendue impossible par la présence de ce gène sur le chromosome

La souche MGCcac15 Δ perR a donc été transformée avec le plasmide pCLF, et sa présence a été confirmée par PCR (figure 19, page 20 ter).

Sachant que ce vecteur confère la résistance au thiamphénicol, les clones obtenus ont été repiqués sur un milieu RCA contenant cet antibiotique. Le locus correspondant à la position originelle du gène *perR* a été étudié par PCR, grâce à des oligonucléotides s'hybridant de part

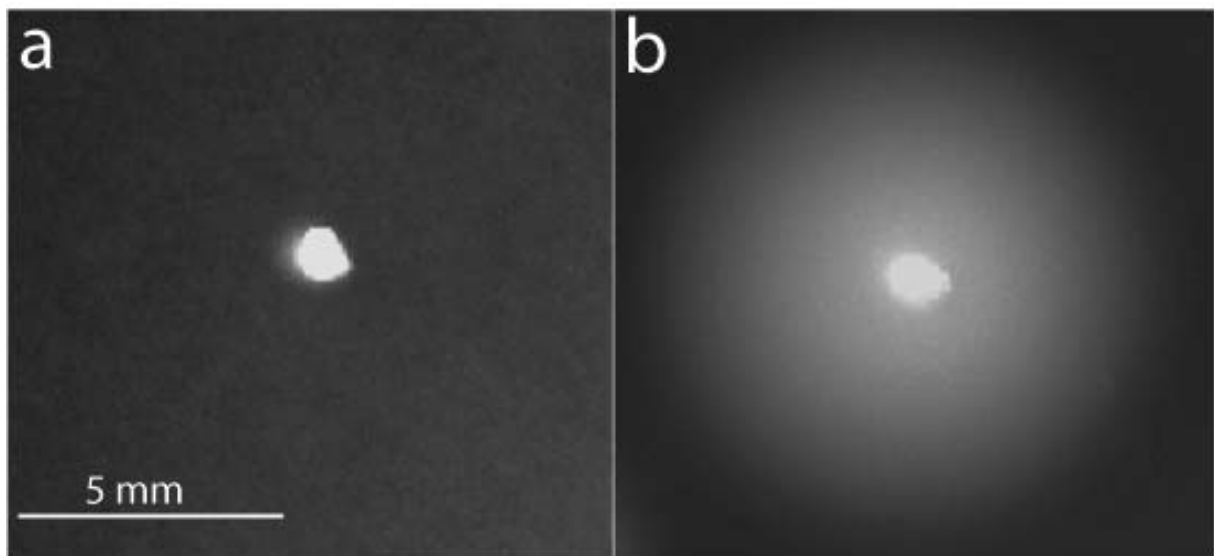


Figure 18 : Observation de l'expression et de l'export de la phospholipase C tronquée de *C. novyi-NT* chez *C. acetobutylicum*.

Des cellules de la souche MGccac15 de *C. acetobutylicum* ont été étalées sur un milieu RCA supplémenté avec du jaune d'œuf afin d'identifier l'activité lécithinase de la protéine.

En a : souche MGccac15 transformée avec le plasmide de contrôle pSOS95del.

En b : souche MGccac15 transformée avec le plasmide pS::0979 permettant l'expression de la phospholipase C tronquée de *C. novyi*.

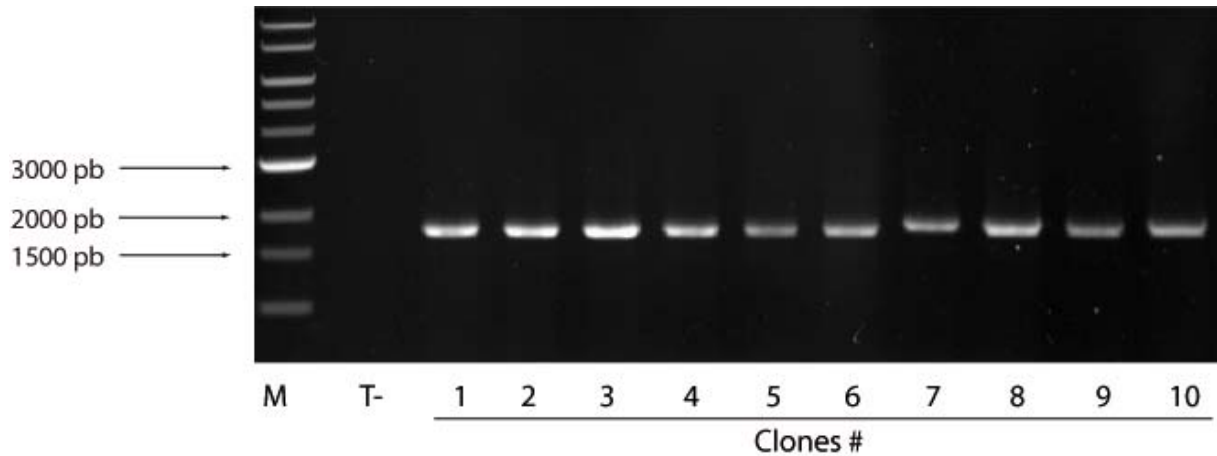


Figure 19 : Détection du plasmide pCLF dans les clones de *C. acetobutylicum* MGCcac15 Δ *perR* obtenus après transformation.

La présence du plasmide a été détectée par PCR sur colonies en utilisant des oligonucléotides s'hybridant spécifiquement sur celui-ci.

T-, clone non transformé ; M, DNA ladder 1 kb (NEB).

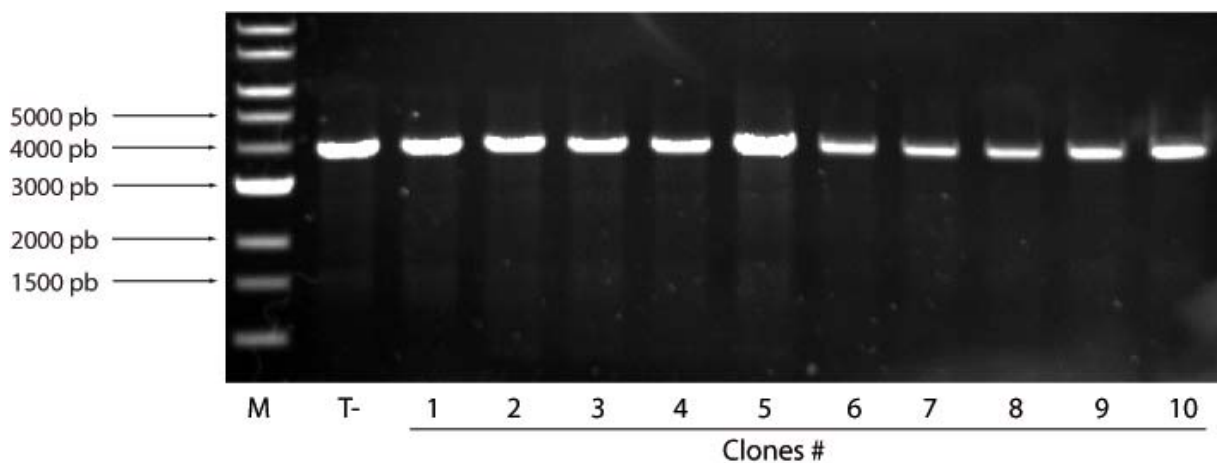


Figure 20 : Etude du locus *perR* des clones de *C. acetobutylicum* MGCcac15 Δ *perR* obtenus après transformation avec le plasmide pCLF.

T- : clone non transformé ; M, DNA ladder 1 kb (NEB).

et d'autre du gène, et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 20 en page 20 ter. Dans le cas d'une souche possédant la cassette de résistance dans son génome, un produit d'amplification d'une taille de 3845 pb est attendu. La séquence comprise entre les sites FRT et qui contient cette cassette à une taille de 1372 pb. Si elle est excisée, le produit d'amplification obtenu aura donc une taille d'environ 2500 pb.

Aucun des clones ne présentait de génotype intéressant puisque toutes les amplifications révélaient la présence de la cassette conférant la résistance à l'érythromycine.

Dans le but d'obtenir les clones possédant le bon génotype, des cultures liquides ont été réalisées dans un milieu CGM contenant du thiamphénicol, puis des étalements ont été réalisés sur milieu RCA contenant ce même antibiotique de manière à obtenir des clones isolés. Ceux-ci ont ensuite été repiqués à la fois sur milieu RCA contenant de l'érythromycine et sur milieu RCA contenant du thiamphénicol dans le but d'isoler des clones sensibles à l'érythromycine et résistants au thiamphénicol.

De tels clones n'ont jamais pu être obtenus malgré plusieurs tentatives, qui ont à chaque fois consisté à repartir de la transformation de la souche MGCCac15 par le plasmide pCLF. Ceci peut être dû à une mutation dans les sites FRT, qui vont empêcher leur reconnaissance par la Flip recombinase

Discussion

Le traitement des tumeurs est un problème majeur dans le domaine de la médecine, et de nombreuses approches ont été développées au cours des années afin de lutter contre elles.

Un des problèmes principaux des stratégies employées réside dans la faible spécificité que peut présenter le traitement choisi. Ainsi, l'utilisation de molécules chimiothérapeutiques peut provoquer des dommages dans les tissus sains. De même, il a été observé que l'emploi de vecteurs viraux ne conduit pas à un ciblage suffisant des zones affectées par la maladie (Minton, 2003).

L'utilisation de bactéries anaérobies dans le but de délivrer des gènes d'intérêt thérapeutique dans les tumeurs est une stratégie extrêmement prometteuse dans le but d'améliorer le ciblage des tissus cancéreux. En effet, il a été montré que les zones hypoxiques ne sont présentes que dans les tumeurs, et ne sont pas trouvées chez des individus sains. Ces régions fournissent un environnement idéal aux bactéries anaérobies pour leur développement. Ces bactéries, utilisées comme vecteurs thérapeutiques, seront capables de ne délivrer des protéines d'intérêt ou de convertir des pro-médicaments en médicaments que dans les tumeurs. Un autre avantage de cette approche est que la thérapie peut être stoppée à n'importe quel moment par l'emploi d'antibiotiques.

Ces raisons ont conduit au développement et à la construction lors de ces dernières années de souches bactériennes recombinantes capables d'exprimer des protéines d'intérêt thérapeutique (Theys *et al.*, 1999 ; Theys *et al.*, 2001).

Au cours de cette étude, nous avons cherché à mettre au point des constructions génétiques permettant la conception d'une telle souche. L'espèce *C. acetobutylicum* a été choisie car il s'agit d'une bactérie sporulante, anaérobie stricte et non pathogène. En outre, son génome et sa physiologie sont maintenant relativement bien connus. Enfin, des outils efficaces permettant de la modifier génétiquement ont été conçus récemment. Ce n'est pas encore le cas pour une bactérie telle que *C. novyi-NT*, dont les capacités anti-tumorales sont particulièrement prometteuses.

Deux protéines de *C. novyi-NT*, impliquées dans les capacités thérapeutiques de cette souche (Bettegowda *et al.*, 2006 ; Cheong *et al.*, 2006) ont été choisies pour être exprimées dans *C. acetobutylicum*. Ces protéines semblent en effet responsables des bonnes capacités de colonisation des tumeurs de *C. novyi-NT*. La première est une phospholipase C, qui agit sur les membranes des cellules eucaryotes en dégradant les phospholipides. La seconde est une lipase possédant des capacités hémolytiques, et précédemment utilisée en raison de sa faculté à dégrader les membranes liposomales. Ces protéines sont codées respectivement par les gènes *NT01CX0979* et *NT01CX2047*.

La phospholipase C de *C. novyi-NT* étant une toxine présentant une similarité de séquence importante avec d'autres phospholipases létales (figure 4, page 15 bis), seul la séquence codant son domaine catalytique a été clonée. Il a été montré pour la toxine α de *C. perfringens* que ce domaine isolé ne présente plus les capacités toxiques de la protéine (Nagahama *et al.*, 1994).

Les gènes codant la lipase *NT01CX2047* et la phospholipase C *NT01CX0979* tronquée ont été clonés dans des vecteurs navettes, utilisables chez *E. coli* et *C. acetobutylicum*. Les purifications de ces protéines ont été effectuées à partir d'une souche d'*E. coli* modifiée génétiquement qui permet l'expression de protéines hétérologues. Les vecteurs ont été construits de telle sorte qu'ils permettent l'expression soit de l'une ou l'autre des protéines, soit des deux en plaçant les gènes qui les codent dans une structure opéronique. Dans les trois cas, les gènes ont été placés sous contrôle du promoteur du gène de la thiolase de *C. acetobutylicum*, un gène fortement exprimé. Un quatrième plasmide a été construit en

plaçant l'opéron constitué des deux gènes sous contrôle d'un autre promoteur fort, celui du gène de la phosphotransbutyrylase de *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 2003).

Ces constructions devaient permettre la synthèse de protéines actives chez la souche MGCcac15 de *C. acetobutylicum*. Cette souche est un mutant de la souche ATCC824 ne possédant plus le système de restriction/modification propre à cette espèce. Elles devaient également permettre l'export de ces protéines dans le milieu extracellulaire, dans l'optique de les utiliser dans une approche anti-cancéreuse. Pour ce faire, les peptides d'adressage naturels des protéines ont été conservés.

Enfin, deux vecteurs permettant l'expression de chacune des deux protéines fusionnées en C-ter à un *Strep*-tag II ont été construits, afin de permettre une purification aisée de ces protéines.

A l'aide de ces constructions, la phospholipase C NT01CX0979 tronquée a pu être purifiée par chromatographie en phase liquide. Des tests d'activité sur l'extrait protéique obtenu ont conduit à l'obtention de valeurs d'activité du même ordre que celles de phospholipases C d'autres espèces de *Clostridium*. En effet, pour des concentrations en O-(4-Nitrophenyl-phosphoryl) choline de 20 mM, une activité spécifique de 17 mUI.mg⁻¹ est obtenue. Les valeurs trouvées dans la littérature concernant les enzymes de *C. bifermentans*, *C. perfringens* et *C. sordellii* sont respectivement de 2,37 mUI.mg⁻¹, 94,7 mUI.mg⁻¹ et 7,16 mUI.mg⁻¹ pour ce même substrat (Karasawa *et al.*, 2002).

L'activité spécifique de la phospholipase C entière de *C. novyi-NT* n'a jamais été déterminée, que ce soit avec ce substrat ou un autre. Nous ne pouvons donc émettre de conclusions concernant l'influence du domaine C-ter sur l'activité enzymatique, si ce n'est que le domaine N-terminal semble suffisant pour conférer à la protéine son activité lécithinase. Une étude précédente s'intéressant à la phospholipase C de *C. perfringens*, homologue structurel de l'enzyme de *C. novyi-NT* a montré que la suppression du domaine C-ter n'a pas d'influence sur l'activité enzymatique, et qu'une forme tronquée de la protéine présente les mêmes capacités que la forme entière (Flores-Díaza et Alape-Giroñ, 2003). Il serait intéressant d'exprimer et de caractériser la protéine entière de *C. novyi-NT* afin de déterminer si cette observation peut également être faite chez cet organisme. De plus, il faudra s'assurer que la présence du *Strep*-tag en C-ter n'a pas d'influence sur l'activité de l'enzyme.

Il n'a pas été possible d'utiliser des concentrations en substrat suffisamment élevées pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. A notre connaissance, ces paramètres n'ont jamais été déterminés pour des phospholipases C provenant d'espèces de *Clostridium*. Des concentrations de 160 mM en O-(4-Nitrophenyl-phosphoryl) choline n'ont pas permis d'observer de saturation de l'activité de l'enzyme. Il semble donc que son affinité pour ce substrat soit faible.

Celui-ci est un dérivé structural de la phosphatidylcholine. Il ne peut pas permettre l'estimation réelle de la capacité de l'enzyme à cliver les phospholipides en raison de l'absence de la chaîne hydrocarbonée nécessaire à l'hydrolyse par l'enzyme (El-Sayed *et al.*, 1985). Ceci explique que le K_M ne puisse être déterminé malgré l'emploi de concentrations en substrat élevées.

La détermination de paramètres cinétiques pourrait être rendue possible par d'autres techniques. Parmi celles-ci, l'utilisation de substrats naturels radiomarqués permettrait de réaliser des mesures précises de la digestion des phospholipides, de même que l'utilisation de bicouches phospholipidiques artificielles (Hernández-Sotomayor *et al.*, 1999).

Le plasmide pS::0979 permet l'expression de la phospholipase tronquée. L'étalement sur milieu RCA supplémenté en jaune d'œuf de la souche MGCcac15 transformée avec ce plasmide permet de confirmer que la protéine est exprimée et active chez *C. acetobutylicum*

(figure 18, page 20 bis). Nous pouvons également confirmer qu'elle est bien exportée dans le milieu extracellulaire. Le peptide signal naturel de la protéine est donc bien reconnu par la machinerie d'export de *C. acetobutylicum*. D'après les connaissances actuelles sur cet organisme, il est probable que l'export se fasse via le système Sec (Secretion). Il s'agit de la principale machinerie d'export de la souche ATCC824, les systèmes ABC (ATP Binding Cassette) et Tat (Twin Arginine Translocation) n'étant pas retrouvés dans cet organisme (Desvaux *et al.* 2005).

L'expression et la purification de la lipase ont été plus complexes. Cette protéine semble former des corps d'inclusion chez *E. coli*, et elle est retrouvée dans les débris cellulaires après sonication.

Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer la formation de corps insolubles. Elle peut être due à un mauvais repliement de la protéine suite à une synthèse trop rapide. La présence de zones hydrophobes peut également faire précipiter la protéine. Enfin, nous pouvons imaginer que la conservation du peptide signal de la protéine puisse être responsable de la formation de corps d'inclusion, si cette séquence d'adressage n'est pas reconnue par la machinerie d'export d'*E. coli*.

En diminuant la température de croissance, nous avons obtenu une fraction plus importante de la protéine sous forme soluble, qui a été purifiée. Le rendement de purification est cependant faible.

Le clonage du gène de la lipase sans son peptide signal pourrait améliorer la solubilité de la protéine. L'utilisation d'un système inductible chez *E. coli* pourrait également s'avérer payante, puisqu'il s'agit de la stratégie précédemment employée pour purifier la protéine (Cheong *et al.*, 2006).

Afin d'exprimer la lipase, la souche MGCcac15 a été transformée avec le plasmide pS::2047. L'étalement sur milieu RCA supplémenté en tributyrine n'a pas permis d'identifier d'activité lipase autre que celle déjà détectée pour une souche transformée avec un vecteur vide. Il semble donc que la protéine ne soit pas correctement exprimée ou exportée à partir de cette construction. Bien que le peptide signal ait une séquence relativement différente de celui de la phospholipase C, ces deux séquences ont sensiblement la même taille (35 a.a pour la lipase, 29 pour la phospholipase C) et il a été prédit par le logiciel SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) que la séquence d'adressage de la lipase est reconnue par la machinerie d'export d'une bactérie de type gram+. A noter que le site de clivage n'est cependant pas le même (AFA/KE pour la lipase, AYG/WD pour la phospholipase). Sachant que *C. novyi* est un organisme dont la physiologie est peu connue, l'hypothèse peut être émise selon laquelle un autre mécanisme de transport est impliqué dans le transport de la lipase dans le milieu extracellulaire.

Afin de connaître le devenir de la protéine dans la cellule, il peut être envisagé d'exprimer la lipase fusionnée au *Strep*-tag II et de réaliser des expériences d'hybridation chez *C. acetobutylicum*. Cette expérience permettra de déterminer si la protéine est correctement exprimée et exportée dans le milieu extracellulaire.

Une des raisons pour laquelle la bactérie *C. acetobutylicum* a été choisie est son incapacité à croître en présence d'oxygène.

La souche MGCcac15 Δ *perR* possède une tolérance accrue à l'oxygène. Cette particularité peut être un avantage pour cibler des tumeurs de petite taille, dans lesquelles les concentrations en oxygène sont plus élevées qu'au cœur même des tumeurs solides.

Cette souche a été construite en remplaçant le gène codant le régulateur PerR par une cassette conférant la résistance à l'érythromycine, flanquée de sites FRT. L'expression de la

Flip recombinase permet d'exciser cette cassette. Le gène codant cette protéine est présent sur le vecteur pCLF. Le mutant utilisé, obtenu auprès du groupe qui l'a conçu, possédait encore la résistance à l'érythromycine et a donc été transformé avec le vecteur pCLF.

Il n'a cependant jamais été possible d'obtenir une souche dans laquelle la cassette était excisée. L'équipe ayant conçu cette souche n'y est pas non plus parvenu (Hillmann, communication personnelle).

La technique de délétion utilisée a prouvé son efficacité pour la génération de plusieurs mutants de *C. acetobutylicum* (Soucaille *et al.* 2006), et ne saurait donc être tenue comme responsable de cet échec.

Pour déterminer la raison de l'impossibilité de déléter ce gène, les sites FRT pourraient être séquencés afin de s'assurer qu'ils sont fonctionnels. S'ils le sont, le mutant pourrait être construit à nouveau, par la même technique, ou en changeant d'approche (Heap *et al.*, 2007).

L'ensemble des vecteurs construits lors de l'étude porte le gène de résistance à l'érythromycine. Leur utilisation chez MGCcac15 Δ *perR* est donc impossible en l'état. S'il est impossible de rendre le mutant sensible à l'érythromycine, nous pourrions modifier le gène de résistance porté par nos constructions.

Au cours de cette étude, nous avons conçu des constructions génétiques permettant l'expression chez *C. acetobutylicum* de gènes impliqués dans les très bonnes capacités de colonisation des tumeurs de *C. novyi-NT*.

La construction pS::0979 permet d'exprimer la phospholipase C NT01CX0979 tronquée de *C. novyi* active. De plus, cette protéine est correctement exportée dans le milieu extracellulaire, et confère à *C. acetobutylicum* la capacité à dégrader les lécithines, qui n'est pas observée chez la souche sauvage. Par la suite, il pourra être intéressant de permettre l'expression de la protéine entière, afin de pouvoir déterminer l'importance du domaine C-terminal de la protéine dans la colonisation de cellules tumorales.

Les constructions sensées permettre l'expression de la lipase NT01CX2047 n'ont pour l'instant pas permis de purifier cette enzyme dans des rendements satisfaisants. L'approche utilisée pourrait être modifiée, et l'utilisation d'un système inductible à l'IPTG faisant appel à un vecteur pET dans lequel serait clonée la séquence codant pour la protéine sans son peptide signal est envisagée.

L'expression et l'export de cette même lipase ne semblent pas effectifs à partir de la construction pS::2047. En attendant des résultats de western-blot permettant de déterminer le devenir de la protéine dans la cellule, il peut être envisagé plusieurs possibilités pour améliorer son expression et son export. Premièrement, l'utilisation d'un RBS correspondant à une séquence plus consensuelle que celle du RBS naturel du gène et qui a été conservée. La séquence AGGAGG pourrait ainsi être utilisée (Ciruela *et al.*, 1996). Deuxièmement, la fusion d'un peptide signal d'une protéine extracellulaire de *C. acetobutylicum* en lieu et place de celui de la protéine permettra d'améliorer son export.

Par la suite, une fois que les protocoles de purification des protéines permettront l'obtention de quantité de protéines étiquetées suffisamment importantes, il sera intéressant de générer des anticorps dirigés contre celles-ci. Ceux-ci nous permettront de suivre la localisation des protéines chez *C. acetobutylicum* et lors de l'introduction des souches recombinantes dans des organismes modèle porteurs de tumeurs.

Enfin, afin d'introduire des souches stables dans ces organismes, tels que les souris, il sera nécessaire d'intégrer les gènes codant les protéines d'intérêt dans le génome de la bactérie, afin de s'affranchir de l'utilisation d'antibiotiques.

Références Bibliographiques

- Bagshawe, K. D. 1987.
Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrug concept.
Br. J. Cancer **56** : 531–532.
- Barbé, S., Van Mellaert, L. and Anné, J. 2006.
The use of clostridial spores for cancer treatment.
J Appl. Microbiol. **101** : 571–578.
- Bateman, A. and Sandford, R. 1999.
The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle
Current Biology, **9** : 588-590.
- Bettegowda, C., Huang, X., Lin, J., Cheong, I., Kohli, M., Szabo, S.A., Zhang, X., Diaz Jr, L.A., Velculescu, V.E., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Zhou, S. 2006.
The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent *Clostridium novyi-NT*.
Nat. Biotechnol. **24** : 1573-1580.
- Bradford, M.M. 1976.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72** : 248-54.
- Brenot, A., Weston, B.F., and Caparon, M.G. 2007.
A Per-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*.
Mol. Microbiol. **63**: 1185–1196.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P., and Helmann, J.D. 1998.
Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors.
Mol. Microbiol. **29**: 189–198.
- Carey, R.W., Holland, J.F., Whang, H.Y., Neter, E. and Bryant, B. 1967.
Clostridial oncolysis in man.
Eur J Cancer **3** : 37–46.
- Cheong, I., Huang, X., Bettegowda, C., Diaz Jr., L.A., Kinzler, K.W., Zhou, S. and Vogelstein, B. 2006.
A Bacterial Protein Enhances the Release and Efficacy of Liposomal Cancer Drugs
Science **314** : 1308-1311.
- Connell, H. 1935.
The study and treatment of cancer by proteolytic enzymes. A preliminary report.
Can Med Ass J **33** : 364–370.
- Dang, L.H., Bettegowda, C., Huso, D.L., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 2001.
Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** : 15155–15160.

- Desvaux, M., Khan, A., Scott-Tucker, A., Chaudhuri, R.R., Pallen, M.J. and Henderson, I.R. 2005.
Genomic analysis of the protein secretion systems in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.
Biochimica et Biophysica Acta **1745** : 223 – 253.
- Dobbelstein, M.
Viruses in therapy — royal road or deadend?
Virus Res. **92** : 219–221 (2003).
- Eklund, M.W., Poysky, F. T., Meyers, J. A. and Pelroy, G. A. 1974.
Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage.
Science **186** : 456–458.
- El-Sayed, M. Y., and M. F. Roberts. 1985.
Charged détergents enhance the activity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) towards micellar short chain phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **831**:133-141.
- Flores-Díaza, M. and Alape-Giroñ, A. 2003.
Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene
Toxicon **42** : 979–986.
- Girbal, L., Mortier-Barrière, I., Raynaud, F., Rouanet, C., Croux, C. and Soucaille, P. 2003.
Development of a Sensitive Gene Expression Reporter System and an Inducible Promoter-Repressor System for *Clostridium acetobutylicum*
Appl. Environ. Microbiol. **69** : 4985–4988
- Greco, O., Marples, B., Dachs, G. U., Williams, K. J., Patterson, A.V. and Scott, S.D. 2002.
Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation.
Gene Ther. **9** : 1403-11.
- Gubash, S.M. 1991.
Improved egg-yolk agar plate medium for the detection of clostridial phospholipase C activity.
Res. Microbiol. **142** : 87-93.
- Harris, A.L. 2002.
Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth.
Nature Rev. Cancer **1** : 38–47.
- Harrison, L.B., Chadha, M., Hill, R.J., Hu, K. and Shasha, D. 2002.
Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes.
Oncologist **7** : 492–508.
- Hasan, F., Shah, A.A. and Hameed, A. 2009
Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review.
J Biotech Adv **27** : 782–798

- Hatheway, C. L. 1990.
Toxigenic Clostridia.
Clin. Microbiol. Rev. **3** : 66-98.
- Hauer P.J., Yeary T.J. and Rosenbusch R.F. 2004.
Cloning and molecular characterization of the beta toxin (phospholipase C) gene of *Clostridium haemolyticum*.
Anaerobe **10** : 243–54.
- Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P. and Minton, N.P. 2007.
The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*.
J. Microbiol. Methods **70** : 452–464.
- Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Gaballa, A., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Fawcett, P., and Paddon, C. 2003.
The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors.
J. Bacteriol. **185**: 243–253.
- Hernández-Sotomayor, S.M., De Los Santos-Briones, C., Muñoz-Sánchez, J.A. and Loyola-Vargas, V.M. 1999.
Kinetic Analysis of Phospholipase C from *Catharanthus roseus* Transformed Roots Using Different Assays
Plant Physiology, **120** : 1075–1081.
- Hillmann, F., R. J. Fischer, F. Saint-Prix, L. Girbal, and Bahl, H. 2008.
PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*.
Mol. Microbiol. **68**: 848–860.
- Hillmann, F., Döring, C., Riebe, O., Ehrenreich, A., Fischer, R.J. and Bahl, H. 2009.
The Role of PerR in O₂-Affected Gene Expression of *Clostridium acetobutylicum*.
J. Bacteriol. **191** : 6082-6093.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. 1990.
High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
Gene **96** : 23-28.
- Jepson, M. and Titball, R. 2000.
Structure and function of clostridial phospholipases C
Microbes and Infection, **2** : 1277–1284
- Juliano, R. 2007.
Bugging Tumors to Put Drugs on Target
N. Engl. J. Med. **356** : 954-955.
- Kaasgaard, T. and Andresen, T.L. 2010.
Liposomal cancer therapy: exploiting tumor characteristics
Expert Opin Drug Deliv. **7** : 225-43.

Karasawa, T., Wang, X., Maegawa, T., Michiwa, Y., Kita, H., Miwa, K., and Nakamura, S. 2002.

Clostridium sordellii Phospholipase C: Gene Cloning and Comparison of Enzymatic and Biological Activities with Those of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* Phospholipase C.

Infect. Immun. **71** : 641–646.

Katayama, S., Matsushita, O., Jung, C. M., Minami, J. and Okabe, A. 1999.

Promoter upstream bent DNA activates the transcription of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene in a low temperature-dependent manner.

EMBO J. **18** : 3442–3450.

Lambin, P., Theys, J., Landuyt, W., Rijken, P., van der Kogel, A., van der Schueren, E., Hodgkiss, R., Fowler, Nuyts, S., de Bruijn, E., van Mellaert, L. and Anné J. 1998.

Colonisation of *Clostridium* in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumors. *Anaerobe* **4** : 183–188.

Lee, S.H., Choi, J.I., Park, S.J., Lee, S.Y. and Park, B.C. 2004.

Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using fadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis.

Appl. Environ. Microbiol. **70** : 5074–80.

Li, H., Singh, A.K., McIntyre, L.M., and Sherman, L.A. 2004.

Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis sp.* strain PCC 6803.

J. Bacteriol. **186**: 3331–3345.

Malmgren, R.A. and Flanigan, C.C. 1955.

Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration.

Cancer Res **15** : 743–748.

Mermelstein, L. D., Papoutsakis, E. T. 1993.

In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Appl Environ Microbiol **59** : 1077-1081.

Minton, N. P. 2003.

Clostridia in cancer therapy.

Nat. Rev. Microbiol. **1** : 237-242.

Möse, J.R. and Möse, G. 1964.

Oncolysis by clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other non-pathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma.

Cancer Res **24** : 212–216.

- Nagahama, M., Lida, H., Nishioka, E., Okamoto, K., Sakurai, J. 1994.
Roles of the carboxy-terminal region of *Clostridium perfringens* alpha toxin.
FEMS Microbiol. Lett. **120** : 297–302.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, O., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M. J., Bennett, G. N., Koonin, E. V., and Smith, D. R. 2001.
Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*.
J. Bacteriol. **183** : 4823-4838.
- Short, J. J. and Curiel, D.T. 2009
Oncolytic adenoviruses targeted to cancer stem cells.
Mol. Cancer. Ther. **8** : 2096-102.
- Sidhu, R.S., Bollon, A.P. 1993.
Tumor necrosis factor activities and cancer therapy--a perspective
Pharmacol Ther. **57** : 79-128.
- Soucaille, P., Figge, R., and Croux, C. 2006.
Process for chromosomal integration and DNA sequence replacement in Clostridia.
Dépôt PCT n° PCT/EP2006/066997.
- Taguchi, R., Ikezawa, H. 1974.
Phospholipase C from *Clostridium novyi* type A. I.
Biochim Biophys Acta. **409** : 75-85.
- Teicher B.A. 1995.
Physiologic mechanisms of therapeutic resistance: blood flow and hypoxia. Hematol Oncol Clin. North. Am. **9** : 475-506.
- Theys, J., Nuyts, S., Landuyt, W., Van Mellaert, L., Dillen, C., Böhringer, M., Dürre, P., Lambin, P. and Anné, J. 1999.
Stable *Escherichia coli* - *Clostridium acetobutylicum* shuttle vector for secretion of murine tumor necrosis factor alpha.
Appl. Environ. Microbiol. **65**: 4295-4300.
- Theys, I., Landuyt, W., Nuyts, S., Van Mellaert, L., Bosmans, E., Rijnders, A., Van Den Bogaert, W., Van Oosterom, A., Anné, J. and Lambin, P. 2001
Improvement of *Clostridium* tumour targeting vectors evaluated in rat rhabdomyosarcomas.
FEMS Immunol. Med. Microbiol. **30**: 37-41.
- Titball, R. W. 1993.
Bacterial phospholipases C.
Microbiol. Rev. **57** : 347–366.
- Torrey, J.C. and Kahn, M.C. 1927.
The treatment of Flexner- Jobling rat carcinomas with bacterial proteolytic ferments.
J Cancer Res **11** : 334–376.

- Tsutsui, K., Minami, J., Matsushita, O., Katayama, S., Taniguchi, Y., Nakamura, S., Nishioka, M. and Okabe A. 1995.
Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A to E and *Clostridium novyi*.
J. Bacteriol. **177** : 7164–7170.
- Tummala, S.B., N.E. Welker, and Papoutsakis, E.T. 1999.
Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.
Appl. Environ. Microbiol. **65** : 3793–3799.
- Tummala, S.B., N.E. Welker, and Papoutsakis, E.T. 2003.
Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*.
J. Bacteriol. **185** : 1923–1934.
- Wei, M.Q., Mengesha, A., Good, D. and Anné J. 2008.
Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era.
Cancer Letters **259** : 16–27
- Yazawa, K., Fisher, W.E., Brunicardi, F.C. 2002.
Current Progress in Suicide Gene Therapy for Cancer
World J. Surg. **26** : 783–789.