TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ii

RÉSUMÉ iii

LISTE DES TABLEAUX viii

LISTE DES FIGURES x

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES xii

CHAPITRE I
INTRODUCTION 1

CHAPITRE II
REVUE DE LITTÉRATURE 5

2.1 Description générale du *Bacillus thuringiensis* 5

2.1.1 Historique 5

2.1.2 Taxonomie et organisation cellulaire de *Bacillus thuringiensis* 5

2.1.3 Métabolisme et écologie 5

2.2 Usage industrielle de Bacillus thuringiensis pour la production d'insecticides . 6

2.3 Découverte de l'activité anti-cancéreuse de *Bacillus thuringiensis* 9

2.4 Espèces du genre Bacillus à implication médicale 10

2.4.1 *Bacillus anthracis* 10

2.4.2 *Bacillus* produisant des antibiotiques 13

2.4.3 *Bacillus polyfermenticus* 14

2.4.4 *Bacillus cereus* 14

2.5 Les parasporines anti-cancéreuse de *Bacillus thuringiensis* 15

2.5.1 Mode d'action des parasporines 15

2.5.1.1 Parasporine 1 (PS1) 15

2.5.1.2 Parasporine 2 (PS2) 15

2.5.1.3 Parasporine 3, 4, 5 et 6 (PS 3, 4, 5, 6) 17

2.5.2 Activation des parasporines 18

2.6 Milieux pharmaceutiques utilisés pour la production des vaccins 19

CHAPITRE III
PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE 22

3.1 Problématique, hypothèses du projet de recherche 22

3.2 Objectifs du projet de recherche 24

CHAPITRE IV
MATÉRIEL ET MÉTHODES 25

4.1 Souche bactérienne 25

4.2 Milieux de culture 25

4.2.1 Milieu de culture synthétique (milieu témoin) 25

4.2.2 Milieux de culture liquide de grade pharmaceutique 26

4.2.3 Milieu de culture solide 26

4.3 Inoculum et conditions de culture 26

4.4 Analyse des échantillons 28

4.5 Séparation des protéines de l'inclusion cristalline par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de laurysulfate de sodium (SDS-PAGE) 29

4.6 Culture cellulaire et test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie) 30

CHAPITRE V
RÉSULTATS ET DISCUSSION 31

5.1 Analyse des échantillons : décompte des cellules, des spores et détermination de la concentration totale des protéines 31

5.1.1 Milieu synthétique TSB (milieu témoin) 31

5.1.2 Milieu de production du vaccin sporulé contre l'anthrax 33

5.1.2.1 Milieu liquide aux peptones de caséine 33

5.1.2.2 Milieu gélosé aux peptones de caséine 36

5.1.3 Milieu de production du vaccin adsorbé contre l'anthrax : milieu Puziss Right 1095 37

5.1.4 Milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG) 41

5.2 Résultats de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de laurysulfate de sodium (SDS-PAGE) 45

5.3 Activité cytocide de la PS2Aa1 de *Bacillus thuringiensis* 4R2 sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie) 46

CHAPITRE VI
CONCLUSION **48**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **50**

ANNEXE A
DÉCOMPTE DES CELLULES ET SPORES POUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE EMPLOYÉS **59**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Nomenclature des protéines des cristaux (Hofte et Whiteley, 1989)	8
2.2	Liste des parasporines (Committee of Parasporin Classification and Nomenclature 2006)	10
4.1	Constituants du milieu de culture synthétique TSB	25
4.2	Constituants du milieu gélosé aux peptones de caséine	27
4.3	Constituants du Puziss Right medium 1095	28
4.4	Constituants du milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG)	28
5.1	Concentration totale des protéines (µg/mL) dans le milieu gélosé aux peptones de caséine (milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé)	37
A.1	Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu synthétique TSB	59
A.2	Concentration totale des protéines dans le milieu synthétique TSB	60
A.3	Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu liquide aux peptones de caséine (culture liquide dans le milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé sans gélose)	60
A.4	Concentration totale des protéines (µg/mL) dans le milieu liquide aux peptones de caséine (culture liquide dans le milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé sans gélose)	61
A.5	Concentration totale des protéines (µg/mL) dans le milieu gélosé aux peptones de caséine (culture solide dans le milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé)	61
A.6	Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 (culture liquide dans le milieu de production du vaccin adsorbé de l'anthrax)	62
A.7	Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095 (culture liquide dans le milieu de production du vaccin adsorbé de l'anthrax)	62

A.8 Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG) 63

A.9 Concentration totale des protéines dans le milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG) 63

A.10 Viabilité des Cellules de la lignée Hep G2 après traitement par la toxine de Bt 4R2 64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Activation des protéines spécifiques de l'apoptose (caspase-3, caspase-8 et PARP) chez les lignées cellulaires PC-3, HepG2 et MCF-7 (cancer de la prostate, foie et sein) après traitement par la toxine de *Bt* 4R2	4
2.1	(A) *Bacillus thuringiensis* en phase de sporulation. (B) Cristaux purifiés de *Bt* au microscope électronique à balayage. (C) Morphologie des cristaux de *Bt* au fort grossissement (x 3.6). (Swiecicka I *et al.*, 2007)	8
5.1	Décompte des cellules et des spores de *Bt* 4R2 dans le milieu synthétique TSB (Tryptic Soy Broth)	32
5.2	Concentration totale des protéines dans le milieu synthétique TSB (Tryptic Soy Broth).....	32
5.3	Décompte des cellules et des spores de *Bt* 4R2 dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essais I et II).....	33
5.4	Concentration totale des protéines dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essais I et II).....	34
5.5	Comparaison entre la croissance de *Bt* 4R2 dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essais I, II) et le milieu TSB	35
5.6	Comparaison entre le nombre de spores de *Bt* 4R2 formées dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essai I, II) et le milieu TSB	35
5.7	Comparaison de la concentration totale des protéines entre le milieu liquide aux peptones de caséine et le milieu synthétique TSB	36
5.8	Décompte des cellules et des spores de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 (essais I et II).....	38
5.9	Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095 (essai I, II et III)	38
5.10	Comparaison entre la croissance de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 et le milieu TSB	39
5.11	Comparaison entre le nombre de spores de *Bt* 4R2 formées dans le milieu Puziss Right 1095 et le milieu TSB	40

5.12 Comparaison de la concentration totale des protéines entre le milieu Puziss Right 1095 (essais I, II, III) et le milieu TSB 40

5.13 Décompte des cellules et des spores de *Bacillus thuringiensis* 4R2 dans le milieu de croissance Sauton (essais I et II) 41

5.14 Concentration totale des protéines dans le milieu de croissance Sauton (essai I, II et III) 42

5.15 Comparaison du nombre de cellules entre le milieu de croissance Sauton (essai I, II) et le milieu TSB 43

5.16 Comparaison entre le nombre de spores de *Bt* 4R2 formées dans le milieu de croissance Sauton (essai I, II) et le milieu TSB 43

5.17 Comparaison de la concentration totale des protéines entre le milieu de croissance Sauton (essai I, II, III) et le milieu TSB 44

5.18 Concentration totale des protéines dans les différents milieux de culture employés 45

5.19 Analyse par SDS-PAGE du cristal protéique de *Bacillus thuringiensis* 4R2 (A : milieu synthétique; B : milieu liquide aux peptones de caséine; C : milieu de Sauton; D : milieu gélosé aux peptones de caséine) 46

5.20 Activité cytotoxique de la toxine PS2Aa1 de *Bt* 4R2 sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie) en fonction des doses administrées 47

Rapport-Gratuit.com

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A549	Lignée cellulaire dérivé du cancer du poumon
B	*Bacillus*
Bt	*Bacillus thuringiensis*
°C	Degré Celsius
Caco-2	Lignée cellulaire dérivé d'une tumeur colorectal hétérogène
CFU	Unités formant des colonies
Cry	Protéines cristalline
Cyt	Protéines cytolysines
DLD-1	Lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal
HC	Chondrocytes humains
HepG2	Lignées cellulaire du cancer du foie
HeLa	Lignée cellulaire du cancer du col
HIEEC	Cellules épithéliales de l'endomètre
HIESC	Cellules stromales de l'endomètre
HL-60	Promyéloblastes de la leucémie aigüe
HT-29	Lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal
Jurkat	Lymphocytes T du lymphome
µg	Micro gramme
µL	Microlittre
mg	Milligramme
mM	Millimolaire
mL	Millilitre
MCF-7	Lignées de cellules tumorales mammaires

MoLT-4	Cellules T leucémiques
MRC-5	Fibroblastes dérivés du poumon normal
PS	Parasporine
PC-3	Lignée cellulaire dérivée du cancer de la prostate
Swano	Lignée cellulaire dérivée de l'adénocarcinome endométriale
TCS	Lignée cellulaire dérivée du cancer du côlon
TSB	Bouillon de soja tryptique
UtSMC	Cellules normales de l'utérus

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2012, on comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie [1]. Au Canada, les maladies cardiaques et circulatoires sont dépassées par le cancer comme première cause de mortalité [2]. Au cours de ces dernières années, la recherche en cancérologie a permis une évolution considérable dans les méthodes de diagnostic et des traitements pour le cancer. Dans cette quête pour de nouvelles molécules thérapeutiques, le monde microbiologique a été exploré pour la fabrication de médicaments anti-cancéreux, les laboratoires de recherche biomédicale ont donc dirigé leurs études vers l'analyse des propriétés chimiothérapeutique de produits naturels synthétisés par les microorganismes. Parmi eux, les *Streptomyces* synthétisant les anthracyclines, qui ont été une source d'inspiration en oncologie [3]. Ces dernières sont utilisées dans le traitement néo-adjuvant du cancer du sein. Elles agissent en s'intercalant entre les paires de bases azotées de l'ADN de la cellule cancéreuse et inhibent l'activité de la topoisomérase II. Elles perturbent ainsi la division cellulaire et entrainent la mort de la cellule [3]. Un autre exemple est le vaccin BCG (Bilié Calmet Guérin) qui contient *mycobactérium bovis.* Ce vaccin fut utilisé depuis 1921 pour la prévention de la tuberculose [4]. Dans les années 1970, il a été proposé par l'urologue canadien Dr Alvaro Morales pour le traitement du cancer superficiel de la vessie. Le mode d'action de ce vaccin est basé sur la création d'une réaction inflammatoire, entrainant l'activation de la réponse immune spécifique avec migration des cellules cytotoxiques (CD8, lymphocyte NK, LAK, BAK et gamma-delta, macrophages) [5]. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est une autre bactérie qui fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. *Bt* est connu pour son utilisation comme insecticide dans les formulations à pulvériser, il a la particularité de synthétiser lors de la sporulation une inclusion cristalline contenant des protéines. Parmi elles, les protéines Cry, qui ont selon les souches une activité larvicide sur différentes espèces d'insectes appartenant à trois

ordres : Cry I et Cry II toxiques pour les Lépidoptères, Cry II et Cry IV pour les Diptères et Cry III pour les Coléoptères [6]. Il a récemment été démontré que certaines souches expriment des parasporines (PS), qui représentent une nouvelle classe fonctionnelle des protéines cristallines Cry [7]. Ces parasporines ne sont pas insecticides, mais douées d'activité cytocide contre certaines lignées cellulaires dérivées de cancers humains, tout en épargnant les cellules normales.

L'une de ces parasporine est la parasporine PS2Aa1 (Cry46Aa1), qui a été initialement exprimée par la souche *Bacillus thuringiensis* A1547 [7]. Cette PS, après traitement par la protéinase K est cytotoxique pour les lignées HepG2 (cellule du carcinome hépatocellulaire), MCF-7 (cellules tumorales mammaires), PC-3 (cellules du cancer de la prostate), Swano (cellules de l'adénocarcinome endométriale), Molt-4 (cellules T leucémiques), Jurkat (lymphocytes T du lymphome) et HL-60 (Promyéloblastes de la leucémie aigüe). De plus, elle n'entraine aucun changement sur les hépatocytes normaux, sur les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre [7]. La parasporine PS2Aa1 a été à nouveau isolée par l'équipe de recherche du professeur Marc Sirois de l'Université du Québec à Trois-Rivières, à partir d'une nouvelle souche nommée *Bacillus thuringiensis* 4R2 [8]. L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de laurysulfate de sodium (SDS-PAGE) des protéines cristallines solubilisées de *Bt* 4R2 a révélé une bande majeure à hauteur de 37 kDa environ [8], l'expérience par PCR (réaction en chaine par polymérase) avec des amorces spécifiques Cry46Aa1 a obtenu un produit d'amplification de 940 pb [8], l'analyse de la séquence nucléotidique par l'outil BLAST de NCBI a révélé que la séquence était homologue à 100 % avec la séquence nucléotidique Cry46Aa1 (NCBI numéro d'accès de AB099515.1) exprimée par *Bt* A1547. En raison de cette identité de séquences, la protéine de 37 kDa de *Bt* 4R2 a été nommée PS2Aa1 [8]. Les gènes Cry qui codent pour les protéines Cry sont localisés sur les plasmides, ces derniers peuvent être transférés entre les espèces de *Bacillus thuringiensis*. Ce transfert de plasmides expliquerait pourquoi le gène codant la protéine PS2Aa1 (Cry 46Aa1) peut être présent dans deux souches différentes de *Bacillus thuringiensis* [9]. Il a encore été démontré que la PS2Aa1 exprimé par *Bacillus thuringiensis* 4R2 présente une activité hautement

cytotoxique envers les lignées cellulaires humaines : HepG2 (carcinome hépatocellulaire), MCF-7 et MDA-MB231 (adénocarcinomes mammaires), KLE et Hec-Ia (adénocarcinomes utérins), PC-3 (cancer de la prostate) [8] et aucune cytotoxicité envers les lignées cellulaires humaines normales IOSE-144 (cellules épithéliales ovariennes), HIEEC et HIESC (cellules épithéliales et stromales de l'endomètre) [8]. Les lignées HepG2, MCF-7, PC-3 et HIESC ont été sélectionné pour l'étude du mode d'action de la PS2Aa1 [8]. Chez ces lignées cellulaires, l'analyse par Western bloth a permis d'observer l'activation des protéines spécifiques de l'apoptose soit la caspase-3, la caspase-9 et la poly (ADP-ribose) polymérase (RAPP), les résultats sont présentés sur la Figure 1.1 [8]. Un rétrécissement des cellules a également été observé dans ces lignées cellulaires [8]. Toutes ces observations démontrent que la PS2Aa1 induit l'apoptose [8].

Le *Bacillus thuringiensis* a la capacité de croître et de se développer dans une grande variété de milieux de culture. Mais, afin d'envisage que la PS2Aa1 exprimé par *Bacillus thuringiensis* 4R2 soit candidate pour la synthèse d'un médicament anti-cancéreux, il est obligatoire qu'elle réponde à des exigences pharmaceutiques. Ainsi l'objectif de ce projet de recherche est tout d'abord et avant tout de démontrer que *Bacillus thuringiensis* 4R2 peut déjà croitre dans des milieux de grade pharmaceutique, qu'il peut produire la PS2Aa1 dans ces milieux, et que cette parasporine conserve son activité cytocide envers les lignées cellulaires cancéreuses. La détermination de l'existence de ces milieux de culture pharmaceutiques constitue l'essentiel de ce travail de recherche.

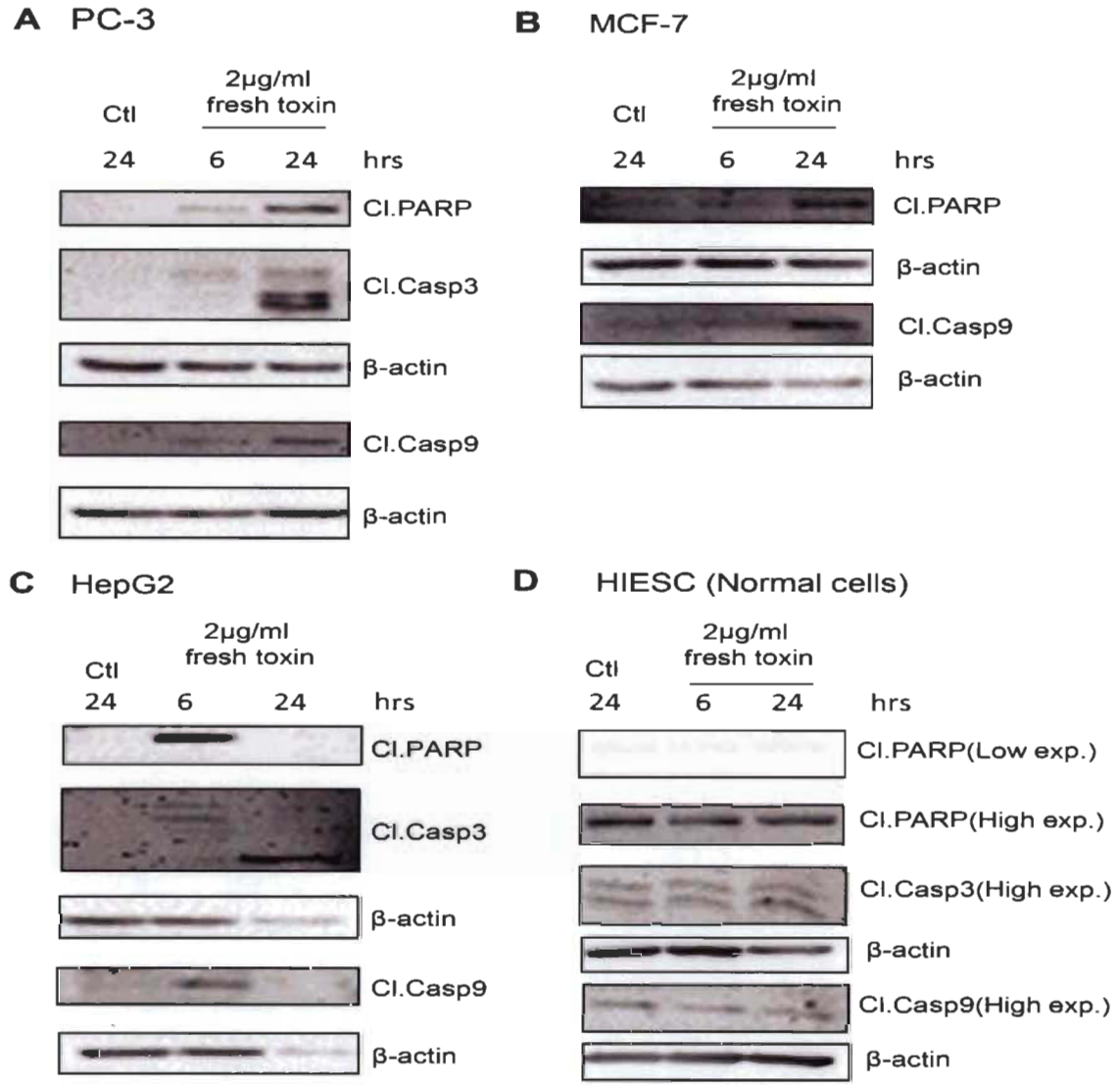

Figure 1.1 Activation des protéines spécifiques de l'apoptose (caspase-3, caspase-8 et PARP) chez les lignées cellulaires PC-3, HepG2 et MCF-7 (cancer de la prostate, foie et sein) après traitement par la toxine de *Bt* 4R2 [8].

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Description générale du *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Historique

Le *Bt* a été découvert pour la première fois au Japon en 1902 [7] dans un élevage de vers à soie (*Bombyx mori*). Il a été à nouveau isolé en 1911 en Thuringe en Allemagne à partir d'une population de teigne de la farine (*Ephestia kuhniella*) par Berliner [7]. Il comprit l'utilisation possible de ce microbe pour lutter contre les insectes nuisibles.

2.1.2 Taxonomie et organisation cellulaire de *Bacillus thuringiensis*

Le *Bt* est une bactérie Gram positif sporogène, qui a la particularité de synthétiser un cristal protéique lors de la sporulation [7]. Il peut être aérobie strict ou anaérobie facultatif. Il appartient à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales*, à la famille des *Bacillacées,* au genre *Bacillus* qui comprend au moins 36 espèces [10]. Il a une forme en bâtonnet, flagellée, chaque bactérie crée une seule endospore. Les endospores sont résistantes à la chaleur, au froid, à la dessiccation et à certains désinfectants.

2.1.3 Métabolisme et écologie

Le *Bt* présente un éventail de capacités physiologiques qui lui permettent de vivre dans une grande variété d'habitats. Il est naturellement présent dans le sol, entomopathogène, flagellé, caractérisé par la production durant la sporulation d'un corps parasporal, désigné cristal. Le cycle de croissance du *Bacillus thuringiensis* est caractérisé par une alternance de trois phases [11]. Après inoculation, une phase

d'adaptation à laquelle fait suite une phase de croissance rapide. Durant cette dernière, le *Bt* se multiplie de façon végétative. Les cellules se divisent de façon exponentielle par scissiparité jusqu'à appauvrissement du milieu pour l'un des nutriments essentiels, commence dès lors la phase stationnaire et s'engage alors la sporulation [11]. Ce processus intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance (carence en nutriments, en sels minéraux et manque d'eau). Durant la phase de croissance végétative, les cellules de *Bt* utilisent le carbone comme source de carbone et d'énergie pour la synthèse des protéines et autres métabolites. Lors du passage à la sporulation, des changements marquants sont observés au niveau du métabolisme, de la physiologie et de la cinétique cellulaire [12]. On constate une diminution du taux de croissance cellulaire pendant la formation de spores, du fait de la réduction de l'énergie nécessaire pour opérer la fission binaire [12]. Bien que la formation de l'inclusion cristalline et celle des spores soient considérées comme deux phénomènes indépendants, il a été rapporté qu'un blocage au niveau de l'expression des plasmides suite à des conditions défavorables au début de la sporulation pouvait empêcher la formation du cristal [12].

Il a également été rapporté que *Bacillus thuringiensis* est étroitement lié à deux autres importants *Bacillus* formant des spores, qui sont *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* [13]. Il existerait une similitude dans le génome de ces trois bactéries. Ils devraient être considérés comme appartenant à une seule et même espèce. Ils se distinguent fonctionnellement par la plupart des gènes portés sur les plasmides [13]. Cette similitude a été démontrée par MEE (électrophorèse enzymatique multifocale), en comparant les alloenzymes de 13 loci enzymatiques de 13 souches de *B. anthracis* à ceux de 227 de *B cereus* et *B thuringiensis*. Il a été conclu que les plus proches parents de *Bacillus anthracis* sont *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*.

2.2 Usage industrielle de *Bacillus thuringiensis* pour la production d'insecticides

En 1911, le biologiste allemand Berliner isole à nouveau *Bacillus thuringiensis* sur des chrysalides infectées de la teigne de farine, le *Bacillus* fut baptisé du nom de la

province de Thuringe. Mais c'est en France en 1938 que les premières formulations commerciales furent réalisées, elles étaient utilisées comme insecticide agricole [14]. Dans les années 1950, il fut prouvé que *Bt* tuait les larves de lépidoptères grâce à une inclusion cristalline protéique (Figure 2.1). Et c'est dans ces années, qu'il entrait en usage commercial aux États-Unis [15].

Il fallut attendre le début des années 1970 pour que la recherche amène la découverte de nouvelles souches et améliore la formulation du produit. Le *Bt* a suscité alors un intérêt croissant [16]. Aujourd'hui, plus de 50 000 souches de *Bt* ont été répertoriées.

L'activité insecticide de *Bacillus thuringiensis* est due à sa capacité de produire de grandes quantités de protéines, qui se trouvent dans une inclusion parasporal pendant la phase de sporulation. Ces protéines cristallines sont également connues comme les delta-endotoxines [17]. Il existe deux types de delta-endotoxines : les Cry (cristal delta-endotoxines) et les Cyt (cytolysines) [18].

Hofte et Whiteley ont défini quatre classes de gènes Cry (Tableau 2.1) et deux classes de gènes Cyt en 1998 [7], les toxines Cry se lient à des récepteurs spécifiques tandis que les toxines Cyt n'ont pas de récepteurs spécifiques. Les toxines Cry I et Cry II sont actives contre les Lépidoptères, Cry II et Cry IV contre les Diptères et Cry III contre les Coléoptères (Tableau 2.1). D'autre part, les toxines Cyt sont actives contre les Diptères et les Coléoptères [7], cependant leur activité est inférieure à celle des toxines Cry [19].

Les delta-endotoxines existent sous forme de protoxines dans l'inclusion parasporal également nommé cristal (Figure 2.1). Lorsqu'elle est ingérée par les insectes, l'inclusion parasporal est solubilisée dans l'intestin moyen, ce qui induit la libération des delta-endotoxines. Ces protoxines sont ensuite activées par les protéases de l'intestin moyen [20]. Les toxines activées se lient spécifiquement à des récepteurs de protéines dans l'épithélium de l'intestin moyen de l'insecte [21], ils produisent ensuite des pores,

ce qui provoque une perte de la fonction normale de la membrane [22]. Cette augmentation de la perméabilité de la membrane conduit à la lyse des cellules épithéliales, une paralysie de l'activité d'alimentation et finalement la mort des insectes [22].

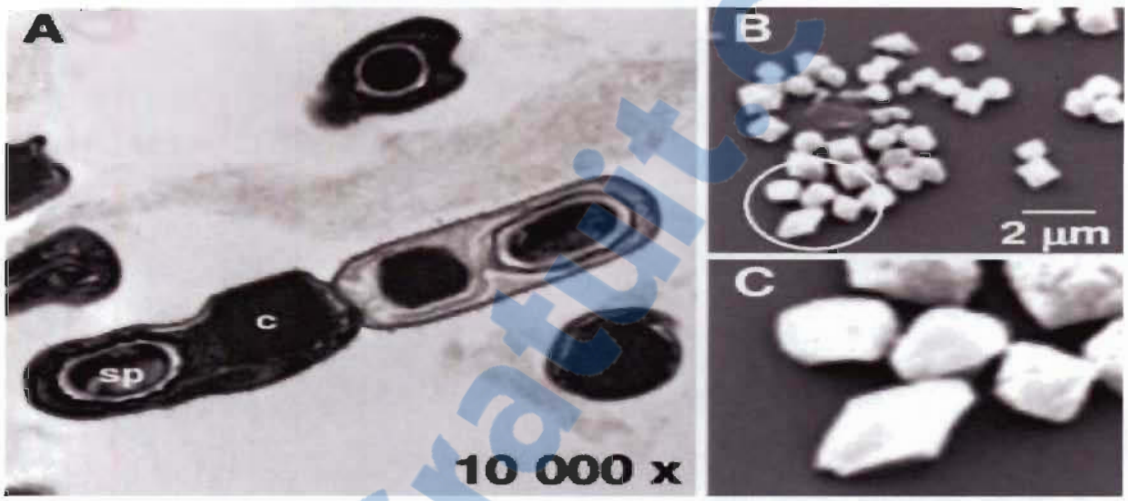

Figure 2.1 (A) *Bacillus thuringiensis* en phase de sporulation. (B) Cristaux purifiés de *Bt* au microscope électronique à balayage. (C) Morphologie des cristaux de *Bt* au fort grossissement (x 3.6). (Swiecicka I *et al.*, 2007) [23].

Tableau 2.1

Nomenclature des protéines des cristaux (Hofte et Whiteley, 1989) [7]

Protéines toxiques pour les larves de Lépidoptères		Protéines toxiques pour les larves de Lépidoptères et de Diptères		Protéines toxiques pour les larves de Coléoptères		Protéines pour les larves de Diptères	
Cry IA (a)	133Kda	Cry IIA	71Kda	Cry IIIA	73Kda	Cry IVA	134Kda
Cry IA (b)	131Kda	Cry IIB	71Kda	Cry IIIB	73Kda	Cry IVB	128Kda
Cry IA (c)	133Kda	Cry IIC	69Kda			Cry IVC	78Kda
Cry IB	138Kda					Cry IVD	72Kda
Cry IC	135Kda						
Cry ID	133Kda						
Cry IE	133Kda						
Cry IF	134Kda						

Rapport-Gratuit.com

2.3 Découverte de l'activité anti-cancéreuse de *Bacillus thuringiensis*

Dès les années 1970, Prasad et Shethna avaient effectué des recherches sur les effets antitumoraux des toxines de *Bt* [24-25]. Dans les années 1980 et 1990, de nombreuses études ont été menées sur l'effet de diverses toxines de *Bt* sur les cellules cancéreuses [26-27]. La plupart des travaux d'inauguration ont été lancés par Mizuki *et al.* en 1999 [28], où un criblage massif a été effectué sur un grand nombre de souches de *Bt* au Japon, 1 744 souches de *Bt* ont été étudiées pour leur activité cytotoxique contre des lymphocytes T de la leucémie humaine, ainsi que leur activité hémolytique contre des érythrocytes de mouton. Sur ces 1 744 souches, 1 684 souches étaient non hémolytiques et 42 souches démontraient une cytotoxicité *in vitro* contre des cellules T leucémiques. Ces souches appartiennent aux serovars dakota, neolensis, shangongiensis et coreanensis [28].

En l'an 2000, le mot « parasporine » a été d'abord utilisé par Mizuki *et al.* pour décrire une nouvelle protéine avec une activité cytotoxique [28]. Aujourd'hui, le mot « parasporine » est défini comme *Bacillus thuringiensis* et les protéines parasporales connexes qui sont non-hémolytique, mais capables de tuer préférentiellement les cellules cancéreuses. Depuis la découverte de Mizuki, d'autres parasporines ont été isolées, ces dernières afficheraient des propriétés anticancéreuses et non-hémolytiques. Par conséquent, l'immense réservoir de toxines *Bt* dans la nature demeure la cible d'une recherche constante, parce qu'ils représentent de bons candidats potentiels pour le traitement du cancer. En 2006, le comité de classification et de nomenclature des parasporines [29] a été organisé pour construire un système de classification taxonomique [29] (Tableau 2.2). Les parasporines sont divisées en six catégories principales, à savoir parasporine 1 (PS1), parasporine 2 (PS2), parasporine 3 (PS3), parasporine 4 (PS4), parasporine 5 (PS5) et parasporine 6 (PS6).

Tableau 2.2

Liste des parasporines (Committee of Parasporin Classification and Nomenclature 2006) [29]

Nom	Cry No	Acc No	Auteur et année	Souche
PS1Aa1	Cry31Aa1	AB031065	Mizuki *et al.* 2000	A1190
PS1Aa2	Cry31Aa2	AY081052	Jung et Côté., 2002	M15
PS1Aa3	Cry31Aa3	AB250922	Uemori *et al.* 2006	B195
PS1Aa4	Cry31Aa4	AB274826	Yasutake *et al.* 2006	*Bt* 79-25
PS1Aa5	Cry31Aa5	AB274827	Yasutake *et al.* 2006	*Bt* 92-10
PS1Aa6	Cry31Aa6	AB375062	Nagamatsu *et al.*, 2010	CP78A, M019
PS1Ab1	Cry31Ab1	AB250923	Uemori *et al.*, 2006	B195
PS1Ab2	Cry31Ab2	AB274825	Yasutake *et al.*, 2006	*Bt* 31-5
PS1Ac1	Cry31Ac1	AB276125	Yasutake *et al.*, 2006	*Bt* 87-29
PS1Ac2	Cry31Ac2	AB731600	Kuroda *et al.*, 2012	B0462
PS2Aa1	Cry46Aa1	AB099515	Ito et Kitada *al.*, 2004	A1547
PS2Aa2	Cry46Aa2	AB454419	Ishikawa *e al.*, 2008	A1470
PS2Ab1	Cry46Ab1	AB186914	Yamagiwa *et al.*, 2004	TK-E6
PS3Aa1	Cry41Aa1	AB116649	Yamashita *et al.*, 2005	A1462
PS3Ab1	Cry41Ab1	AB116651	Yamashita *et al.*, 2005	A1462
PS4Aa1	Cry45Aa1	AB180980	Okumura et Saitoh, 2004	A1470
PS5Aa1	Cry64Aa1	AB555650	Ekino et Shin, 2009	A1100
PS6Aa1	Cry63Aa1	AB375063	Nagamatsu *et al.*, 2010	CP84, M019

* Voir le site http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/index.html, pour les références.

2.4 Espèces du genre *Bacillus* à implication médicale

2.4.1 *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis est l'agent causal de la maladie de l'anthrax avec un taux élevé de mortalité associé aux infections de l'anthrax non traitées, spécifiquement le charbon pulmonaire qui est une forme particulièrement virulente de l'infection par le taux de

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

mortalité avoisinant les 100 %, même avec un traitement agressif [30]. *Bacillus anthracis* a attiré l'attention de la communauté au cours de ces dernières années, en raison de sa classification par le NIH comme agent bioterroriste [31]. Il appartient à la famille des *Bacillaceae*, c'est une bactérie gram positif, aérobie [32], qui sporule en réponse à un stress environnemental [33]. Cette virulence est en grande partie due à deux toxines [34] composées de trois protéines distinctes : l'antigène protecteur (PA), facteur œdématogène (EF) et le facteur létal (LF). Ces deux toxines agissent en synergie avec la capsule directement sur la virulence de la bactérie [35, 36].

La fièvre charbonneuse est une anthropozoonose, affectant les herbivores de pâturage qui rencontrent des spores dans le sol. Les humains contractent la maladie par contact du bétail infecté, principalement par des spores piégées dans le pelage ou la consommation de viande contaminée de l'animal [37].

Les manifestations cliniques de l'anthrax varient selon le mode d'infection. Il existe trois principaux modes d'infection : cutanées [38, 39] qui ont habituellement une évolution bénigne, cependant des formes graves avec œdème malin [40, 41] peuvent subvenir. La forme gastro-intestinale avec ulcération et œdème sévère du tractus gastro-intestinal [38, 39]. Et la forme pulmonaire par inhalation, qui est la plus grave avec un taux de mortalité de près de 90 % [42, 43].

Bacillus anthracis peut être observé dans le sang par la coloration de Gram et lors d'une hémoculture ordinaire, mais souvent dans les derniers stades de la maladie. Seuls les bacilles végétatifs encapsulés sont présents pendant l'infection [44]. Les spores ne peuvent être observées dans le sang, en partie parce que les niveaux de CO2 dans le corps préviennent la sporulation.

Actuellement, la pénicilline [45], la doxycycline et la ciprofloxacine [46] ont été approuvées par la FDA pour le traitement du charbon pulmonaire [45]. La résistance à la sulfaméthoxazole/triméthoprime (Bactrim), le céfuroxime, la céfotaxime sodique, l'aztréonam et ceftazidime a été démontrée [47]. Des études récentes ont montré que la

daptomycine [48], dalbavancine [49] et faropenem [50] sont efficace dans des modèles de souris, ouvrant la voie à une nouvelle évaluation clinique. Le schéma de traitement recommandé pour les cas de charbon pulmonaire comprend plusieurs antibiotiques dont au moins un des trois antibiotiques approuvés, avec une prise pendant 60 jours. Récemment, il a été démontré que la vaccination post-exposition peut raccourcir la durée du traitement d'antibiotiques [51].

La prévention du charbon chez l'homme et chez l'animal repose sur des mesures de lutte contre la maladie appliquées au bétail dans les régions d'endémie, notamment l'élimination sans risque des carcasses d'animaux charbonneux (par incinération ou enfouissement) et la vaccination des troupeaux à risque. Les conditions qui prévalent dans beaucoup de pays d'endémie font que ces mesures de lutte apparemment simples sont difficiles à mettre en œuvre [52].

Dans les pays industrialisés, la prévention repose sur des mesures prophylactiques rigoureuses dans les élevages et l'industrie. Après la découverte d'un cas de charbon dans un troupeau, il est de rigueur de surveiller et de vacciner l'ensemble du troupeau. On dispose en effet de vaccins efficaces destinés aux animaux. Par contre, les vaccins à usage humain sont réservés aux groupes à haut risque, tels ceux professionnellement exposés et certains personnels militaires. Le vaccin contre la fièvre charbonneuse chez l'animal est un vaccin sporulé, vivant [53] (Anthrax Spore Vaccine ® [54]).

En 1880, Auguste Chauveau, Greenfield et Henry Toussaint [55] ont mis au point les premiers vaccins contre le charbon, ces vaccins étaient à bactéries vivantes et capsulées. Dans ces années-là, le vaccin de Louis Pasteur [56] leur a été préféré grâce aux résultats globalement satisfaisants qu'il engendrait. Mais parfois, il restait suffisamment virulent pour provoquer la maladie qu'il était supposé prévenir. Dans d'autres cas, son effet s'affaiblissait au point ne pas déclencher de réponse immunitaire protectrice. Dans les années 1930, Nicolas Stamatin et Max Sterne ont synthétisé des vaccins plus opérants, en utilisant des souches bactériennes vivantes dépourvues de

capsules [57]. Le vaccin vivant de Sterne est efficient, mais agressif par sa réaction inflammatoire induite et devrait être réservé aux animaux [57].

Aux États-Unis, on utilise un vaccin non vivant dont le facteur immunogène principal est l'antigène protecteur PA. Ce vaccin est commercialisé sous le nom BioThrax® [58], il est adsorbé sur hydroxyde d'aluminium composé d'un filtrat produit à partir de la souche sterne, les cultures de bacilles croissent sur un milieu chimiquement défini comportant un mélange d'acides aminés, de vitamines, de sels inorganiques et de sucre. Le nom de ce milieu est : Puzizz-Right medium 1095 [59-60]. Plusieurs protéines du bacille se retrouvent dans le filtrat, trois d'entre eux sont antigéniques, l'antigène protecteur (PA), le facteur léthal (FL) et le facteur œdémateux (FO). Ces protéines prises individuellement ne sont pas toxiques, mais leur combinaison l'est. Cependant le principal antigène responsable de l'induction de la réponse immunitaire est l'antigène protecteur (PA). Ce vaccin est dénué de bactéries du charbon vivantes ou mortes [59-60].

2.4.2 *Bacillus* produisant des antibiotiques

La découverte de la tyrothricine par Dubos [61] en 1939 à partir d'une culture de *Bacillus brevis* fut le point de départ des recherches systématiques sur la production d'antibiotiques par les bactéries. De nombreuses souches particulièrement de germes sporulés, isolés de différents milieux, furent étudiées durant la décade qui suivit la découverte de cet antibiotique [61]. Le genre *Bacillus* produit environ 167 antibiotiques qui sont principalement des peptides [62]. Les antibiotiques peptidiques de *Bacillus* ont généralement un poids moléculaire compris entre 270 (bacilysine) et 4500 Da (lichenniformine), dont les plus utilisés : la polymixine active sur les bacilles Gram négatif comme *Pseudomonas* et *Escherichia coli* [63]. Vasanta *et al.* ont montré une relation entre la synthèse de polymixine et la sporulation du *Bacillus* [64]. Ils ont également isolé un mutant qui ne produit pas de polymixine et qui ne sporule pas. Également la bacitracine, extraite de cultures de *Bacillus subtilis* [65], utilisé pour le traitement des infections staphylococciques telles que les pneumonies, les emphysèmes, les plaies secondairement infectées, les ulcères, les pyodermites et les infections

superficielles de l'œil causées par des micro-organismes sensibles à la bacitracine [65]. Aussi, les butirosines synthétisés par *Bacillus circulans* [66]. Et la gramicidine produite par *Bacillus brevis* [67], qui fut le premier antibiotique naturel commercialisé [68], active contre les bactéries gram positif et négatif, en particulier *Neiseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et le *Candida albicans*, son mode d'action consiste en la formation de pores dans la membrane de la bactérie ciblée [69].

2.4.3 *Bacillus polyfermenticus*

Bacillus polyfermenticus (BP) est une bactérie probiotique, qui a été cliniquement utilisée pour une variété de troubles gastro-intestinaux en Asie de l'Est. L'effet de *BP* sur la croissance des tumeurs et son mécanisme d'action putatif ont été étudiés. *BP* inhibe la croissance des cellules du cancer du côlon humain y compris les cellules HT-29 et DLD-1, ces deux lignées sont dérivées de l'adénocarcinome colorectal et Caco-2 dérivé également d'une tumeur colorectale hétérogène. En outre, *BP* supprime la formation de colonies de cellules HT-29 cultivées sur gélose [70], les résultats démontrent une inhibition de l'activité anticancéreuse par la suppression d'ErbB2 et ErbB3. Dans l'ensemble, cette étude suggère que cette bactérie probiotique pourrait être utilisée cliniquement comme traitement prophylactique pour prévenir le développement du cancer du côlon.

2.4.4 *Bacillus cereus*

C'est une bactérie gram positif, aérobie, dont les cellules sont de grandes tiges, formant des spores. D'autres caractéristiques, y compris les caractéristiques biochimiques sont utilisés pour différencier et confirmer la présence de *Bacillus*, bien que ces caractéristiques sont partagées avec *Bacillus* var *cereus,* mycoides, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*. La différenciation de ces organismes dépend de la détermination de la motilité (le *B cereus* est plus mobile), de la présence de cristaux de toxines (pour le *B thuringiensis*) et de l'activité hémolytique (*B cereus* est hémolytique tandis que *B anthracis* est généralement non hémolytique) [71].

L'intoxication alimentaire au *Bacillus cereus* est de deux types : le type diarrhéique causé par une protéine de grand poids moléculaire, tandis que le type émétique est supposé être provoqué par un peptide de faible poids moléculaire, stable à la chaleur [71].

2.5 Les parasporines anti-cancéreuse de *Bacillus thuringiensis*

Les parasporines (PS) représentent une nouvelle classe fonctionnelle des protéines cristallines Cry, exprimées par le *Bacillus thuringiensis*. Elles sont non insecticides et non hémolytiques, mais cytocides contre diverses lignées cellulaires de cancers humains. Ces PS ont été classés en six familles : PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 et PS6, avec des différences marquées dans les spectres d'activité cytotoxique entre les six familles PS.

2.5.1 Mode d'action des parasporines

2.5.1.1 Parasporine 1 (PS1)

Plusieurs études sur l'effet anticancéreux de la PS1 ont été réalisées [72, 73, 74, 75]. Le mécanisme d'action de la PS1 produite par *Bt* A1190 (anciennement connu sous le nom 84-HS-111) a été bien élucidé dans une étude réalisée par Katayama *et al.* [73]. La protéine existe comme Pro-PS1 de 81 kDa, lors de son activation la PS1 devient un hétérodimère de 15 kDa et 56 kDa. Dans leur étude, Katayama e*t al.* se sont penchés sur l'effet exercé par la protéine sur la perméabilité de la membrane, sur l'homéostasie du calcium et du mode de mort cellulaire. Plusieurs résultats ont été conclus sur PS1 : elle provoquerait une augmentation des afflux de Ca2+, elle n'est pas une toxine porogène et le mode de mort cellulaire induit serait plus probablement par apoptose.

2.5.1.2 Parasporine 2 (PS2)

Le mode d'action de la PS2 a largement été exploré [7-76]. Dans une étude réalisée par Kitada *et al.* sur PS2A1 produite par *Bt* A1547 [26] (anciennement connu sous le

nom 94-F-45-14), la protéine a été hautement cytotoxique pour les lignées cellulaires MOLT-4 (cellules leucémiques), Jurkat (lymphocytes T du lymphome), Sawano (cellules de l'adénocarcinome endométriales), HepG2 (cellules de l'hépatocarcinomes), MCF-7 (cellules tumorales mammaires), PC-3 (cellules du cancer de la prostate) et non cytotoxique pour les lignées non cancéreuses HC (chondrocytes humains), HIESC et HIEEC (cellules stromales et épithéliales de l'endomètre). L'activité cytotoxique a été associée à une portion de parasporine ayant une masse moléculaire de 30 kDa. En l'absence de digestion par la protéase, les protéines de l'inclusion cristalline comme les toxines Cry ne présentaient aucune activité cytocide [7].

Contrairement à PS1, la PS2 a été révélée pour être une toxine formant des pores qui provoque l'augmentation de la perméabilité des cellules sensibles. Kitada *et al.* ont également démontré que le mode de mort cellulaire était probablement non apoptotique contrairement à PS1. Les cellules gonflent et commencent à se détacher autour de la 4e heure après l'administration de la toxine (PS2), ensuite il y a éclatement et fragmentation des cellules menant à la mort cellulaire dans les vingt heures suivant le traitement. Aucun changement morphologique n'a été observé dans les cellules résistantes [7]. Les observations morphologiques suggèrent que l'effet cytotoxique de la parasporine est non-apoptotique, l'activation de la caspase 3 et 7 (enzymes induisant l'apoptose) a été nulle après l'administration d'une forte dose de parasporine PS2Aa1. Avec des concentrations élevées de la parasporine, les cellules sont mortes avant même que le processus apoptotique n'ait commencé [7], ces résultats indiquent que l'effet cytocide de la toxine parasporale est essentiellement non-apoptotique. Il a également été constaté que la PS2 est distribuée à la périphérie de la cellule [7]. Ce résultat correspond à celui de Wong *et al.*, qui ont démontré que la protéine parasporal isolée de Bt 18 se lie également à un site de liaison sur la surface cellulaire, ce qui suggère la possibilité d'un récepteur spécifique [77]. D'autres investigations suggèrent que la PS2 lierait un récepteur putatif situé dans les radeaux lipidiques, ce qui entrainerait l'oligomérisation et la formation de pores dans la membrane plasmique [78] et des altérations morphologiques remarquables qui sont : bourgeonnement de la cellule, altérations des mitochondries, du cytosquelette ainsi que la fragmentation du réticulum endoplasmique.

La perméabilité de la membrane plasmique augmente immédiatement après le traitement par la toxine [79]. Les résultats observés lors d'une autre étude de Brasseur et *al* (2015) [8] portant sur le mode d'action de la PS2Aa1 exprimé par *Bt* 4R2 sont en contradiction avec l'étude d'Ito et *al.* (2004) [7]. L'ensemble des expériences réalisées par Brasseur et *al.* (2015) confirme l'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses et non chez les cellules normales [8]. Dans leur étude, une activation des protéines de l'apoptose soit la caspase-3, la caspase-8 et RAPP (Figure 1.1) a été observée, ainsi qu'un rétrécissement des cellules qui est une caractéristique spécifique de l'apoptose [8]. Brasseur et *al* ont testé certaines voies de signalisation, parmi elles la protéine kinase B (AKT) et les protéines XIAP, ces protéines sont connues pour inhiber l'apoptose. La forme active de ces deux protéines diminuait en fonction du temps après traitement par la PS2Aa1, ce qui suggère également une induction d'apoptose par la parasporine [8].

2.5.1.3 Parasporine 3, 4, 5 et 6 (PS 3, 4, 5, 6)

Comparant à PS1 et PS2, la littérature sur PS3 [80], PS4 [81-82], PS5 et PS6 [83] sont rares. La PS3 a été pensée pour être une toxine formant des pores ce qui augmenterait la perméabilité membranaire des cellules cancéreuses [80]. Afin de déterminer si la PS4 induit des dommages au niveau de la membrane plasmique, l'efflux de LDH cytoplasmique et l'afflux des molécules extracellulaires ont été analysés [84], diverses concentrations de PS4 ont été administrées aux cellules Caco-2 (tumeur colorectal hétérogène) et Molt-4 (cellules T leucémiques) sensibles à la toxine, ainsi qu'aux cellules HeLa (cancer du col) résistantes à PS4. Les cellules étaient incubées à 37 °C et les fuites de LDH dans le milieu extérieur ont été déterminées. La fuite à partir des cellules Caco-2 et Molt-4 a augmenté avec l'augmentation de la concentration de PS4, tandis que la fuite à partir des cellules HeLa a été rarement observée même aux plus hautes concentrations de PS4. Il a été conclu que la PS4 induit également la formation de pores dans la membrane, ayant pour conséquence la libération de LDH des cellules cancéreuses [84]. La recherche d'homologie par PSI-BLAST pour la parasporine5 (PS5) exprimée par le *Bacillus thuringiensis* A1100 [85] a démontré que la

protéine présente une légère homologie avec certaines protéines Cry, mais aussi avec les toxines aérolysines β-porogène (β-PFT) [85]. Il a été spéculé que PS6 pourrait être aussi une protéine porogène [83]. La PS6 exprimée par la souche *Bt* M019 a une activité anticancéreuse contre les cellules du cancer du col et du foie.

2.5.2 Activation des parasporines

Différentes méthodes d'extraction des parasporine de *Bacillus thuringiensis* ont été étudiées par les chercheurs. Eric Gonzalez et al ont récupéré la PS par solubilisation alcaline des protéines du cristal [86]. Une autre méthode est le système de séparation à deux phases [87] qui a été utilisé pour l'obtention des protéines cristallines à partir de *Bt* souche A1547 [88]. Dans certaines études, le gène de la parasporine a été cloné dans un vecteur, par exemple le gène codant pour la protéine Cry 31Aa2 a été cloné dans un plasmide recombinant pYCP31A2 [89]. De même pour le gène pro PS4, qui a été transféré par un plasmide dans *Escherichia coli* BL21 [88], pour ensuite étudier le mode d'action de la parasporine 4 [88].

Une étude a démontré que la protéinase K et la trypsine sont efficaces pour l'activation de la toxine de *Bacillus thuringiensis* souche 84-HS-11-1 [80], alors que le traitement de la toxine par la chymotrypsine ne produisait pas une protéine cytotoxique [80]. La protéine recombinante PS5 exprimé dans un précurseur n'est active qu'après traitement par la protéinase K [86]. Un isolat de *Bacillus thuringiensis* 89-T-34-22 appartenant au sérovar shandongiensis (H22) produit des protéines non insecticides, ces protéines présenteraient une cytotoxicité in vitro pour les cellules cancéreuses seulement lorsqu'elles ont été activées par la protéinase K. La toxicité de PS2Aa1 extraite de *Bt* 4R2 envers les cellules cancéreuses a été étudiée après clivage par la protéinase K et après clivage par la trypsine [8]. Les résultats obtenus démontrent que la PS2Aa1 est cytotoxique après traitement par la protéinase k, mais demeure inactive après traitement par la trypsine [8].

Rapport-Gratuit.com

2.6 Milieux pharmaceutiques utilisés pour la production des vaccins

Un vaccin est une substance destinée à stimuler le système immunitaire en créant une réponse immunitaire spécifique. Il doit être suffisamment antigénique, c'est-à-dire capable de provoquer la production d'anticorps en quantité suffisante pour protéger l'organisme de la maladie. Il existe plusieurs types de vaccins :

Les vaccins issus d'agents infectieux inactivés : après multiplication des agents infectieux en grand nombre, leurs identifications et leurs isolements. Ils seront détruits, tout en conservant leur propriété d'induire une réponse immunitaire de type humorale avec la production d'anticorps. C'est un vaccin très stable même en absence de réfrigération, mais nécessite plusieurs rappels [90].

Les vaccins issus d'agents infectieux atténués : pour créer ces vaccins, les agents virulents sont développés dans des conditions hostiles, ou passés dans différents hôtes, jusqu'à l'obtention de souches non virulentes. Ces souches conservent leurs antigènes et leurs capacités à provoquer des réponses immunitaires, cependant ces vaccins sont contre-indiqués chez les personnes immunodéprimées et les femmes enceintes. Généralement un seul rappel est nécessaire, ce vaccin induira une immunité de type humorale et cellulaire, par l'intermédiaire des anticorps et des lymphocytes T respectivement [90].

Les vaccins constitués d'anatoxines : comme les toxines sécrétées par le bacille tétanique et par le bacille diphtérique. Ces toxines sont généralement traitées par la chaleur et le formaldéhyde, elles perdent ainsi leur pouvoir infectant, mais restent antigéniques. Elles sont appelées anatoxines et servent à la préparation des vaccins antitétaniques et antidiphtériques [91].

Les vaccins synthétiques : les vaccins contre les papillomavirus et les virus de l'hépatite B en sont un exemple. Ils sont constitués de molécules de surface (protéines) obtenues à partir de ces agents infectieux, puis reproduits par génie génétique pour une production en grande quantité. Ces protéines de surface induiront une réponse

immunitaire sans avoir à introduire le virus [90]. La quantité d'anticorps développée suite à une vaccination n'est pas fixe. Elle dépend du système immunitaire de la personne vaccinée, elle peut être très élevée, moyenne ou nulle [91].

Tout vaccin a pour base des agents infectieux, ceux-ci sont soit des bactéries soit des virus. Pour la fabrication des vaccins les agents infectieux sont reproduits en grande quantité de façon artificielle en laboratoire. Ils sont le plus souvent cultivés sur des milieux nutritifs spécifiques contenant généralement des minéraux, des sucres, des acides aminés et des vitamines. Il existe différents milieux de culture employés pour la production des vaccins. On prêtera une attention particulière aux milieux ci-dessous, car ces derniers ont fait l'objet de l'étude de notre projet de recherche :

- Le vaccin adsorbé contre l'anthrax destiné à l'homme (BioThrax®) [58] est un vaccin non vivant dont le facteur immunogène principal est l'antigène protecteur PA. Il est adsorbé sur hydroxyde d'aluminium, composé d'un filtrat produit à partir de la souche sterne. Le milieu de croissance utilisé pour la culture de ces bacilles est un milieu chimiquement défini composé d'un mélange d'acides aminés, de vitamines, de sels inorganiques et de sucre. Le nom de ce milieu est : Puzizz-Right medium 1095 [59-60] (Tableau 4.2). En 1961, Wright et Milton Puziss ont étudié les effets de la variation des conditions et des constituants des milieux de culture sur l'élaboration de l'antigène protecteur PA par le *Bacillus anthracis* [59]. Il a été conclu que l'élaboration de cet antigène était considérablement plus élevée dans le milieu Puzzi Right 1095 comparativement aux autres milieux employés.

- Le vaccin sporulé contre l'anthrax destiné à l'animal (Anthrax Spore Vaccine ®) [54] est un vaccin vivant. Des milieux de culture solides sont utilisés pour produire ce vaccin, deux types de milieux sont ainsi utilisés : la gélose nutritive et la gélose aux peptones trypsiques de caséine. La production de spores sur gélose nutritive est satisfaisante, mais elle est comparativement plus faible que celle obtenue sur gélose aux peptones trypsiques de caséine. Le vaccin obtenu à partir de ce milieu présente toute garantie d'innocuité et le rendement en spores

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

en est très élevé. Ce milieu est par ailleurs recommandé par l'OMS dans son rapport sur les normes relatives au vaccin anti-charbonneux sporulé [53]. Les peptones trypsiques de caséine constituent le principal composant de ce dernier milieu de culture. Il s'agit d'un milieu tamponné, dans lequel les sels ont été ajoutés pour provoquer la sporulation (Tableau 4.3).

- Le vaccin bilié Calmett Guérin (BCG VACCINE ®) [92] provient de la culture de la souche Connaught du bacille Calmette Guérin, une souche atténuée du *Mycobactérium bovis* en suspension dans du glutamate monosodique. Les cultures de BCG sont étalées sur le milieu de croissance Sauton, récoltées, mélangées avec du glutamate monosodique et lyophilisées. Le milieu de croissance Sauton contient de la glycérine, de l'aspargine, de l'acide citrique, du phosphate de potassium, du sulfate de magnésium et du citrate d'ammonium [93].

CHAPITRE III

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

3.1 Problématique, hypothèses du projet de recherche

Bacillus thuringiensis a été le premier micro-organisme homologué dans le monde comme bio-pesticide, c'est le micro-organisme le plus utilisé dans la lutte biologique. L'activité entomopathogène de *Bacillus thuringiensis* est liée à la présence d'une inclusion parasporale (cristal), contenant les protéines Cry. Des recherches sur les effets antitumoraux des toxines de *Bacillus thuringiensis* ont démontré l'existence d'une nouvelle classe de protéines cristallines Cry, ces protéines sont nommées parasporines (PS). Elles sont non insecticides et non hémolytiques, mais cytocides envers diverses lignées cellulaires de cancers humains. L'une d'entre elles est la parasporine PS2Aa1 (Cry 46Aa1) exprimée par *Bacillus thuringiensis* 4R2. Une fois activée par la protéinase K, la PS2Aa1 est cytotoxique in vitro pour le cancer du foie, du sein, de l'utérus, de la prostate, du colon et non cytotoxique pour les lignées cellulaires normales notamment les cellules épithéliales ovariennes, les cellules épithéliales et stromales de l'endomètre.

Afin d'envisage que la PS2Aa1 soit candidate pour la synthèse d'un médicament anti-cancéreux, il est indispensable qu'elle réponde à des exigences pharmaceutiques, dont principalement la pureté. C'est pourquoi ce projet de recherche doit démontrer que *Bacillus thuringiensis* 4R2 peut déjà croitre dans des milieux de grade pharmaceutique, qu'il peut produire la PS2Aa1 dans ces milieux et surtout que la PS2Aa1 peut conserver son activité cytocide envers les cellules cancéreuses lorsqu'elle est produite dans ces milieux pharmaceutiques. Pour la sélection de ces milieux, les hypothèses suivantes ont été émises :

- Il est plausible que l'utilisation des milieux de production des vaccins soit le procédé le plus efficace pour y aboutir. Étant donné que tout vaccin a pour base

des agents infectieux, ceux-ci sont soit des bactéries soit des virus. Ces agents infectieux sont reproduits en grande quantité de façon artificielle en laboratoire. Ils sont le plus souvent cultivés sur des milieux nutritifs spécifiques contenant généralement des minéraux, des sucres, des acides aminés et des vitamines.

- Les milieux de production des vaccins extraits du genre *Bacillus* seraient de bons candidats étant donné la même appartenance taxonomique. C'est pourquoi les milieux de production du vaccin de l'anthrax [53-60] procurant une immunité contre la fièvre charbonneuse ou l'anthrax causé par *Bacillus anthracis*, pourraient faciliter la croissance, la sporulation et la formation du cristal de *Bacillus thuringiensis* 4R2, en raison de la taxonomie partagée entre *Bacillus anthracis* (agent causal de l'anthrax) et *Bacillus thuringiensis*. Pour mieux clarifier, il existe deux types de vaccins pour prévenir l'anthrax : le premier est un vaccin non vivant dont le facteur immunogène principal est l'antigène protecteur PA, commercialisé sous le nom BioThrax® [58], les cultures de bacilles croissent sur un milieu chimiquement défini nommé Puzizz-Right medium 1095. Le deuxième est un vaccin sporulé, vivant commercialisé sous le nom Anthrax Spore Vaccine ® [54], contenant les spores de *Bacillus anthracis,* ceux-ci sont cultivés sur différents milieux de culture dont le plus pertinent est le milieu gélosé aux peptones de caséine [53].

- Le milieu de production du vaccin BCG (bilié Calmett Guérin) contenant *mycobactérium bovis* pourrait répondre par ses composants aux exigences de la croissance de *Bacillus thuringiensis* 4R2. Ce vaccin est utilisé pour la prévention de la tuberculose depuis 1921, et également pour le traitement du carcinome in situ de la vessie depuis quelques années [4-5]. Dans la mesure où le milieu de production du vaccin BCG est assez propice pour la culture d'une bactérie à usage oncologique, il pourrait donc probablement supporter la culture de *Bacillus thuringiensis* 4R2 qui produit une protéine anti-cancéreuse.

3.2 Objectifs du projet de recherche

Les objectifs à court terme de ce projet de recherche seront de démontrer que *Bacillus thuringiens* 4R2 peut croitre dans les milieux de grade pharmaceutique sélectionnés dans ce travail. Ces milieux sont les milieux de productions du vaccin de l'anthrax soit le milieu gélosé aux peptones de caséine et le milieu Puziss Right 1095, ainsi que le milieu de production du vaccin bilié Calmett Guérin (BCG) nommé le milieu de croissance Sauton. Pour ce faire, il faudra en premier lieu déterminer la croissance et la sporulation de *Bt* 4R2 ainsi que le rendement en protéines dans ces milieux pharmaceutiques. Le second objectif sera d'analyser les protéines de l'inclusion cristalline de *Bt* 4R2 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurysulfate de sodium (SDS-PAGE) pour identifier la présence de la parasporine PS2Aa1. Finalement le milieu avec le meilleur rendement en protéines et dans lequel la présence de la parasporine PS2Aa1 a été identifiée sera sélectionné pour le test d'activité cytotoxique de la parasporine envers la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie). La lignée cellulaire HepG2 a été utilisée dans ce projet à cause de sa forte sensibilité à la PS2Aa1.

CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée dans cette étude est le *Bacillus thuringiensis* 4R2 sérovar Dakota, obtenu du *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University USA). Elle a été repiquée sur gélose tryptic soy agar (TSA), incubée pendant 24 h à 30 °C puis conservée à 4 °C jusqu'à son utilisation. Cette souche exprime la parasporine PS2Aa1 (Cry46Aa1) qui est cytotoxique pour les lignées cellulaires cancéreuses HepG2 (carcinome hépatocellulaire), MCF-7 et MDA-MB231 (adénocarcinomes mammaires), KLE et Hec-Ia (adénocarcinomes utérins), PC-3 (cancer de la prostate) [8].

4.2 Milieux de culture

4.2.1 Milieu de culture synthétique (milieu témoin)

Le milieu synthétique utilisé est un milieu commercial prêt à l'emploi : le bouillon de soja tryptique. Les constituants de ce milieu sont représentés dans le tableau 4.1. Le pH du milieu est ajusté à 7.2 ± 0.2 avant stérilisation à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Ce milieu représente notre milieu témoin.

Tableau 4.1

Constituants du milieu de culture synthétique TSB

Ingrédients	g/L
Tryptone	17
Phytone	03
NaCl	05
K_2HPO_4	2,5

4.2.2 Milieux de culture liquide de grade pharmaceutique

Nous avons utilisé :

1) Le milieu de production du vaccin sporulé contre l'anthrax animal : est un milieu gélosé aux peptones de caséines, auquel nous avons supprimé la gélose pour le transformer en un milieu de culture liquide;

2) Le milieu de production du vaccin adsorbé contre l'anthrax humain est le Puziss Right medium 1095 et

3) Le milieu de croissance Sauton utilisé pour la production du vaccin du BCG (Bilié Calmett Guérin).

Ces trois milieux ont été employés comme des milieux de culture liquides pharmaceutiques dans ce projet de recherche. Leurs pH a été ajusté à 7.2 ± 0.2, et ceux-ci ont été ensuite stérilisés à 121 °C pendant 15 minutes. Les tableaux 4.2, 4.3 et 4.4 représentent les ingrédients contenus dans chaque milieu. Après mélange des ingrédients pour la préparation des milieux et avant le démarrage de la culture, un échantillon a été prélevé pour chaque milieu afin de déterminer la concentration en protéines par la méthode de Bradford [94]. Les résultats ont démontré que les protéines étaient indétectables dans ces échantillons témoins.

4.2.3 Milieu de culture solide

Le milieu de production du vaccin de l'anthrax animal; soit le milieu gélosé aux peptones de caséines a été utilisé pour la culture du *Bacillus thuringiensis* 4R2.

4.3 Inoculum et conditions de culture

Pour la préparation des quatre inoculums : trois colonies de *Bt* 4R2 ont été inoculées dans chaque fiole Erlenmeyer de 500 mL. Chaque fiole contenait 100 mL de l'un des trois milieux de culture liquides pharmaceutiques (milieu de production du

vaccin sporulé, milieu Puziss Right 1095, milieu de croissance Sauton) et la quatrième contenait 100 mL du milieu synthétique TSB (représentant notre contrôle positif). Les fioles ont été placées dans un incubateur-agitateur à 300 rpm et à 30 °C pendant 18 heures. Nous avons ensuite procédé à la culture en transférant 5 mL (2 % v/v) de chacun des inoculums dans quatre fioles Erlenmeyer de 2000 mL, chaque fiole contenait 250 ml de chaque milieu de culture liquide. Ensuite les fioles ont été incubées aux mêmes conditions de culture que les inoculums, mais pendant 96 h. Les échantillonnages ont été effectués à 00 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h et 96 h de la culture.

Pour la culture solide, à l'aide d'une anse d'inoculation trois colonies de *Bt* 4R2 ont été étalées sur la gélose aux peptones de caséines et incubées jusqu'à la sporulation (soit entre 3 et 4 jours de culture). Après la sporulation, 1,5 mL d'eau a été ajouté aux plats et les bactéries ont été libérées par frottement avec un râteau, ensuite la suspension bactérienne a été transférée dans un tube eppendorf. Cette suspension bactérienne a servi pour la détermination de la concentration totale des protéines, ainsi que pour la préparation et l'activation de la parasporine PS2Aa1.

Tableau 4.2

Constituants du milieu gélosé aux peptones de caséine [53]

Ingrédients	g/L
Peptones trypsiques de caséine	50
Extrait de levure	10
Chlorure de calcium	0,1
Sulfate ferreux	0,01
Sulfate de magnésium	0,05
Sulfate de manganèse	0,03
Hydrogénophosphate de potassium	5
Dihydrogénophosphate de potassium	1
Gélose	22

Tableau 4.3

Constituants du Puziss Right medium 1095 [60]

Ingrédients	g/L	Ingrédients	g/L
Glycine	0,022	DL-Méthionine	0,030
L-Histidine – HCI	0,096	Calcium chloride-2H20	0,015
L-Alanine	0,009	DL-Aspartic acid	0,064
Guanine * HCI	0,009	Magnésium sulfate-7H20	0,010
DL-Valine	0,060	L-Glutamic acid	0,168
Adénosine	0,001	Sulfate de manganèse-H20	0,004
DL-Leucine	0,128	L-Proline	0,003
Thiamine* HCI	0,0004	Potassium dihydrogène phosphate	0,068
DL-Isoleucine	0,064	DL-Phénylalanine	0,068
Pyridoxal HCl	0,001	Dipotassium hydrogène phosphate	0,870
DL-Sérine	0,021	L-Tryptophane	0,010
Biotine	0,0004	Sodium bicarbonate	2,500
DL-Thréonine	0,060	L-Arginine HCl	0,021
Glucose	1,0	Sulfate ferreux	0,0015

Tableau 4.4

Constituants du milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG) [93]

Ingrédients	g/L
K_2HPO_4	0,5 gr
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,5 gr
Acide citrique	2 gr
Citrate ferreux d'ammonium	0,05 gr
Asparagine	4 gr
Glycérol	60 mL

4.4 Analyse des échantillons

Pour chaque échantillon, un dénombrement des cellules et des spores viables a été effectué par la technique d'étalement sur gélose [95]. Dans une solution stérile de NaCl 0,85 %, des dilutions successives des échantillons ont été effectuées. Les trois dernières

Rapport-Gratuit.com

dilutions ont été étalées en triplicata sur des géloses TSA, ensuite les plats de Pétri ont été incubés à 30°C pendant 24 h dans une étuve. Pour le compte de spores, les dilutions des échantillons ont été soumises à un traitement à la chaleur de 80 °C dans un bain-marie pendant 15 minutes avant d'être étalées. Le dénombrement des unités formatrices de colonies (UFC) est effectué sur les boîtes de Pétri contenant 30-300 colonies (>1 mm). Les comptes sont rapportés en UFC par mL. Nous avons évalué l'erreur de la méthode d'étalement à 8 % pour les comptes de cellules et de spores.

Les échantillons ont également été analysés pour la détermination de la concentration totale des protéines. Pour ce faire, 1.5 mL de chaque échantillon (prélevé des milieux liquides et solide) a été centrifugé pendant 90 secs à 14000 rpm. Le culot contenant les bactéries sporulées, les cristaux protéiques et les débris cellulaires a été resuspendu dans 480 µL (56 mM Na2CO3 +11 mM DTT), pendant une heure à 37 °C. Ensuite une deuxième centrifugation a permis de récupérer les protéines contenues dans le surnageant qui ont servi à trois tests :

1) Détérminer la concentration des protéines par la méthode de Bradford [94];

2) L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) [96] et

3) Test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie).

Pour l'activation de la toxine (parasporine) *Bt* 4R2 : les protéines du surnageant ont été filtrées puis traitées avec 100 µg/mL de protéinase K pendant 1 h à 37 °C, suivi d'un traitement au phenymethysulfonyl fluoride -PMSF- (concentration finale à 1 mM) pour inhiber la réaction de protéolyse.

4.5 Séparation des protéines de l'inclusion cristalline par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de laurysulfate de sodium (SDS-PAGE)

Suite à la détermination de la concentration totale des protéines, quatre échantillons ont été sélectionnés pour l'identification de la PS2Aa1 de 37 kDa par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de laurysulfate de sodium

(SDS-PAGE) [96]. Les échantillons sélectionnés sont ceux avec la concentration de protéines la plus élevée parmi les échantillons prélevés des milieux de cultures liquides, qui sont : le milieu synthétique (TSB), le milieu liquide aux peptones de caséines et le milieu de croissance Sauton. Le quatrième échantillon quant à lui a été prélevé à partir du milieu gélosé aux peptones de caséine.

4.6 Culture cellulaire et test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie)

En se basant sur sa forte sensibilité à la PS2Aa1, la lignée cellulaire HepG2 (dérivée du carcinome hépatocellulaire humain) a été sélectionnée pour le test de cytotoxicité. La parasporine a été extraite de la culture de *Bacillus thuringiensis* 4R2 dans le milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax (milieu gélosé aux peptones de caséine). La lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie) a été maintenue en culture dans le milieu RPMI 1640 contenant 10 % de FBS (fetal bovine serum) et 50 µg/mL de gentamycine à 37 °C avec 5 % CO_2. Sur une plaque de 96 puits contenant le milieu de culture, les cellules ont été étalées pour le test de cytotoxicité et incubées pendant 24 h aux mêmes conditions de culture. Après traitement par la toxine de *Bt* 4R2, la viabilité des cellules a été mesurée par le test MTT (technique de numération des cellules vivantes, le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT) [97]. Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de 0 à 20 µg/mL de toxine (parasporine) de *Bt* 4R2 fraichement extraite et activée par la protéinase K puis incubées pendant 24 h. Ensuite, 10 µL de MTT (4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) (5 mg/mL) a été ajouté aux puits [96]. Quatre heures plus tard, 100 µL de solution solubilisé (10 % de sodium dodecyl sulfate -SDS- dans 0,01 M HCL) a été ajoutée dans les puits, puis incubée jusqu'au lendemain à 37 °C avec 5 % CO2. La densité optique a été mesurée à 565 nm en utilisant le Fluostar optima BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC, É.-U.). Les lectures obtenues à partir des cellules traitées avec la toxine (parasporine) de *Bt* 4R2 ont été comparées aux mesures prises pour les cellules contrôles. Ces cellules contrôles ont été traitées seulement avec la solution tampon contenant 10 µL de MTT, 100 µL (10 % SDS dans 0,01 M HCL) et 0 µg/mL de la toxine de *Bt* 4R2.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1 Analyse des échantillons : décompte des cellules, des spores et détermination de la concentration totale des protéines

Le nombre de cellules, de spores et la concentration totale des protéines représentées sur les figures se trouvent sous forme de tableaux en annexe. Pour les comptes de cellules et de spores, l'erreur de la méthode d'étalement est de 8 %. Ce pourcentage est représenté sur les graphiques de croissances (cellules totales) et de sporulation (spores totales). Pour les concentrations de protéines, les écarts types sont différents pour chaque heure d'échantillonnage, ils sont représentés en barres d'erreurs sur les figures et en chiffres dans les tableaux en annexe.

Les résultats de croissances, de sporulation et de production de protéines ont varié selon le milieu et le type de culture employé. Nous avons comparé tous les résultats obtenus dans les milieux pharmaceutiques à ceux obtenus dans le milieu témoin TSB (Tryptic Soy Broth).

5.1.1 Milieu synthétique TSB (milieu témoin)

Le premier graphique (Figure 5.1) représente les résultats de croissance et de sporulation obtenus dans ce milieu. La première courbe exprime le nombre de cellules en UFC/mL en fonction de l'heure d'échantillonnage. On a constaté que la croissance exponentielle s'est effectuée entre le début de la culture et la 12e heure, suivie d'une phase stationnaire où le nombre total de cellules a varié entre 10^8 et 10^9. La deuxième courbe de ce même graphique (Figure 5.1) représente le nombre de spores résultant de la transformation des cellules après appauvrissement du milieu de culture en nutriments. Sur le deuxième graphique (Figure 5.2), la concentration totale des protéines produites

dans le milieu synthétique a été exprimée en µg/mL. Le taux maximal a été enregistré à la 24e heure, celui-ci est resté plus au moins stationnaire jusqu'à la 36e heure, ensuite les concentrations ont décliné (Figure 5.2). Cette baisse de la synthèse des protéines pourrait s'expliquer par la diminution et l'épuisement des nutriments essentiels dans le milieu de culture.

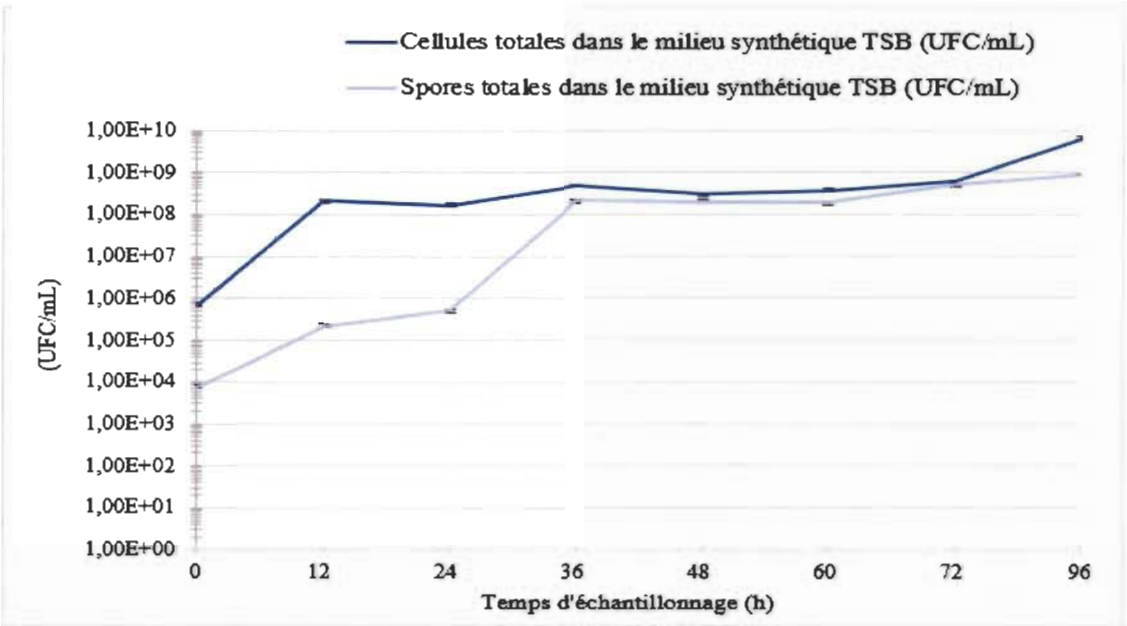

Figure 5.1 Décompte des cellules et des spores de *Bt* 4R2 dans le milieu synthétique TSB (Tryptic Soy Broth).

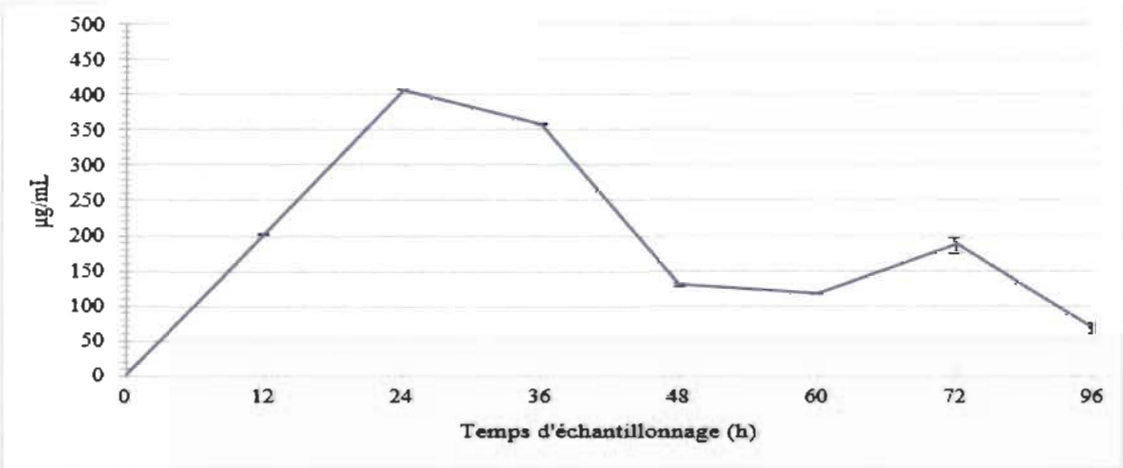

Figure 5.2 Concentration totale des protéines dans le milieu synthétique TSB (Tryptic Soy Broth).

5.1.2 Milieu de production du vaccin sporulé contre l'anthrax

5.1.2.1 Milieu liquide aux peptones de caséine

La culture dans ce milieu a été effectuée à deux reprises, en respectant la même composition des milieux dans les deux essais; néanmoins, dans le deuxième essai nous avons effectué des échantillonnages supplémentaires à la 48e, 72e et 96e heures.

Dans les deux essais, la croissance exponentielle s'est prolongée jusqu'à la 24e heure (Figure 5.3). Nous avons obtenu des comptes de cellules maximum entre 10^{8} et 10^{9}. Quant à la production de protéines, les taux étaient également au maximum à la 24e heure de culture, avec une concentration de 972 µg/mL au premier essai et 815,1 µg/mL au deuxième essai (Figure 5.4).

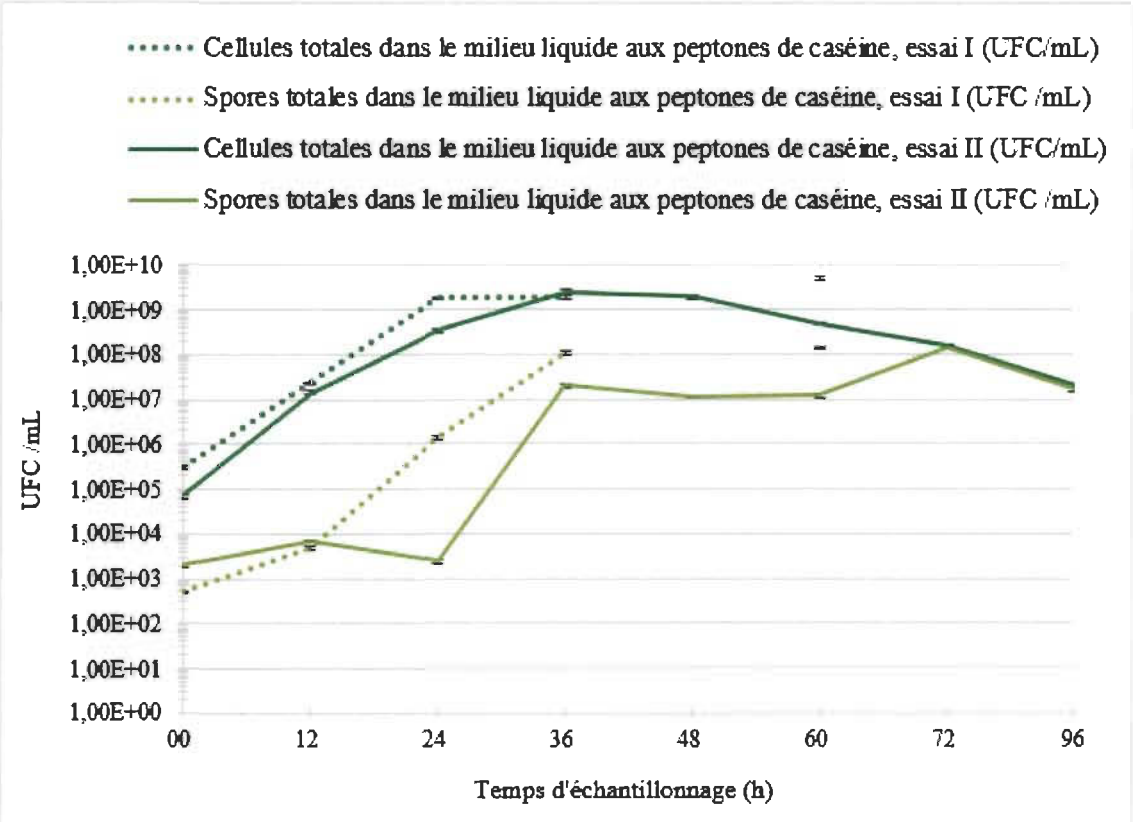

Figure 5.3 Décompte des cellules et des spores de *Bt* 4R2 dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essais I et II).

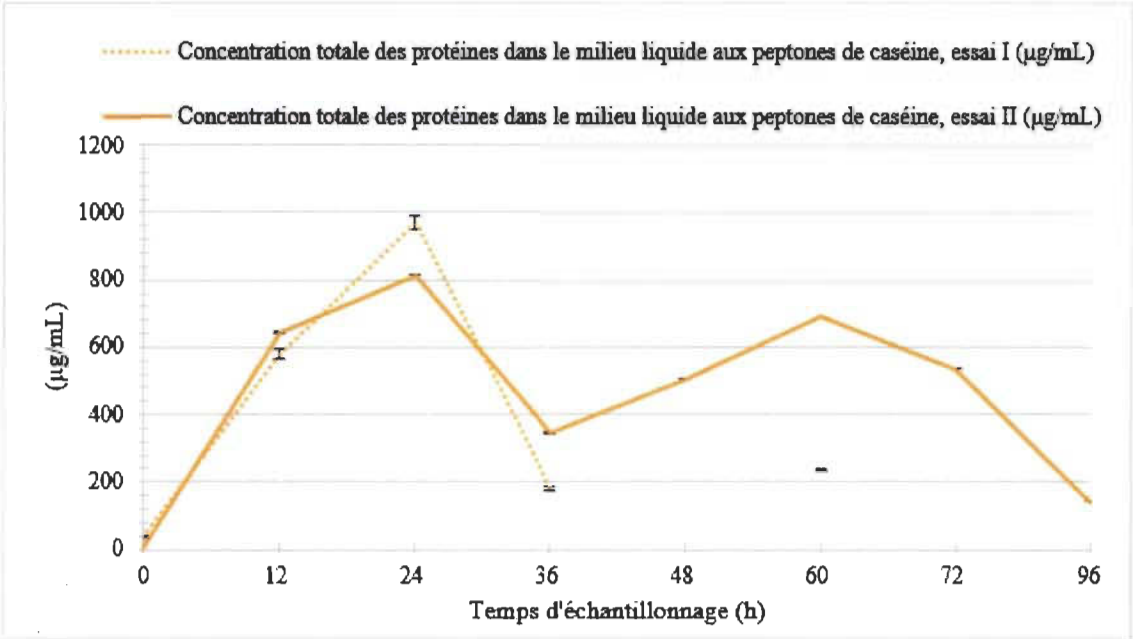

Figure 5.4 Concentration totale des protéines dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essais I et II).

En comparant les résultats obtenus dans ce milieu pharmaceutique à ceux du milieu témoin Tryptic Soy Broth (TSB), on constate que la croissance exponentielle était relativement plus longue, puisqu'elle s'est prolongée jusqu'à la 24e heure contrairement au milieu témoin où elle s'est arrêtée à la 12e heure (Figure 5.5). Les taux de spores formées étaient plus bas dans le milieu liquide aux peptones de caséine comparativement au milieu synthétique TSB (Figure 5.6). Le rendement en protéines était deux fois plus élevé dans le milieu liquide aux peptones de caséine (Figure 5.7).

Dans le milieu liquide aux peptones de caséine et le milieu témoin TSB, la culture de *Bacillus thuringiensis* 4R2 s'est effectuée dans les mêmes conditions physiques de croissances soit la même température, la même vitesse d'agitation et la même durée de culture, hormis les constituants des deux milieux qui sont différents et il semblerait que les constituants du milieu liquide aux peptones de caséine soient plus favorables au métabolisme, à la nutrition et au développement de *Bacillus thuringiensis* 4R2.

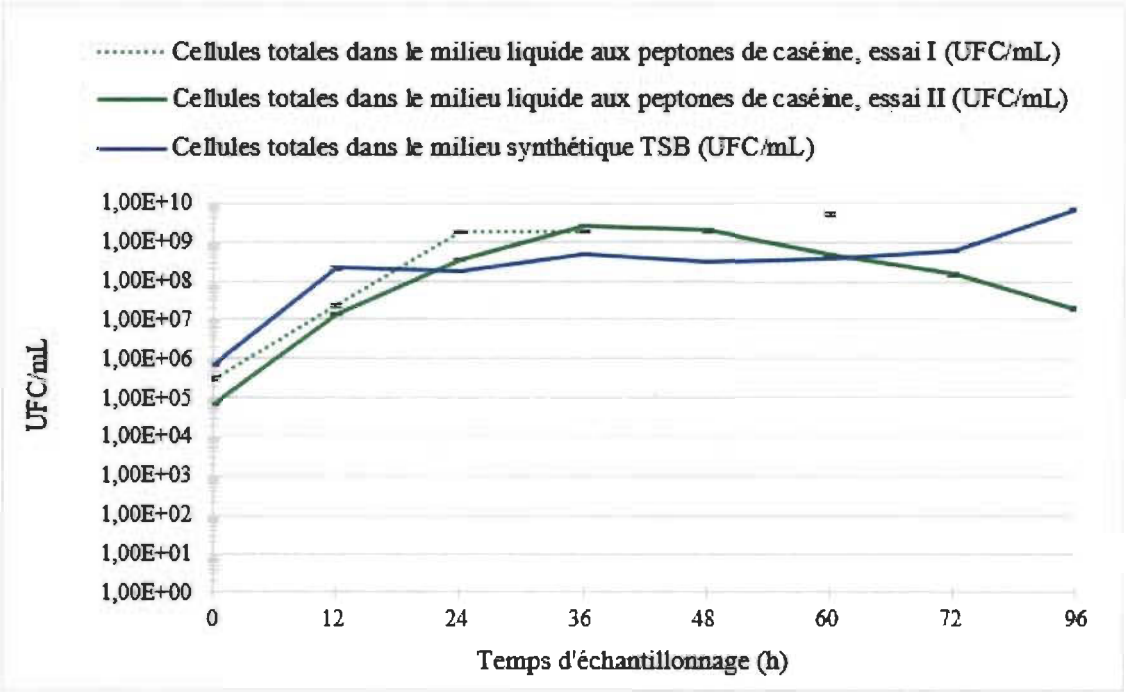

Figure 5.5 Comparaison entre la croissance de *Bt* 4R2 dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essais I, II) et le milieu TSB.

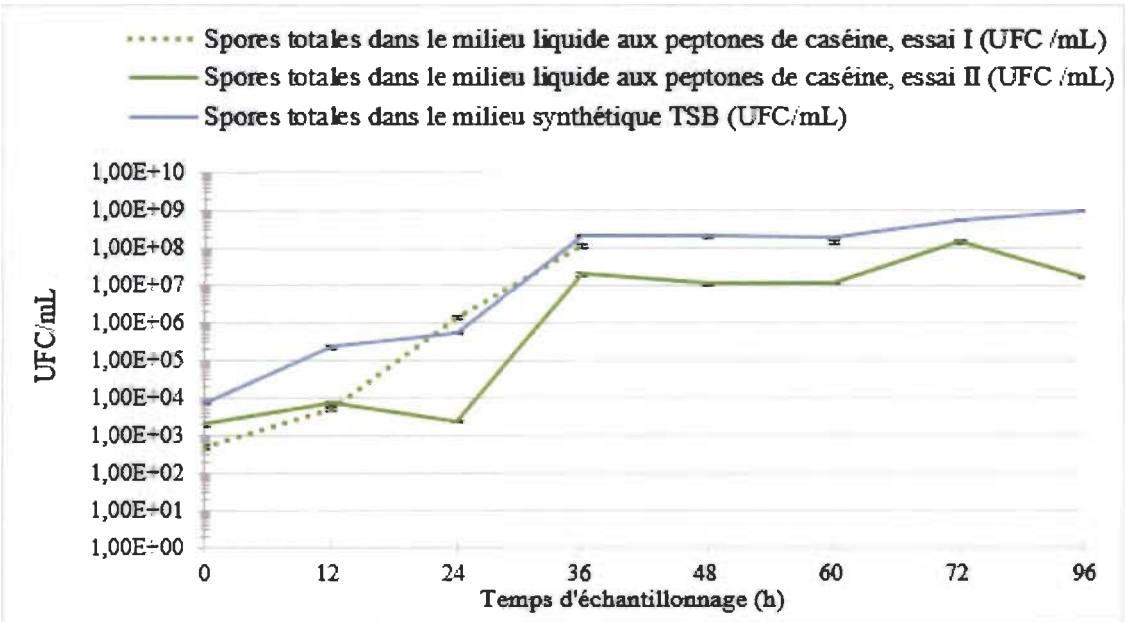

Figure 5.6 Comparaison entre le nombre de spores de *Bt* 4R2 formées dans le milieu liquide aux peptones de caséine (essai I, II) et le milieu TSB.

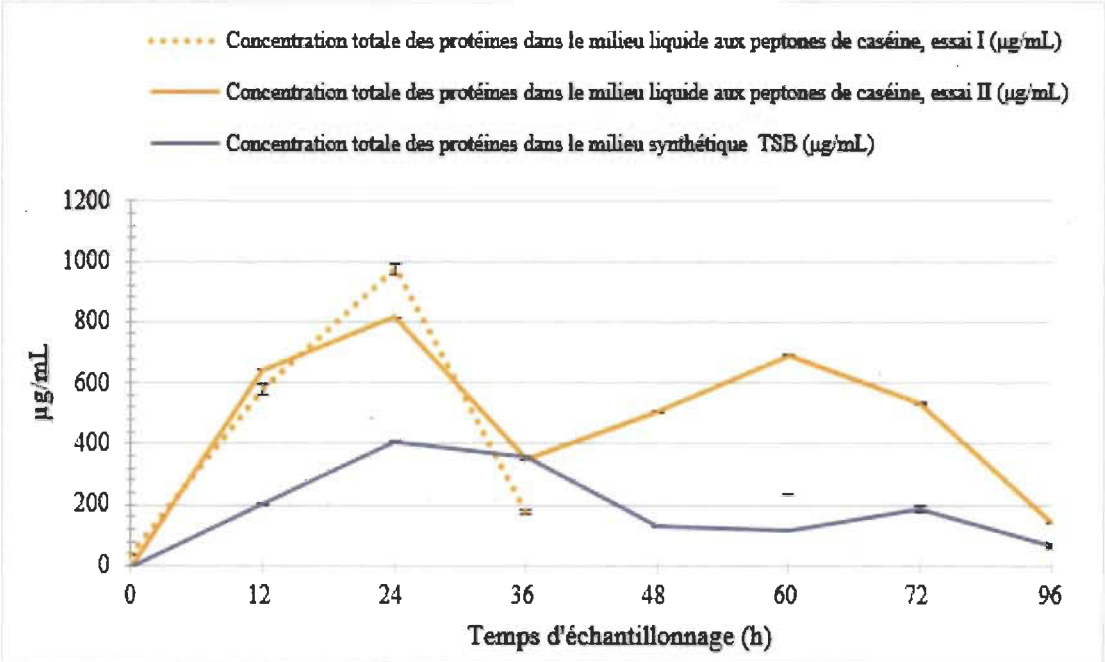

Figure 5.7 Comparaison de la concentration totale des protéines entre le milieu liquide aux peptones de caséine et le milieu synthétique TSB.

5.1.2.2 Milieu gélosé aux peptones de caséine

Dans cette culture de type solide, nous avons obtenu une concentration de protéines de 4400 µg/mL au 3e jour et de 2900 µg/mL au 4e jour de culture (Tableau 5.1). Ces concentrations étaient quatre fois plus élevées que celles obtenues dans la culture liquide du même milieu. Donc, le *Bacillus thuringiensis* 4R2 semble mieux se développer sur un support solide qu'en suspension liquide. Les taux de croissance et de concentration de protéines nous permettent de justifier l'hypothèse selon laquelle le milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax contient les nutriments capables de supporter la croissance de *Bt* 4R2.

Tableau 5.1

Concentration totale des protéines (µg/mL) dans le milieu gélosé aux peptones de caséine (milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé)

Temps d'échantillonnage	Concentration totale des protéines (µg/mL)
Milieu gélosé aux peptones de caséine au 3e jour de culture	4400 ± 149
Milieu gélosé aux peptones de caséine au 4e jour de culture	2900 ± 78

5.1.3 Milieu de production du vaccin adsorbé contre l'anthrax : milieu Puziss Right 1095

Dans ce milieu, le *Bacillus thuringiensis* 4R2 a présenté une croissance exponentielle du début de la culture jusqu'à la 12e heure, puis une phase de déclin s'est engagée. Au cours de cette dernière, la croissance a été interrompue et le nombre total de cellules a chuté. À partir de la 24e heure, il y a eu une phase stationnaire pendant laquelle la majorité des cellules s'était transformée en spores. Ces résultats étaient semblables dans les deux essais (Figure 5.8). Dans ce cas-ci, la concentration de protéines était au-dessous de la limite de détection (Figure 5.9).

Au cours de l'étude de ce milieu, l'obstacle majeur rencontré était l'absence apparente de protéines. Devant cet échec, un troisième essai de culture dans le Puziss Right medium 1095 a été effectué. Ce dernier essai a été étudié seulement pour la production de protéines et les résultats obtenus étaient semblables aux deux essais précédents (Figure 5.9).

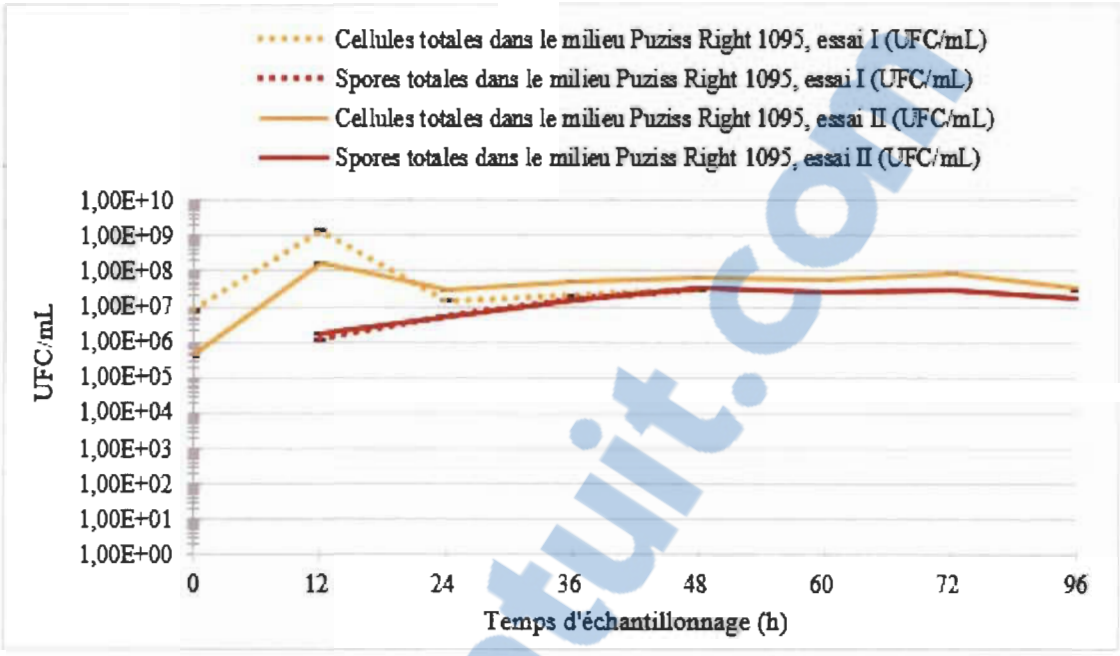

Figure 5.8 Décompte des cellules et des spores de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 (essais I et II).

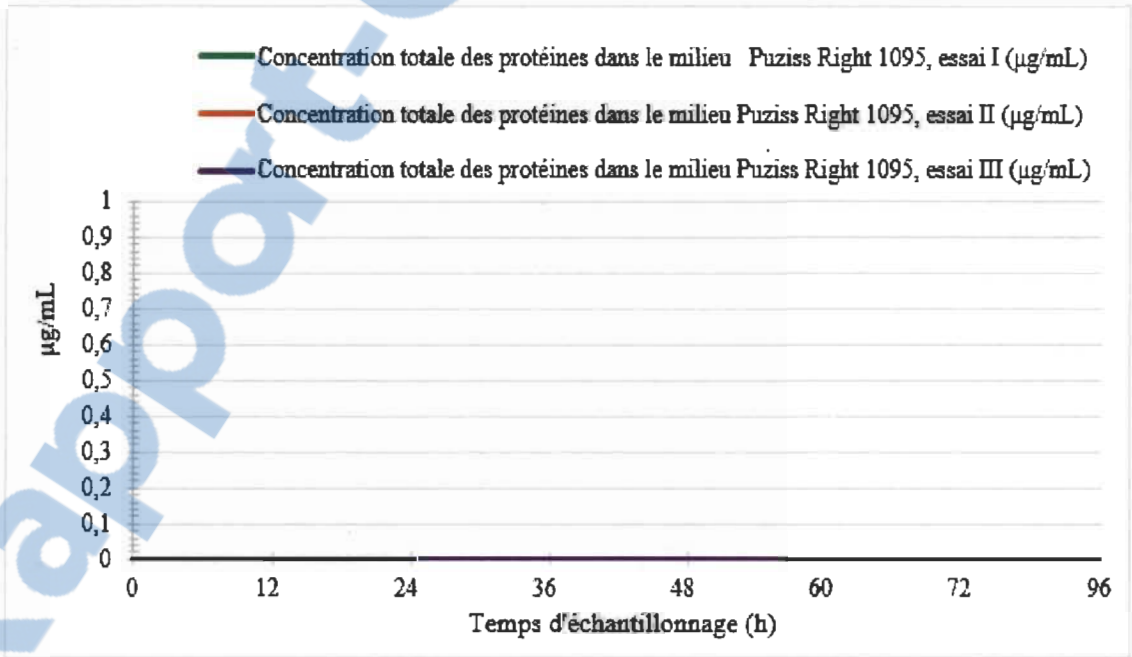

Figure 5.9 Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095 (essai I, II et III).

Rapport-Gratuit.com

La figure 5.10 représente la comparaison entre la croissance de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 et le milieu témoin TSB. Dans ce cas-ci, nous remarquons une phase de croissance exponentielle de *Bt* 4R2 du début de la culture à la 12e heure dans les deux milieux, suivie d'une phase stationnaire et d'un ralentissement de la croissance dans le milieu TSB (milieu témoin). Tandis qu'une phase de déclin s'est engagée dans le milieu Puziss Right 1095 avec une diminution de la concentration en cellules de $1{,}7\times10^{8}$ UFC/mL (12^{e}h) à $2{,}80\times10^{7}$ CFU/mL (24^{e}h). De plus, lors de cette phase, la majorité des cellules représentait des spores, les concentrations de spores étaient beaucoup plus importantes dans ce milieu à la 12^{e}h et 24^{e}h que dans le milieu témoin TSB (Figure 5.11). Ces constatations témoignent d'une sporulation prématurée dans ce milieu pharmaceutique.

Alors que le taux maximal de protéines produites dans le milieu TSB était enregistré à la 24e heure, la production de protéines dans le milieu Puziss Right 1095 restait indétectable dans les trois essais (Figure 5.12). Cet échec pourrait s'expliquer par une solubilisation inadéquate du cristal protéique de *Bt* 4R2 ou par une sporulation précipitée en réponse à un milieu pauvre en nutriments avec un temps insuffisant pour la formation du cristal protéique.

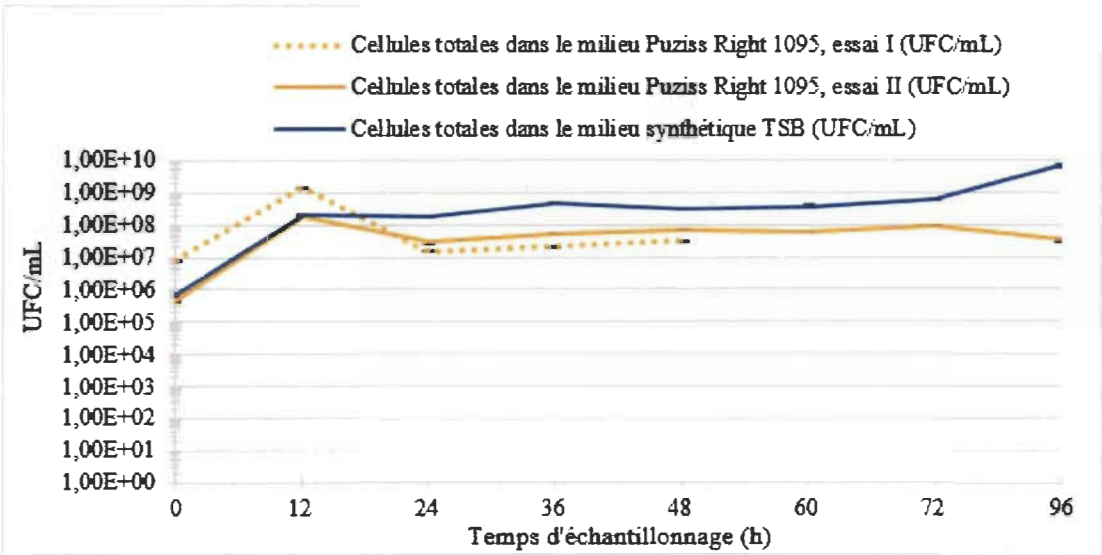

Figure 5.10 Comparaison entre la croissance de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 et le milieu TSB.

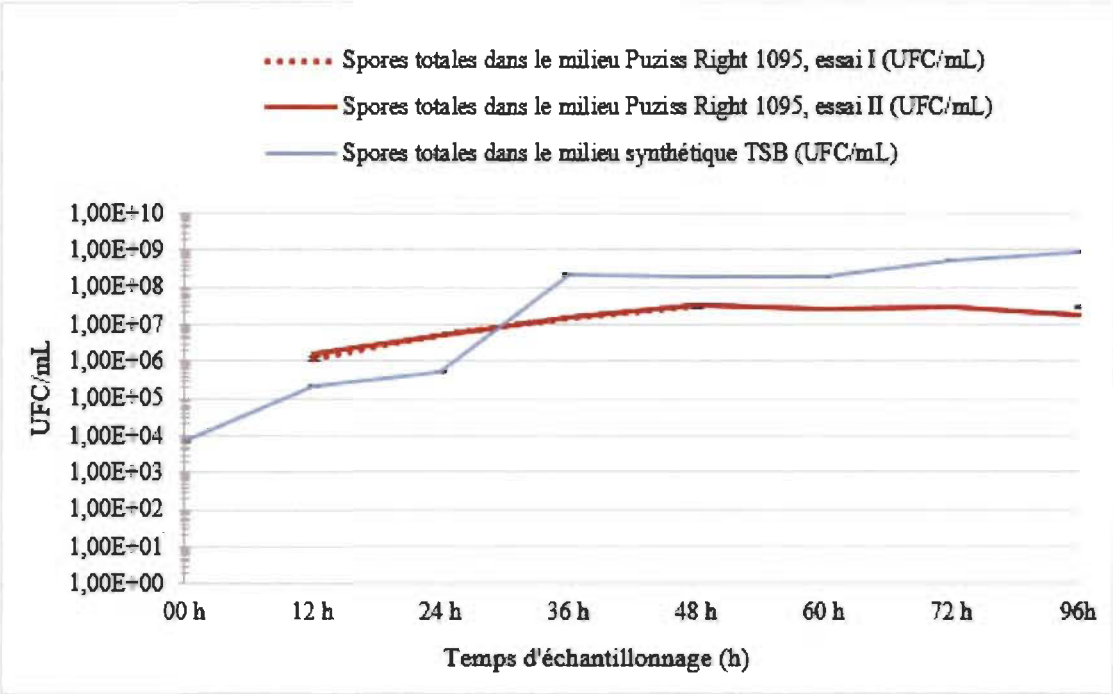

Figure 5.11 Comparaison entre le nombre de spores de *Bt* 4R2 formées dans le milieu Puziss Right 1095 et le milieu TSB.

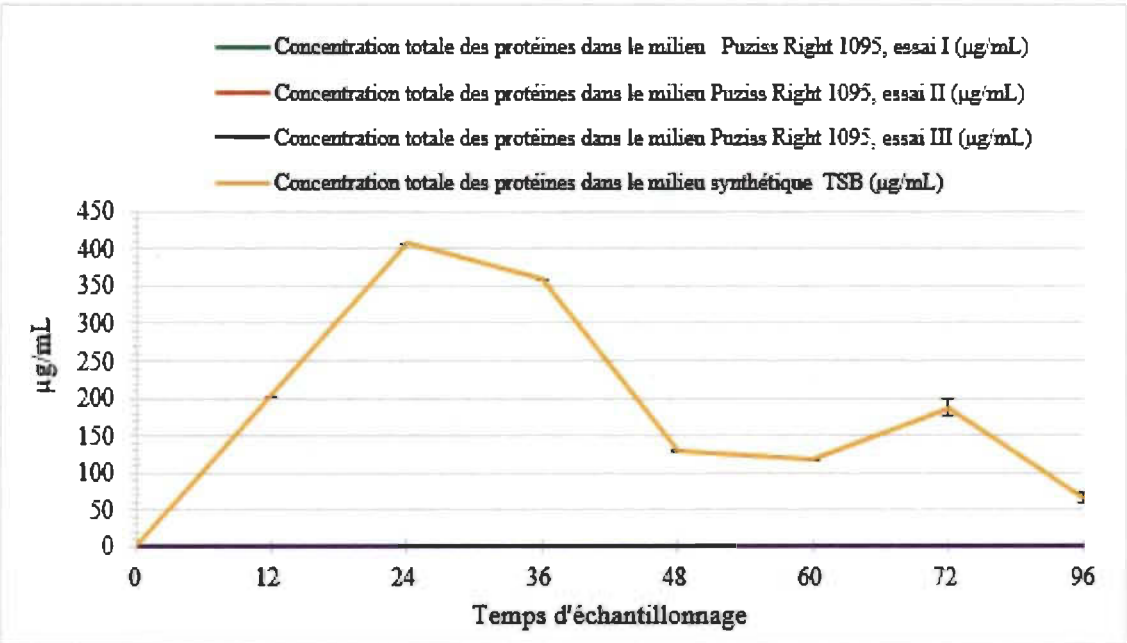

Figure 5.12 Comparaison de la concentration totale des protéines entre le milieu Puziss Right 1095 (essais I, II, III) et le milieu TSB.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

5.1.4 Milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG)

Le milieu de croissance Sauton est utilisé habituellement pour la croissance de la souche Connaught du bilié Calmette Guérin. C'est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, utilisée pour la production du vaccin BCG [99]. Le *Bt* 4R2 s'est bien développé dans ce milieu, la croissance exponentielle s'est effectuée pendant les 12 premières heures de la culture. Ensuite, la croissance a ralenti, mais le nombre de cellules n'a pas cessé d'augmenter jusqu'à la 60e heure (Figure 5.13). Les essais I et II ont donné des résultats presque identiques.

Pour la détermination de la concentration totale des protéines, en plus de l'essai I et II, un troisième essai de culture (III) a été effectué, ce dernier a été analysé que pour le taux de protéines. Les concentrations de protéines n'ont atteint leur maximum qu'entre la 60e et 96e heure de culture, avec une moyenne de 1013 ± 117 µg/mL entre les trois essais (Figure 5.14). Ce taux a été deux fois et demi supérieur au taux obtenu dans le milieu synthétique TSB (milieu témoin).

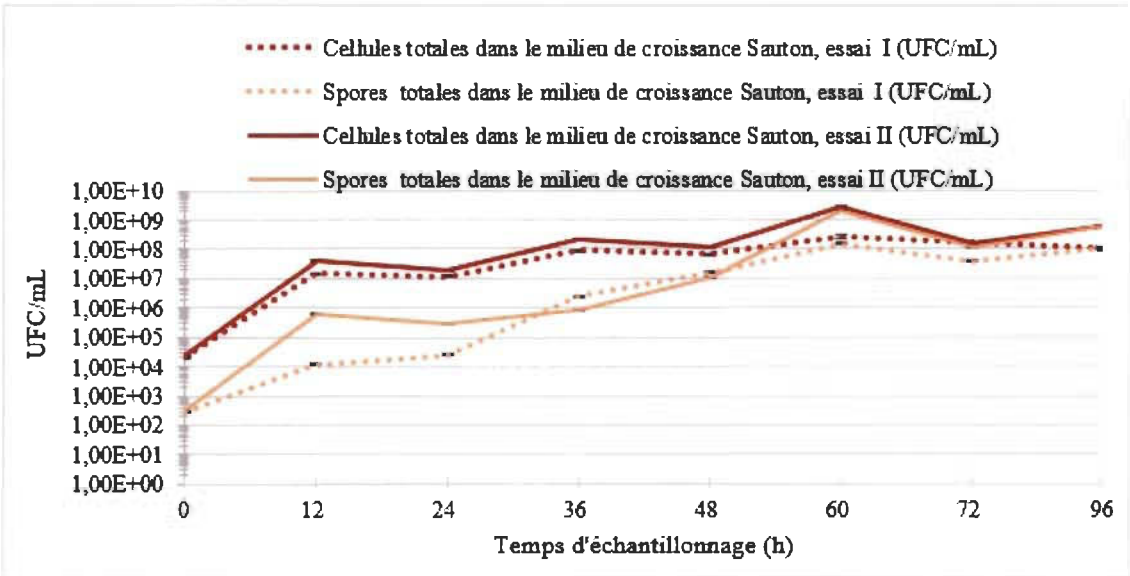

Figure 5.13 Décompte des cellules et des spores de *Bacillus thuringiensis* 4R2 dans le milieu de croissance Sauton (essais I et II).

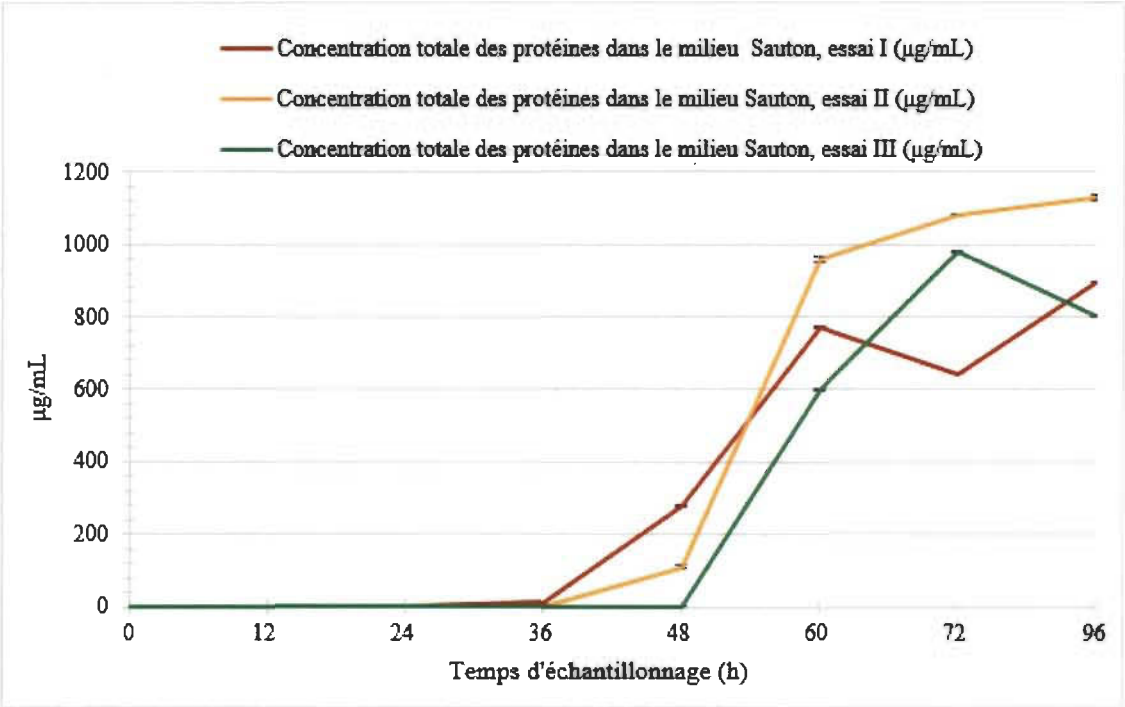

Figure 5.14 Concentration totale des protéines dans le milieu de croissance Sauton (essai I, II et III)

Comparativement au milieu témoin TSB, la croissance exponentielle était semblable et s'est également produite pendant les 12 premières heures de culture. On a néanmoins enregistré une concentration de cellules plus élevée à la 60e heure dans le milieu de croissance Sauton (Figure 5.15). Mais le taux de spores formées tout au long de la culture était plus bas dans ce milieu pharmaceutique (Figure 5.16), alors que le taux de protéines synthétisées était deux fois plus élevé que le taux obtenu dans le milieu TSB (Figure 5.17). Ces concentrations de protéines n'ont été maximum qu'à partir de la 60e heure, les comptes de cellules les plus élevés ont également été enregistré à ce même moment dans ce milieu pharmaceutique. On en déduit que *Bacillus thuringiensis* 4R2 s'est mieux adapté dans le milieu de croissance Sauton mais beaucoup plus lentement.

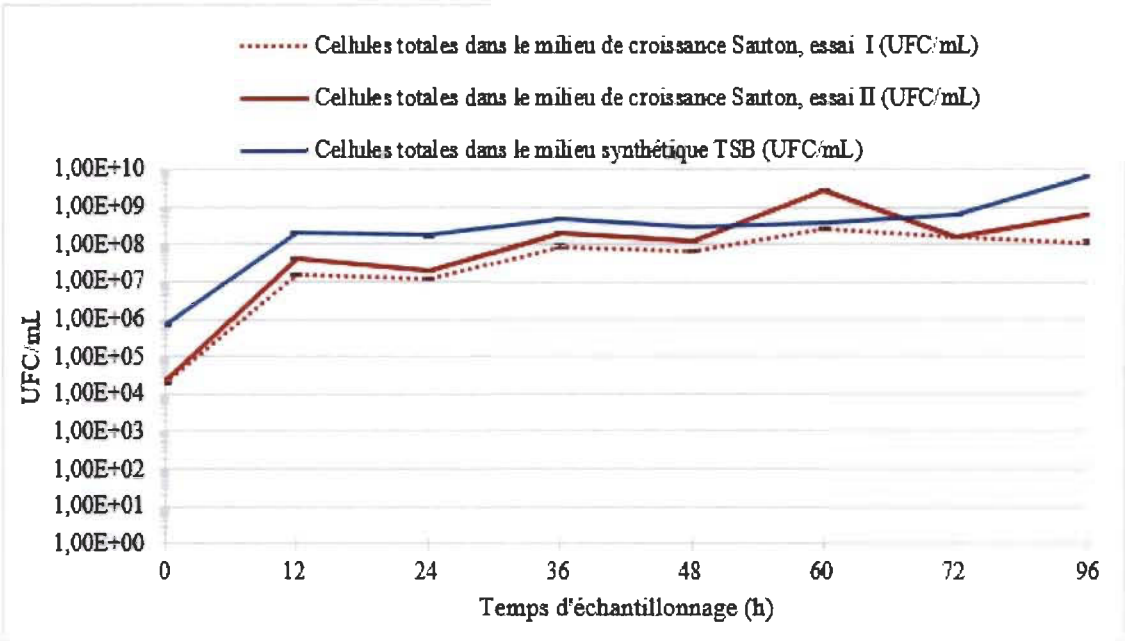

Figure 5.15 Comparaison du nombre de cellules entre le milieu de croissance Sauton (essai I, II) et le milieu TSB.

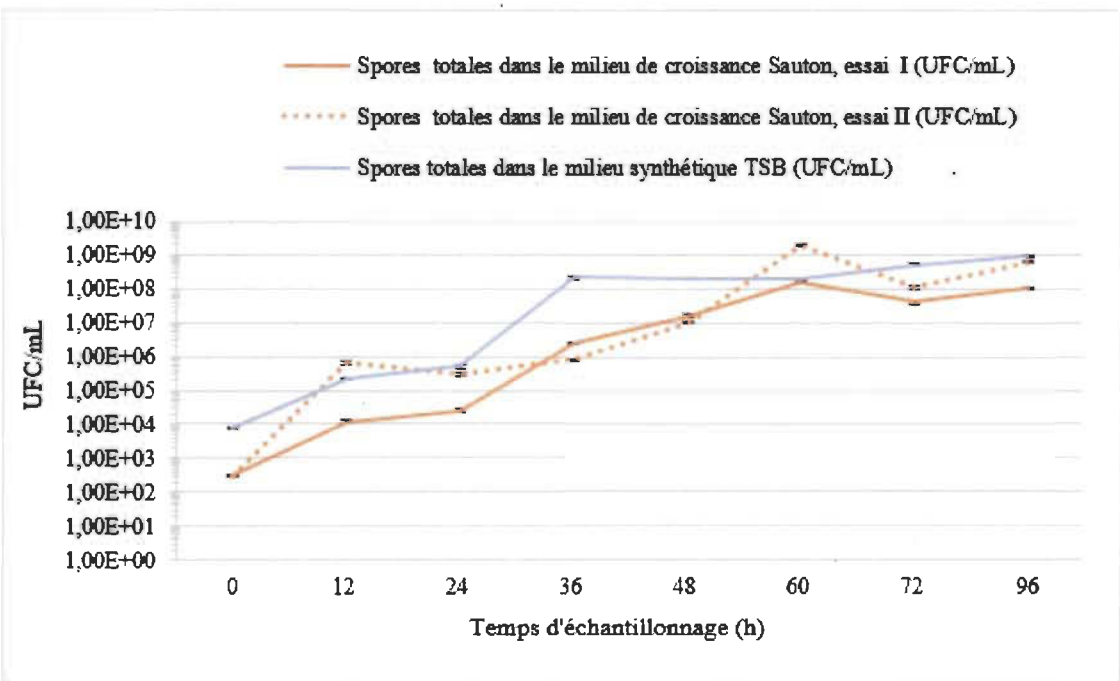

Figure 5.16 Comparaison entre le nombre de spores de *Bt* 4R2 formées dans le milieu de croissance Sauton (essai I, II) et le milieu TSB.

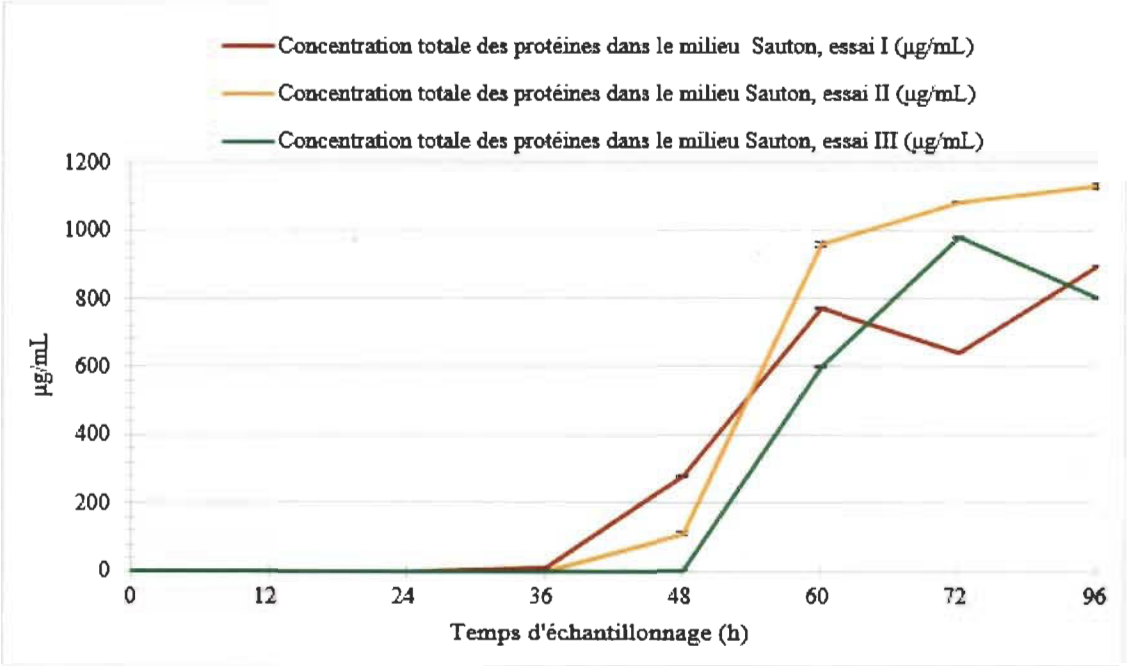

Figure 5.17 Comparaison de la concentration totale des protéines entre le milieu de croissance Sauton (essai I, II, III) et le milieu TSB.

Pour résumer, les taux de protéines obtenus dans les différents milieux de culture pharmaceutiques employés dans ce projet de recherche étaient plus élevés que dans le milieu synthétique TSB qui est notre milieu témoin, sauf pour le milieu Puziss Right 1095 où la production de protéines était indétectable. Le meilleur rendement en protéines a été obtenu dans le milieu gélosé aux peptones de caséine, qui est le milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax avec un taux de 4400 ± 179 µg/mL, ces résultats sont présentés à la figure 5.18. Finalement, le premier objectif de ce travail a été atteint puisque deux des trois milieux pharmaceutiques utilisés ont pu supporter la croissance de *Bacillus thuringiensis* 4R2.

Étant donné les concentrations élevées de protéines dans le milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax (milieu gélosé aux peptones de caséines), la parasporine extraite de la culture de *Bacillus thuringiensis* 4R2 dans ce milieu a été sélectionné pour le test de cytotoxicité envers la lignée cellulaire HepG2.

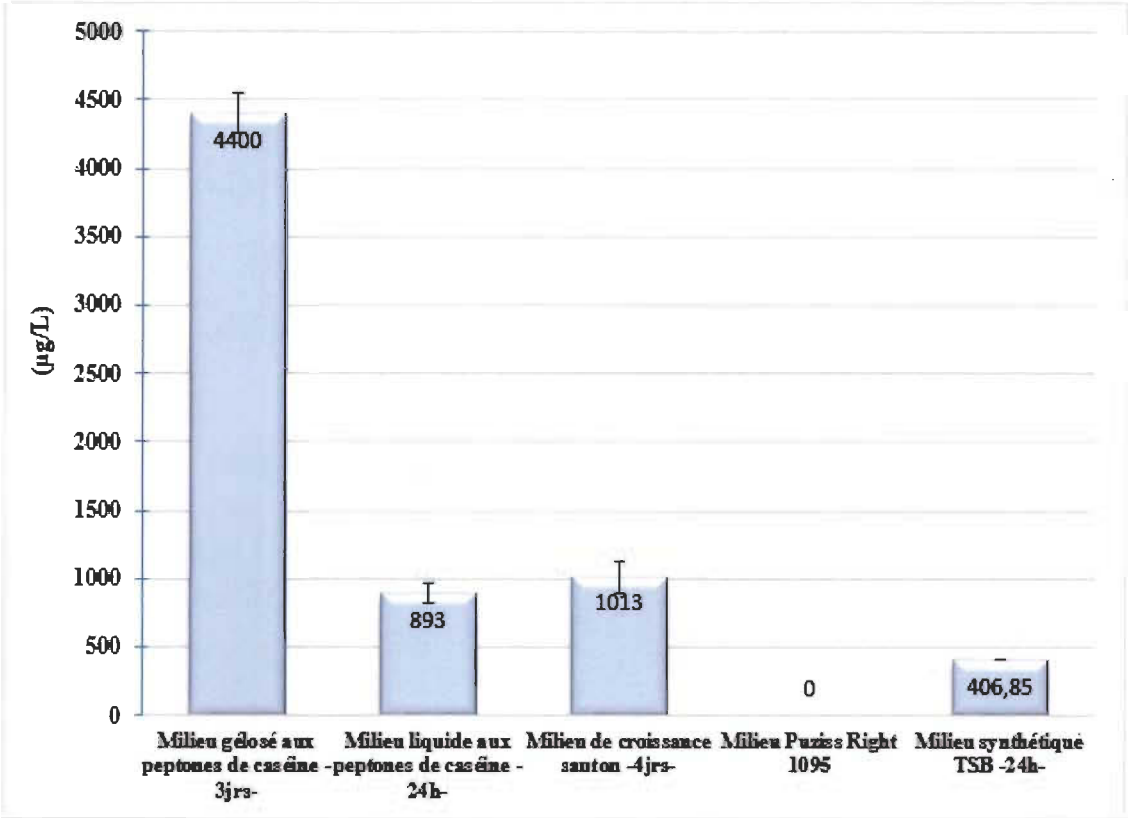

Figure 5.18 Concentration totale des protéines dans les différents milieux de culture employés.

5.2 Résultats de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de laurysulfate de sodium (SDS-PAGE)

L'analyse par SDS-PAGE des protéines solubilisées du cristal de *Bacillus thuringiensis* 4R2 (Figure 5.19) a révélé une bande majeure à la hauteur de 37 kDa environ. Sur le gel, cette bande était visible dans les puits A (milieu synthétique), B (milieu liquide aux peptones de caséine) et D (milieu gélosé aux peptones de caséine), mais n'apparaissait pas dans le puits C (milieu de croissance Sauton). Cette bande correspond à la parasporine PS2Aa1 qui a été extraite précédemment de *Bt* 4R2 [8]. Il avait été démontré que la séquence nucléotidique correspondante à cette parasporine était homologue à 100 % avec la séquence nucléotidique de la protéine Cry 46Aa1 (PS2Aa1) sous sa forme active [8]. C'est d'ailleurs pourquoi elle a été nommée PS2Aa1.

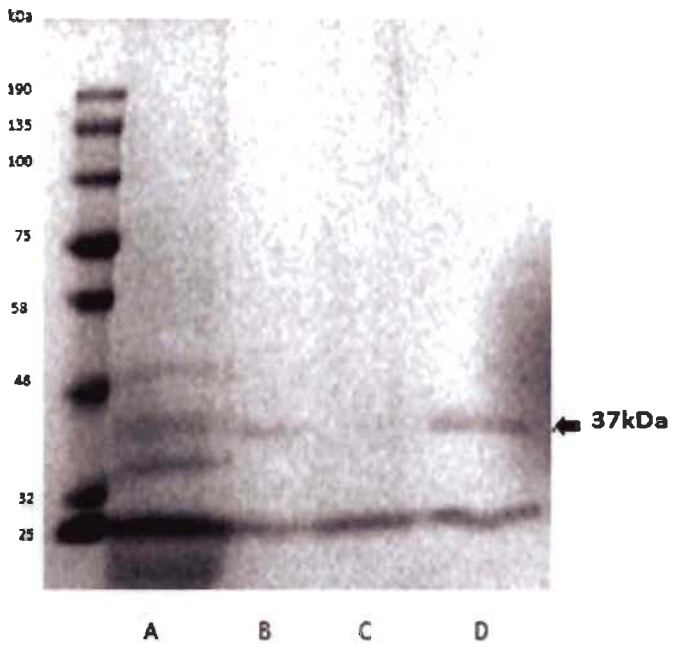

Figure 5.19 Analyse par SDS-PAGE du cristal protéique de *Bacillus thuringiensis* 4R2 (A : milieu synthétique; B : milieu liquide aux peptones de caséine; C : milieu de Sauton; D : milieu gélosé aux peptones de caséine).

Parmi les milieux pharmaceutiques employés dans ce travail, il semblerait que la bande correspondante à la parasporine PS2Aa1 soit plus marquée sur le gel dans le puits D. Dans ce puits, ce sont les protéines extraites du milieu gélosé aux peptones de caséine (milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax) qui y ont été déposées. Le meilleur rendement en protéines a également été obtenu dans ce milieu (Figure 5.18). Compte tenu de ces résultats, la PS2Aa1 extraite du milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax soit le milieu gélosé aux peptones de caséine a été sélectionné pour le test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie).

5.3 Activité cytocide de la PS2Aa1 de *Bacillus thuringiensis* 4R2 sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie)

Nous avons comparé les lectures de densité optique obtenues pour les cellules traitées avec les doses croissantes de la toxine *Bt* 4R2 extraite du milieu gélosé aux peptones de caséines (milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax) à la densité

optique obtenue pour les cellules contrôles. Ces cellules contrôles ont été traitées seulement avec la solution tampon, contenant 10 µL de MTT, 100 µL (10 % SDS dans 0,01 M HCL) et 0 µg/mL de la toxine de *Bt* 4R2. Ensuite, le pourcentage des cellules vivantes a été calculé. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 5.20. Certains écarts types sont étroits et ne peuvent apparaitre sur le graphique, cependant ils sont en annexe dans le Tableau A.10. À partir de la dose de 0.312 µg/mL, la concentration des cellules vivantes a diminué proportionnellement à la dose de toxine de *Bt* 4R2 administrée, la DL50 était de 0.468 µg/mL. Dans ce cas-ci, nous constatons que la PS2Aa1 produite dans le milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax a conservé son activité cytocide envers la lignée cellulaire HepG2.

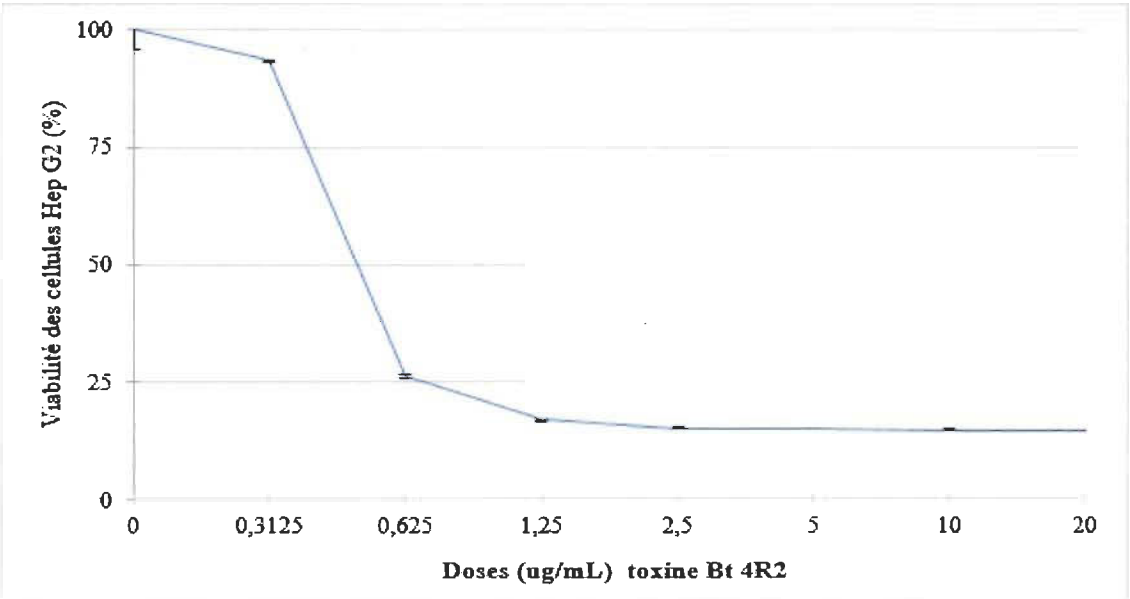

Figure 5.20 Activité cytotoxique de la toxine PS2Aa1 de *Bt* 4R2 sur la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie) en fonction des doses administrées.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Dans ce projet de recherche, il a été question de démontrer que *Bacillus thuringiensis* 4R2 peut croitre dans des milieux de grade pharmaceutique. Les essais menés au cours de ce travail avaient pour objectif d'étudier les effets de la variation des constituants des milieux de culture sur l'élaboration de la parasporine PS2Aa1 produite par *Bacillus thuringiensis* 4R2, tout en maintenant des conditions de croissance optimales pour *Bt.* Après la revue de la littérature, les milieux de production des vaccins de l'anthrax et du BCG (bilié Calmette Guérin) ont été sélectionnés pour nos travaux. En effet, le milieu gélosé aux peptones de caséine (pour la production du vaccin sporulé de l'anthrax) et le milieu de croissance Sauton (pour la production du vaccin BCG) sont des milieux adéquats. Ils ont très bien répondu aux exigences de croissance de *Bacillus thuringiensis* 4R2 et nous avons obtenu les comptes de cellules les plus élevés entre 10^8 et 10^9 UFC/ml. Le meilleur rendement en protéines a été obtenu dans le milieu gélosé aux peptones de caséine, ainsi la PS2Aa1 a été identifié dans ce milieu et a présenté une forte activité cytotoxique envers la lignée cellulaire HepG2 (cancer du foie).

L'étude de cette parasporine, qui entraîne la mort des cellules cancéreuses tout en n'affectant pas les cellules normales, est donc fort importante. Le développement de cette protéine comme nouvelle thérapie anticancer et grâce à sa caractéristique sélective et préférentielle pour les cellules cancéreuses, elle serait donc probablement moins toxique pour le système que la chimiothérapie traditionnelle. Il est cependant prévu que son utilisation clinique induise des réponses immunologiques indésirables chez les patients.

Quant aux perspectives de recherche, afin de faciliter les études sur la parasporine PS2Aa1, il serait intéressant de mettre au point un protocole pour la préparation d'une parasporine activée et bien solubilisée. Le développement d'une telle technique

Rapport-Gratuit.com

permettrait de résoudre le problème auquel nous avons été confrontés dans ce travail avec le milieu de culture Puziss Right 1095, où la production de protéines était indétectable.

La présente étude a démontré que la PS2Aa1 peut être produite dans le milieu de production du vaccin sporulé de l'anthrax tout en conservant son activité cytotoxique envers les cellules du cancer du foie (HepG2). Il serait par ailleurs avantageux de donner suite aux travaux présentés dans ce mémoire en identifiant d'autres milieux pharmaceutiques pouvant supporter la culture de *Bt* 4R2 et la production de la PS2A1. Pour ce faire, il faudrait tester de nouveaux milieux de production des vaccins, ainsi que les milieux de production des antibiotiques.

L'étude du récepteur et du site de liaison de la parasporine aurait un double intérêt. D'une part, elle permettrait d'expliquer sa spécificité d'action vis-à-vis des cellules cancéreuses et décortiquer la voix intrinsèque impliquée dans l'action de la PS. D'autre part, elle permettrait de créer des médicaments ciblant ce récepteur.

Il serait donc particulièrement intéressant d'envisager de breveter la PS2Aa1 pour entreprendre des tests in vivo sur des souris avec des xénogreffes de tissus cancéreux humains.

Il serait aussi pertinent d'élargir la recherche en procédant à un test de criblage sur d'autres bactéries formant des inclusions parasporales. Cette particularité se retrouve dans d'autres variétés d'espèces aérobies et anaérobies apparentées comme par exemple *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Brevibacillus* sp., et *Clostridium* sp.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] World Cancer Report 2014, IARC.

[2] Statitics Canada (2012, July 25). Table 102-0561- Leading Causes of Death, Total population, by age group and sex, Canada, annual. Ottawa: Statiscs Canada. CANSIM database.

[3] Y. Ma and al. (2013). Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. 38(4): 729-41.

[4] Claire Biot1, Rentsch CA, Gsponer JR, Birkhäuser FD, Jusforgues-Saklani H, Lemaître F, Auriau C, Bachmann A, Bousso P, Demangel C, Peduto L, Thalmann GN,Albert ML. (2012). Pre-existing BCG-Specific T Cells Improve Intravesical Immunotherapy for Bladder Cancer. Science Translational Medicine. 4(137): 137ra72.

[5] Harry W. Herr, Alvaro Morales. (2008). History of Bacillus Calmette-Guerin and Bladder Cancer: An Immunotherapy Success Story. The Journal of Urology Volume 179, Issue 1, Pages 53-56.

[6] Hofte H, Whiteley H.R (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbio. Rev. 53(2), 242-255.

[7] Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, Mizuki E, Akao T, Ohba M. (2004). Selective cytocidal action of a crystal protein of *Bacillus thuringiensis* on human cancer cells. J. Biol Chem. 279, 21282-6.

[8] Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté J-C, Sirois M. (2015). Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. DOI: 10.1371/journal.pone.0135106.

[9] D john I Thomas, J Alun W Morgan, John M Wipps, Jhon R Saunders. (2001). Plasmide transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. Isralensis strains in laboratory culture, river water and Dipteran larvae. Appl Environ Microbiol, 10.1128

[10] Maughan A, Geraldine Van der Auwera. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading Heather Infection, Genetics and Evolution 11. 789-797.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

[11] Luthy P, Cordier JL, Fisher H.M. (1982). *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application, in Microbial and Viral Pesticides, E.Kurstak, Ed., Marcel Dekker Inc, New York, NY, pp. 35-74.

[12] Rivera D, Margaratis A, De Lasa H, (1999). A sporulation kinetic model for batch growth of *Bacillus thuringiensis*. The Canadian Journal of Chemical engineering, Yol. 77: 903-910.

[13] Helgason E 1, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø AB. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* -one species on the basis of genetic evidence. Appl Environ Microbiol. 66(6): 2627-30.

[14] Burgesh D. (2001). *Bacillus thuringiensis* in pest control, Pesticide Outlook, June 2001: 90-98.

[15] Nadarajah VD1, Chai SH, Mohammed SM, Chan KK and Kanakeswary K. (2006) Malaysian mosquitocidal soil bacterium (*Bacillus thuringiensis*) strains with selective haemolytic and lectin activity against human and rat erythrocytes. Southeast Asian J Trop Med Public Health; 37(10): 67-78.

[16] Otvos I, Vandeveen S, (1993). Environmental report and current status of *Bacillus thuringiensis* var kurstaki use for control of forest and agricultural insect pests, Ministère des forêts, province de la Colombie Britannique et forêt Canada, p. 81.

[17] Porcar M, Juarez-Perez V. (2003). PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiology Reviews; 26: 419-32.

[18] Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. (1998). Revision of the literature for the *Bacillus thuringiensis* pesticicdal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology Review. 62: 807-13.

[19] Chang C, Yu YM, Dai SM, Law SK, Gill SS. (1993). High level Cry IVD and Cyt A gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. Applied and Environmental Microbiology 1993; 59: 815-21.

[20] De Maadgd RA, Bravo A, Crickmore NA, (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet. 17(4): 193-9.

[21] Lutthy P, Michael G, Wolfersberger. (2000). Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application. pp 167-180.

[22] Schwart JL, Laprade R. (2000). Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein formation and pore insertion. In: Entomopathogenic Bacteria: Laboratory to Field Application, pp 199-217.

[23] Swiecicka I, Bideshi DK, Federici BA. (2007). Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of Trichoplusiani. Appl Environ Microbiol. 74(4): 923-30.

[24] Prasad SS, Shethna YI. (1974). Purification, crystallisation and partial characterisation of the antitumour and insecticidal protein subunit from the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis var thuringiensis*. Biochimica and Biophysica Acta. 8:362(3): 588-96.

[25] Prasad SS[1], Shethna YI. (1976). Mode of action of a purified antitumour protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis subsp thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma cells. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 10(2): 293-8.

[26] Rao AS, Amonkar SV, Phondke GP. (1979). Cytotoxic activity of the delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis var thuringiensis* (Berliner) on fibrosarcoma in Swiss mice. Indian Journal of Experimental Biology. 17(11): 1208-12.

[27] Yokoyama Y, Ohmori I, Kohda K, Kawazoe Y. (1911). Potentiation activity of bleomycin towards solid tumours in mice by *Bacillus thuringiensis subsp israelensis* toxin. Anticancer Research. 11(4): 1625-28.

[28] Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. Journal of Applied Microbiology. 86: 477-86.

[29] Committee of Parasporin Classification and Nomenclature 2006. http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/index.html

[30] J.M. Beierlein and A.C. Anderson. (2011). New Developments in Vaccines, Inhibitors of Anthrax Toxins, and Antibiotic Therapeutics for *Bacillus anthracis* Curr Med Chem. 18(33): 5083-5094.

[31] Prevention, C.f.D.C.a. (2000). Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Morb Mortal Wkly Rep. 49(RR-4):1-14.

[32] Fritze D. (2004). Taxonomy of the genus bacillus and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology. 94: 1245-1248.

[33] Driks A. (2009). The *Bacillus anthracis* spore. Mol Aspects Med. 30: 368-373.

[34] Uchida I, Hashimoto K, Terakado N. (1986). Virulence and immunogenicity in experimental animals of *Bacillus anthracis* strains harbouring or lacking 110 MDa and 60 MDa plasmids. J Gen Microbiol. 132: 557-559.

[35] Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster AR, Hill KK, Keim P, Koehler TM, Lamke G, Kumano S, Mahillon J, Manter D, Martinez Y, Ricke D, Svensson R, Jackson PJ. (1999). Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes. J Bacteriol. 181: 6509-6515.

[36] Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis.* Infect Immun. 39: 371-376.

[37] Mock M, Fouet A. (2001). Anthrax. Ann Rev Micro. 55(1): 647.

[38] Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. (1999). Anthrax. N Engl J Med. 341: 815-826.

[39] Swartz MN. (2001). Recognition and management of anthrax--an update. N Engl J Med. 345: 1621-1626.

[40] Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, Gerberding J, Hauer J, Hughes J, McDade J, Osterholm MT, Parker G, Perl TM, Russell PK, Tonat K. (2002). For the Working Group on Civilian Biodefense, Anthrax as a Biological Weapon, Updated Recommendations for Management. JAMA. 287: 2236-225.

[41] Aksaray N, Cinaz P, Coskun U, Serbest M, Koksal F. (1990). Cutaneous anthrax. Trop Geogr Med. 42: 168-171.

[42] The Ohio States University. Wexner medical center: http://familymedicine.osu.edu/13517.cfm

[43] Daniel A. Sweeney, Caitlin W. Hicks, Xizhong Cui, Yan Li, and Peter Q. Eichacker (2011). Anthrax Infection Am J Respir Crit Care Me. 184(12): 1333-1341.

[44] Jon E, Holty C, Bravata DM, Hau L, Olshen RA, McDonald KM, Owens DK. (2006). Systematic Review: A Century of Inhalational Anthrax Cases from 1900 to 2005. Annals of Internal Medicine. 144: 270-W254.

[45] Update: Investigation of bioterrorism-related anthrax and interim guidelines for exposure management and antimicrobial therapy. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Oct.2001 50: 909-919.

[46] Kelly DJ, Chulay JD, Mikesell P, Friedlander AM. (1992). Serum concentrations of penicillin, doxycycline, and ciprofloxacin during prolonged therapy in rhesus monkeys. J Infect Dis. 166: 1184–1187.

[47] Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, Hauer J, McDade J, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Tonat K. (1999). Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. JAMA.281: 1735-1745.

[48] Heine HS, Bassett J, Miller L, Purcell BK, Byrne WR. (2010). Efficacy of daptomycin against *Bacillus anthracis* in a murine model of anthrax spore inhalation. Antimicrob Agents Chemother. 54: 4471-4473.

[49] Heine HS, Purcell BK, Bassett J, Miller L, Goldstein BP. (2010). Activity of dalbavancin against *Bacillus anthracis* in vitro and in a mouse inhalation anthrax model. Antimicrob Agents Chemother. 54: 991-996.

[50] Gill SC, Rubino CM, Bassett J, Miller L, Ambrose PG, Bhavnani SM, Beaudry A, Li J, Stone KC, Critchley I, Janjic N, Heine HS. (2010) Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of faropenem in a lethal murine *Bacillus anthracis* inhalation postexposure prophylaxis model. Antimicrob AgentsChemother. 54: 1678-1683.

[51] Vietri NJ, Purcell BK, Lawler JV, Leffel EK, Rico P, Gamble CS, Twenhafel NA, Ivins BE, Heine HS, Sheeler R, Wright ME, Friedlander AM. (2006). Short-course postexposure antibiotic prophylaxis combined with vaccination protects against experimental inhalational anthrax. Proc Natl Acad Sci. U S A. 103: 7813-7816.

[52] Institut Pasteur mobilisées sur le charbon –anthrax- (2013): http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/charbon-anthrax

[53] R.P Misra. Production de vaccin pour la fièvre charbonneuse et le charbon symptomatique.

[54] Anthrax Spore Vaccine. USDA Code: 1011.00, U.S. Vet. License No. 188. COLORADO SERUM COMPANY, 4950 York Street, Denver, Colorado 80216. 303-295-7527

[55] A. Chauveau, «Du renforcement de l'immunité des moutons algériens, à l'égard du sang de rate, par les inoculations préventives. Influence de l'inoculation de la mère sur la réceptivité du fœtus». Comptes rendus de l'Académie des sciences, t 91, 1880, p. 148-151.

[56] Louis pasteur « Le vaccin du charbon » Comptes rendus de l'Académie des Sciences, séance du 21 mars 1881, XCII, p. 666-668 ; O. C. de Pasteur, vol. VI, p. 343-345.

[57] Shlyakhov E, Blancou J, E. Rubinstein. (1996). Les vaccins contre la fièvre charbonneuse des animaux, de Louis Pasteur à nos jours. Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties. 15(3): 853-862.

[58] BioThrax® (Anthrax Vaccine Adsorbed) Emergent BioSolutions. Manufactured by Emergent BioDefense Operations Lansing LLC Lansing, MI 48906, US License No. 1755

[59] Code of federal regulations (1994). Food and drugs. 21parts 600 to 799. US Government Priting Office. Washington.

[60] George G Wright, Milton Puziss, W Brock Neely. (1961). Effect of variation in cultural conditions on elaboration of protective antigen by strain of Bacillus Anthracis. U.S. Army Chemical Corps, Fort Detrick, Frederick, Maryland

[61] Gilliver K, Bril J. Exper. Path., 30, 1949, p. 21.4.

[62] Berdy J. (1974). Adv. Appl. Microbiol. J8-309-406.

[63] Polymixine B.Cayman Chemical Item Number 14157 Cayman Chemical Référence 14157. Aerosporin; Mastimyxin (CAS 1405-20-5) Mastimyxin (CAS 1405-20-5Aerosporin)

[64] Vasantha, N., Balakrishnan, R., Kaur, S. and Jayaraman, K. (1980). Arch. Biochem. Biophys. 200-40-44.

[65] Bacitracine sur SteriMax Inc. Mississauga (Ontario) L4W 4M8. www.sterimaxinc.com

[66] Matsuhashi. Y, Sawa T, Kondo S, Takeuchi.T. (1977). J. Antibiotics 30-435-437.

[67] Dubos RJ, Hotchkiss RD. (1941). « The Production of Bactericidal Substances by Aerobis Sporulating Bacilli », J. Exp. Med., vol. 73, no 5, p. 629-640.

[68] Van Epps HLL. (2006). « René Dubos: unearthing antibiotics », J. Exp. Med., vol. 203, no 2, p. 259

[69] Harold F M, Baarda J R. (1967). Gramicidin, Valinomycin, and Cation Permeability of Streptococcus faecalis, J. Bacteriol., vol. 94, no1, p. 53-60.

[70] Elise L Ma, Yoon Jeong Choi, Jinyoung Choi, Charalabos Pothoulakis, Sang Hoon Rhee, Eunok Im. (2010). The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition.. Int. J. Cancer; 127(4): 780-90.

[71] Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* (2012). U.S.Food and Drug Administration.

[72] Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M. (2000). Parasporin, a human leukaemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis.* Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; 7: 625-34.

[73] Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mekada E, Mizuki E. (2007). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca2+ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca2+ concentration in toxin-sensitive cells. J Biol. Chem. 282: 7742-52.

[74] Uemori A, Ohgushi A, Yasutake K, Maeda M, Mizuki E, Ohba M. (2008) Parasporin-1Ab, a novel *Bacillus thuringiensis* cytotoxin preferentially active on human cancer cells in vitro. Anticancer Res. 28 (1A): 91-5.

[75] Yasutake K, Uemori A, Binh ND, Mizuki E, Ohba M. (2008). Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. Zeitschrift fur Naturforschung C. 63: 139-43.

[76] Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, Okumura S, Akao T, Mizuki E, Kuge O, Sasaguri Y, Ohba M, Ito A. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumour crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biological Chemistry; 281(36): 26350-60.

[77] Wong SYR, Nadarajah VD, Mohammed SM, Tengku Ibrahim TA. (2010). Characterisation of the binding properties of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on leukaemic cells. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 29: 86.

[78] Ohba M[1], Mizuki E. (2009) Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res. 29(1): 427-33.

[79] Mizuki E et al. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clin Diagn Lab Immunol. 7(4): 625-34.

[80] Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ohba M, Ito A. (2005). Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytocidal activity on limited human cancer cells. J. Biochem. 138: 663-72.

[81] Okumura S, Akao T, Higuchi K, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M, Inouye K. (2004). *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis strain 89-T-3422 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. Letter in Applied Microbiology. 39: 89-92.

[82] Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Mizuki E & Inuoye K. (2008). Identification and characterisation of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. Biotechnol Annu Rev. 14: 225-52.

[83] Nagamatsu Y, Okamura S, Saitou H, Akao T, Mizuki E. (2010). Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 494-98.

[84] Keisuke Ekino, Shiro Okumura, Eiichi Mizuki. (2014).Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain, Toxins (Basel) 6(6): 1882-1895.

[85] Okumura S et al. (2011). Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from *Bacillus thuringiensis* .Biochim Biophys Acta 1808(6): 1476-82.

[86] Eric Gonzalez et al. (2011). Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a Globally Dispersed *Bacillus thuringiensis* Strain. Curr Microbiol 62(5):1643-8.

[87] Goodman, N. S., Gottfried, R. J. Rogoff, M. H. (1967) J. Bacteriol. 94, 485.

[88] Akio Ito et al. (2004) .A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal Action to Human Cells, J Biol Chem. 279(20): 21282-6.

[89] Y.-C. Jung and al. (2007). Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytocidal activity against human cancer cells, J Appl Microbiol. 103(1): 65-79.

[90] Microbiologie. Page 904. (2010). Par Lansing M. Prescott, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton.

[91] Jean Pilette. (2009). Member du E.F.V.V (European Forum Vaccin Vigilance). Constituants des vaccins. http://www.alis-france.com/download/constituants_vaccins.pdf

[92] Sanofi pasteur 240 BCG VACCINE (lyophilisé). Sanofi Pasteur Limited Toronto, Ontario, Canada.

[93] Lisa A. Keating and al. (2005). The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. Molecular Microbiology. 56 (1), 163-174.

[94] Bradford MM. 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.

[95] APHA, AWWA and WPCF. (1989). Standard methods of examination of water and wastewaters 17ème edition. American Public Health Association. Washington.

[96] Al-Tubuly AA. (2000). SDS-PAGE and Western Blotting. Methods Mol Med. 40:391-405.

[97] Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. (2011). Cells sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 731:237-45.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXE A

DÉCOMPTE DES CELLULES ET SPORES POUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE EMPLOYÉS

Le nombre de cellules, de spores et la concentration totale des protéines représentées sur les figures dans le chapitre V se trouvent sous forme de tableaux dans cette annexe.

Tableau A.1

Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu synthétique TSB

Temps d'échantillonnage (h)	Cellules totales dans le milieu synthétique TSB (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu synthétique TSB (UFC/mL)
0	7,00E+05	7,40E+03
12	2,10E+08	2,20E+05
24	1,70E+08	5,10E+05
36	4,80E+08	2,10E+08
48	3,00E+08	2,00E+08
60	3,70E+08	1,90E+08
72	6,00E+08	5,10E+08
96	6,50E+09	9,00E+08

Tableau A.2

Concentration totale des protéines dans le milieu synthétique TSB

Temps d'échantillonnage (h)	Concentration totale des protéines dans le milieu synthétique TSB (µg/mL)
0	00
12	202,10 ± 0,40
24	406,85 ± 0,45
36	358,50 ± 1,00
48	129,70 ± 2,00
60	118,50 ± 1,00
72	186,65 ± 11,00
96	67,35 ± 7,00

Tableau A.3

Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu liquide aux peptones de caséine (culture liquide dans le milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé sans gélose)

Temps d'échantillonnage (h)	Cellules totales dans le milieu liquide aux peptones de caséine, essai I (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu liquide aux peptones de caséine, essai I (UFC /mL)	Cellules totales dans le milieu liquide aux peptones de caséine, essai II (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu liquide aux peptones de caséine, essai II (UFC /mL)
0	3,00E+05	5,00E+02	6,90E+04	2,00E+03
12	2,30E+07	5,00E+03	1,40E+07	7,00E+03
24	1,76E+09	1,40E+06	3,40E+08	2,40E+03
36	1,80E+09	1,10E+08	2,50E+09	2,00E+07
48			1,90E+09	1,10E+07
60	5,20E+09	1,40E+08	4,70E+08	1,20E+07
72			1,50E+08	1,40E+08
96			2,00E+07	1,60E+07

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau A.4

Concentration totale des protéines (µg/mL) dans le milieu liquide aux peptones de caséine (culture liquide dans le milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé sans gélose)

Temps d'échantillonnage (h)	**Concentration totale des protéines dans le milieu liquide aux peptones de caséine, essai I (µg/mL)**	**Concentration totale des protéines dans le milieu liquide aux peptones de caséine, essai II (µg/mL)**
0	36,00 ± 3,00	00
12	579,00 ± 17,00	643,00 ± 2,00
24	972,00 ±19,00	815,10 ± 0,70
36	179,00 ± 7,00	347,00 ± 2,00
48		505,00 ± 1,00
60	233,00 ± 2,00	689,00 ± 1,00
72		535,00 ± 2,00
96		143,30 ± 0,50

Tableau A.5

Concentration totale des protéines (µg/mL) dans le milieu gélosé aux peptones de caséine (culture solide dans le milieu de production du vaccin de l'anthrax sporulé)

Temps d'échantillonnage	**Concentration totale des protéines (µg/mL)**
Milieu gélosé aux peptones de caséine 3e jour de culture	4400 ± 149
Milieu gélosé aux peptones de caséine 4e jour de culture	2900 ± 78

Tableau A.6

Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu Puziss Right 1095 (culture liquide dans le milieu de production du vaccin adsorbé de l'anthrax)

Temps d'échantillonnage (h)	Cellules totales dans le milieu Puziss Right 1095, essai I (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu Puziss Right 1095, essai I (UFC/mL)	Cellules totales dans le milieu Puziss Right 1095, essai II (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu Puziss Right 1095, essai II (UFC/mL)
0	8,00E+06		4,30E+05	
12	14,00E+08	1,20E+06	1,70E+08	1,70E+06
24	1,45E+07	5,20E+06	2,80E+07	5,30E+06
36	2,00E+07	1,55E+07	5,200E+07	1,60E+07
48	3,00E+07	3,00E+07	6,80E+07	3,40E+07
60			6,00E+07	2,60E+07
72			9,00E+07	3,00E+07
96	3,00E+07	3,00E+07	3,20E+07	1,70E+07

Tableau A.7

Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095 (culture liquide dans le milieu de production du vaccin adsorbé de l'anthrax)

Temps d'échantillonnage (h)	Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095, essai I (µg/mL)	Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095, essai II (µg/mL)	Concentration totale des protéines dans le milieu Puziss Right 1095, essai III (µg/mL)
0	00	00	00
12	00	00	00
24	00	00	00
36	00	00	00
48	00	00	00
60		00	00
72		00	00
96 h	00	00	00

Tableau A.8

Résultats de la croissance et de la sporulation de *Bt* 4R2 dans le milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG)

Temps d'échantillonnage (h)	Cellules totales dans le milieu de croissance Sauton, essai I (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu de croissance Sauton, essai I (UFC/mL)	Cellules totales dans le milieu de croissance Sauton, essai II (UFC/mL)	Spores totales dans le milieu de croissance Sauton, essai II (UFC/mL)
0	2,00E+04	3,00E+02	2,30E+04	3,00E+02
12	1,50E+07	1,20E+04	4,00E+07	6,60E+05
24	1,20E+07	2,60E+04	2,00E+07	3,00E+05
36	9,00E+07	2,50E+06	2,00E+08	8,00E+05
48	6,50E+07	1,60E+07	1,20E+08	1,00E+07
60	2,65E+08	1,55E+08	2,70E+09	1,90E+09
72	1,60E+08	4,00E+07	1,60E+08	1,10E+08
96	1,15E+08	1,05E+08	6,00E+08	6,00E+08

Tableau A.9

Concentration totale des protéines dans le milieu de croissance Sauton (milieu de production du vaccin BCG)

Temps d'échantillonnage (h)	Concentration totale des protéines dans le milieu Sauton, essai I (µg/mL)	Concentration totale des protéines dans le milieu Sauton, essai II (µg/mL)	Concentration totale des protéines dans le milieu Sauton, essai III (µg/mL)
0	00	00	00
12	00	00	00
24	00	00	00
36	10,00 ± 2,00	00	00
48	278,00 ± 4,00	110,00 ± 7,00	1,00 ± 1,00
60	770,00 ± 21,00	956,00 ± 7,00	599,00 ± 1,00
72	644,70 ± 0,30	1081,00 ± 1,00	978,60 ± 0,60
96	896,00 ± 2,00	1131,00 ± 8,00	802,00 ± 2,00

Tableau A.10

Viabilité des Cellules de la lignée Hep G2 après traitement par la toxine de Bt 4R2

Doses toxine *Bt* 4R2 (ug/mL)	**Viabilité (%)**
0	100 ± 4,044
0,3125	93,306 ± 0,049
0,6250	26,182 ± 0,430
1,25	16,843 ± 0,277
2,5	15,227 ± 0,087
5	14,988 ± 0,011
10	14,873 ± 0,103
20	14,705 ± 0,046

Remarque : *Les cases vides dans les tableaux représentent les échantillonnages non effectués lors de nos premiers essais de cultures.*