



Doctorat en Sciences THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Université Paris Sud

Spécialité : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Marcela AZEVEDO

le 25 Octobre 2013

Engineering of Lactic Acid Bacteria strains modulating immune response for vaccination and delivery of therapeutics

Directeur de thèse : **Jean-Marc CHATEL**
Co-Directeur de la thèse : **Anderson MIYOSHI**

Jury

M. Armel GUYONVARCH , Professeur, Université Paris Sud	Président du Jury
M. Bertrand BELLIER , Maître de conférence, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M. Jean-Guy LeBlanc , Professeur, Université nationale de Tucuman, Argentine	Rapporteur
Mme Alexandra GRUSS , Directeur de Recherches, INRA	Examineur
M. Jerry WELLS , Professeur, Université de Wageningen, PaysBas	Examineur
M. Vasco AZEVEDO , Professeur, Université fédérale du Minais Gerais, Brésil	Examineur
M. Philippe LANGELLA , Directeur de Recherches, INRA	Examineur

RESUME

L'utilisation de bactéries lactiques (BL), telle que *Lactococcus lactis* (LL), comme vecteur de transfert d'ADN, constitue une stratégie prometteuse dans la mesure où elles sont considérées sans risque pour la santé. Des souches sauvages (wt) ou recombinantes de LL ont été décrites comme capables de transférer un plasmide dans des cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les mécanismes d'action grâce auxquels certaines souches de LL ont la capacité de transférer de l'ADN plasmidique sont toujours inconnus. C'est pourquoi, nous avons décidé de construire une nouvelle souche recombinante de LL exprimant l'internaline mutée (mInIA,) à partir de la souche pathogène *Listeria monocytogenes*, de manière à comprendre par quel procédé l'ADN est transféré à des cellules eucaryotes. Nous avons détecté l'expression de mInIA par FACS et montré que la souche LL-mInIA était plus invasive que la souche sauvage wt après co-incubation avec des cellules épithéliales intestinales (IECs) non confluentes ou polarisées. La microscopie confocale confirme ces propriétés d'invasivité de la souche LL-mInIA capable de transférer plus efficacement le vecteur d'expression eucaryote codant pour l'allergène de la β -lactoglobuline, pValac :BLG, *in vitro* dans des IECs et dans des cellules dendritiques (DCs). La souche LL-mInIA a aussi la capacité de transférer le vecteur pValac :BLG à des DCs à travers une monocouche de IECs différenciées. Des essais *in vivo* montrent que des bactéries invasives du genre *Lactococcus* ont tendance à augmenter l'expression de BLG chez la souris. De plus, il est montré qu'une souche non invasive de LL, ou la souche invasive LL-mInIA, stimulent la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 dans des DCs, et que, *in vivo*, après des essais d'immunisation oraux ou intra nasaux, la souche LL non invasive oriente la réponse immunitaire plutôt vers le type 1, alors que la souche LL invasive génère une réponse de type 2 chez des animaux immunisés. Tous ces résultats apportent un nouvel éclairage sur le mécanisme d'assimilation des lactocoques en tant que vecteurs de transfert de molécules actives.

INTRODUCTION GENERALE

I. COLLABORATIONS

Cette thèse s'inscrit dans un programme de co-tutelle élaboré par deux organismes d'enseignement supérieur : l'un au Brésil appelé Universidade Federale de Minas Gerais (UFMG), et l'autre en France appelé Université Paris-Sud 11. Ce programme permet aux étudiants de se confronter à la communauté scientifique internationale en leur délivrant un PhD reconnu par les deux institutions. La majeure partie de ce travail a été réalisée en France à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), au centre de Jouy en Josas, sous la direction de Dr Jean-Marc Chatel et la co-direction du Dr Philippe Langella, tous deux chercheurs dans l'Equipe ProbiHote de l'Unité MICALIS (Microbiologie de L'Alimentation au Service de la Santé). Ce travail a également été supervisé par le Dr Anderson Miyoshi et le Dr Vasco Azevedo, tous deux Professeurs à l'Instituto de Ciências Biológicas et chercheurs au Laboratorio de Genética Celular e Molecular (LGCM) de l'UFMG. Ce projet de recherche a été financé l'année passée par la Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) et, avant cette période, par le projet européen Cross-Talk pendant trois ans (avril 2009-2012). Le projet Cross-Talk s'inscrit dans le Marie Curie Initial Training Network (ITN) dont la vocation est d'étudier les interactions entre le microbiote et l'Homme. Ce réseau implique 13 partenaires et 14 jeunes scientifiques issus de plus de 10 universités européennes et non-européennes. Le projet de recherche (RP) incluant cette thèse correspond au Cross-Talk n°6 (RP6) (pour plus de détail consulter : <http://www.cross-talk.eu/index.php?id=63>) qui a pour objectif de caractériser la relation entre cellules immunitaires et cellules épithéliales avec les bactéries lactiques recombinantes utilisées comme vecteurs de transfert d'ADN. La vocation principale du projet Cross-Talk est la formation des étudiants. C'est pour cette raison que ce projet aménage des périodes de mobilité à l'étranger (9 mois au maximum) pour consolider les collaborations les plus récentes entre les laboratoires, les compétences des étudiants, et favoriser le transfert de connaissance. C'est pourquoi le RP6 fut aussi l'occasion de collaborer pendant sept mois avec le Dr Jerry Wells, Professeur au Host Microbe Interactomic Group (HMI) de l'Université de Wageningen – WUR Research Center aux Pays-Bas. Une des prestations établies par le réseau Cross-Talk est le « comité de thèse » qui se tient une fois par an à l'Institut Pasteur de Paris. Ainsi des experts scientifiques tels que le Dr Catherine Grillot-Courvalin (MD, PhD, Professeur associé à l'Institut Pasteur, Unité des agents antibactériens) et le Dr Karine Adel-Patient (Chercheur à l'INRA, UR, Unité d'Immuno-Allergie Alimentaire) sont aussi impliqués dans le projet, avec un rôle de conseil et de proposition pour l'élaboration de futures publications.

II. THEMATIQUES DE TRAVAIL

Lactococcus lactis (LL) est une bactérie traditionnellement utilisée pour la production alimentaire et la conservation. Ainsi, elle est sans risque pour la consommation humaine et revêt l'appellation GRAS (Generally Regarded As Safe). C'est pourquoi elle est à l'origine de nouvelles applications, et LL a été largement exploitée en tant qu'usine cellulaire pour la production de nombreuses protéines d'intérêt pour la santé comme des antigènes en vue de développer de nouveaux vaccins (Miyoshi et Azevedo, 2004 ; Wells et Mercenier, 2008).

Il a été montré que LL a la capacité d'exprimer des protéines antigéniques dans différents compartiments cellulaires (intracellulaires, ancrés dans la membrane ou exprimés dans le milieu extracellulaire) et de les transférer aux surfaces muqueuses (pour revue voir Wells, 2011 ; Pontes et al, 2011 ; Bermudez-Humaran et al, 2011). Les deux principaux exemples sont apportés d'une part par la β -lactoglobuline (BLG), un des principaux allergènes du lait de vache, dans le traitement des maladies allergiques (Chatel et al, 2001), et d'autre part, par l'antigène E7 du virus HPV dans le traitement du cancer du colon (Bermudez-Humaran et al, 2005).

Il a été montré plus récemment que cette bactérie a la capacité de transférer des vaccins à ADN aux surfaces muqueuses (Chatel et al, 2008). En vue d'être exploité, ce travail doit cependant déterminer les mécanismes grâce auxquels LL peut transférer des vaccins à ADN aux cellules eucaryotes. Globalement, un vaccin à ADN est constitué par un ADN plasmidique circulaire codant pour des protéines antigéniques sous le contrôle d'un promoteur eucaryote. Après l'assimilation de l'ADN, les cellules eucaryotes ont la capacité d'exprimer les antigènes. Le plasmide porte une origine de réplication qui permet sa réplication dans l'hôte bactérien, et un marqueur de résistance qui permet la sélection de clones portant le plasmide (Lichtor et Glick, 2012).

L'immunisation par ADN peut générer une réponse immunitaire forte et ample au sein de l'organisme, incluant une immunité conduite par des anticorps, des cellules T helper (CD4+ T cell), et des lymphocytes cytotoxiques T (CTL, CD8+ T cell), recouvrant diverses maladies (Glenting et Wessels, 2005). Le vaccin à ADN peut être appliqué directement sur le corps humain (« vaccination par ADN nu ») ; mais cela peut se faire aussi par l'intermédiaire de vecteurs viraux ou avec des liposomes ou des protéoliposomes (Gurunathan et al, 2000). Les vecteurs bactériens sont aussi largement utilisés car ils peuvent protéger les ADN de la dégradation par les endonucléases, et ils peuvent stimuler le système immunitaire muqueux associé à l'épithélium. De plus, ils montrent un meilleur tropisme dans l'organisme après immunisation, en comparaison à d'autres approches. Par ailleurs, ce système exempte des étapes d'amplification et de purification de plasmide puisque le plasmide est capable de se répliquer lui-même dans la bactérie. Ainsi cette technologie de

vaccination est considérée comme peu coûteuse (Glenting et Wessels, 2005). L'utilisation de LL comme vecteur d'ADN s'avère très intéressante par rapport à l'utilisation de bactéries pathogènes atténuées du fait de leur qualité GRAS (Wells et Mercenier, 2008).

Guimaraes et al (2006) ont montré que la souche sauvage (wt) de LL pouvait transférer des vaccins à ADN *in vitro*. Plus tard, Chatel et al (2008) ont montré que cette bactérie était capable de transférer de l'ADN plasmidique *in vivo* à des cellules épithéliales intestinales de souris (IECs). Même si la capacité des lactocoques à transférer des vaccins à ADN est confirmée, le mécanisme par lequel LL peut transférer de l'ADN à des cellules eucaryotes *in vivo* demeure obscur.

Il y a globalement trois processus possibles selon lesquels des antigènes, des plasmides ou des bactéries peuvent accéder à l'intérieur de cellules eucaryotes et atteindre la lamina propria : i) ces substances diluées dans le lumen intestinal peuvent être reconnues par une catégorie de cellules épithéliales spécialisées appelées cellules Microfold (M cells) et être transférées vers les plaques de Peyer en sous couche (agrégation de tissu lymphoïde généralement trouvé dans la partie basse du petit intestin); ii) les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) comme les cellules dendritiques (DCs) associées à la monocouche de IEC peuvent aussi étendre leurs dendrites entre les jonctions étroites et atteindre ainsi les bactéries ou les antigènes localisés dans le lumen (Rescigno et al, 2001); iii) enfin, certains vecteurs fondés sur des espèces pathogènes atténuées peuvent exprimer des invasives reconnues par les cellules épithéliales et envahir la monocouche d'IEC pour atteindre la lamina propria (Gewirtz et Madara, 2001). Une fois à l'intérieur de la cellule, les bactéries localisées dans le phagolysosome sont normalement sujettes à la dégradation. Certains vecteurs pathogènes atténués comme *Listeria monocytogenes* peuvent sécréter des cytolysines (Lysteriolysin O – LLO) qui peuvent générer des pores dans la membrane phagosomale et permettre au plasmide de s'extirper du phagolysosome pour rejoindre le noyau de la cellule. L'antigène d'intérêt peut ainsi être produit en utilisant le système de transcription de la cellule eucaryote (Faurez et al, 2010 ; Liu, 2010).

Deux hypothèses fondées sur ces connaissances ont été élaborées pour expliquer comment LL pouvait transférer des vaccins à ADN à des cellules épithéliales :

- 1- Les bactéries pourraient être lysées dans le lumen intestinal, libérant ainsi le vaccin à ADN qui pourrait alors être pris en charge par les IECs, les M cells et/ou les DCs.
- 2- Les bactéries elles même pourraient être prises en charge par les IECs, DCs et/ou M cells.

Notre groupe de recherche a décidé d'évaluer la seconde hypothèse en construisant des souches recombinantes de *L. lactis* invasives de manière à augmenter les interactions entre bactéries et la monocouche d'IECs.

L'une de ces souches permet l'expression de Fibronectin Binding Protein A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (LL-FnBPA+) (Innocentin et al, 2009). Des essais *in vitro* ont montré que cette souche était capable de transférer un vecteur d'expression eucaryote dans des IECs (lignée Caco-2) de manière plus efficace que la souche sauvage correspondante. Cependant, l'utilisation de cette souche dans des essais d'immunisation présente certaines limites dans la mesure où la liaison de FnBPA dépend de l'accessibilité de la fibronectine *in vivo*. Une autre de ces souches produit l'internaline A (InIA) de *Listeria monocytogenes* (LL-InIA+) (Guimaraes et al, 2005). Cette souche est capable de transférer plus d'ADN dans des IECs (lignée Caco-2) *in vitro* en comparaison avec la souche sauvage. Cependant son utilisation *in vivo* est très limitée car l'InIA ne peut pas se lier au récepteur murin, l'E-cadhérine. Même si les souches LL-FnBPA+ et LL-InIA+ s'avèrent être de meilleurs outils que la souche sauvage de Lactocoques pour transférer des vaccins à ADN *in vitro*, le mécanisme de transfert reste inconnu.

Ainsi, des souches de *L. lactis* exprimant InLA mutée (LL-mInIA+), une invasine capable de se lier à l'E-cadherine murine, ont été construites durant le travail présenté, et leur capacité à transférer de l'ADNc du principal allergène du lait de vache, la β -lactoglobuline, (BLG), a été étudiée dans différents modèles expérimentaux. Nous avons aussi étudié la capacité de LL-mInIA+ à transférer de l'ADNc de BLG à des cellules épithéliales de souris après des essais d'immunisation. De plus, nous avons mesuré la réponse immunitaire générée après l'administration *in vivo* de souches invasives ou non invasives, ainsi que la capacité de ces souches à transférer des vaccins à ADN à des cellules présentatrices d'antigènes (DCs).

Le second chapitre de ce manuscrit, où nous présentons les premiers résultats obtenus, concerne la caractérisation de la souche LL-mInIA+ en tant que véhicule pour le transfert du vecteur d'expression eucaryote pValac :BLG, construit par Pontes et collaborateurs (2012), que ce soit *in vitro* ou *in vivo* à des IECs. Tout d'abord, la souche sauvage *L. lactis* NZ9000 a été transformée avec le plasmide pOri253 :mInIA portant le gène mInIA de *Listeria monocytogenes*. Des analyses en cytométrie de flux confirment que la nouvelle souche exprime bien mInIA à sa surface. Cette souche s'avère 1000 fois plus invasive que la souche sauvage après co-incubation avec des cellules Caco-2. Des images par microscopie confocale confirment cette propriété invasive, la souche recombinante LL-mInIA+ ayant été localisée à l'intérieur des cellules Caco-2. Par la suite, la souche *L. lactis* produisant mInIA a été transformée avec le plasmide pValac :BLG (LL-mInIA+ BLG) et sa capacité à transférer de l'ADNc de la BLG a été mesurée. La souche invasive LL-mInIA+ BLG et la souche non invasive LL-BLG ont été co-incubées avec des cellules Caco-2 et, après 3 jours, l'expression de BLG par les cellules eucaryotes a été évaluée par ELISA. Nous montrons que les propriétés invasives augmentent le transfert de plasmide dans la mesure où les cellules Caco-2 incubées avec LL-mInIA+

BLG produisent plus de BLG que les cellules incubées avec LL-BLG. Après les essais *in vitro*, nous sommes passés aux essais *in vivo* sur des souris en leur administrant de manière intragastrique les souches LL-BLG ou LL-mInIA+ BLG pendant trois jours consécutifs, avec prélèvement du petit intestin pour isoler les IECs. Le transfert d'ADN de BLG est légèrement augmenté grâce à la production de mInIA. Cependant, nous ne mettons en évidence aucun avantage significatif à utiliser la souche LL-mInIA+BLG par rapport à la souche LL-BLG. Ces résultats nous incitent à penser que le transfert de plasmide *in vivo* résulte de 2 mécanismes : la capture des bactéries et du plasmide par les cellules épithéliales spécialisées (cellules Microfold M) ou IECs, car *L. lactis* est une espèce bactérienne qui ne s'implante pas et qui ne survit pas dans le tractus gastro-intestinal (TGI).

Le troisième chapitre est consacré aux études engagées en matière de réponse immunitaire générée après immunisation orale ou intra nasale avec les souches non invasive LL-BLG ou invasive LL-FnBPA+ BLG et LL-mInIA+ BLG. Il est connu que l'administration d'un plasmide codant pour des antigènes génère classiquement une réponse immunitaire de type 1 (Th1) impliquant des cellules T helper. Afin de vérifier si le même profil immunitaire peut être obtenu après des essais d'immunisation impliquant des souches de *L. lactis* invasives, nous avons traité des souris de manière orale ou intra nasale avec ces souches et une réponse immunitaire primaire spécifique de la BLG a été suivie. Nous avons montré qu'après administration orale ou intra nasale avec la souche invasive LL-FnBPA+ BLG, une réponse immunitaire de type Th2 était observée chez la souris comme indiqué par la détection de cytokines IL-4 et IL-5. Au contraire, l'administration orale ou intra nasale de la souche non invasive LL-BLG provoque une réponse immunitaire de type Th1 caractérisée par la détection d'IFN γ . Afin d'évaluer la capacité des souches à empêcher une réponse immunitaire allergique, les souris prétraitées par voie nasale avec les deux souches considérées, ont été sensibilisées avec la BLG et la réponse immunitaire a été mesurée. Après sensibilisation, nous détectons une plus faible concentration d'IgE spécifique de la BLG chez les souris immunisées avec la souche non invasive de *L. lactis*. Ce résultat était attendu car les cellules immunitaires de type Th1, qui sont induites par la souche non invasive de *L. lactis*, peuvent supprimer l'apparition de réponse immunitaire allergique (Romagnani, 2004). Les cytokines IL-4 et IL-5 sont détectées à un niveau plus élevé chez les souris sensibilisées et préalablement immunisées par voie orale ou intra nasale avec des lactocoques invasifs. Afin de vérifier si le profil Th2 induit est dû à l'expression d'invasines en surface de *L. lactis*, nous avons administré la souche LL-mInIA+BLG à des souris conventionnelles puis mesuré la réponse immunitaire induite. Nous avons à nouveau observé une orientation vers le profil Th2 en utilisant les lactocoques recombinant invasifs LL-mInIA+ BLG. Afin de déterminer si une altération de la paroi bactérienne pouvait être à l'origine de cette orientation immunitaire, nous avons examiné la composition en peptidoglycanes des parois dans les souches invasives et non

invasives, mais aucune différence n'a été mise en évidence. En conclusion, nous avons démontré que l'expression d'invasines en surface de *L. lactis* modifie ses propriétés immunomodulatrices.

Le quatrième chapitre présente les études *in vivo* pratiquées dans l'objectif d'apporter un nouvel éclairage sur les mécanismes de transfert de plasmide en utilisant des Lactocoques invasifs ou non invasifs. Tous les travaux concernant le transfert de plasmide avec *L. lactis* réalisés par notre groupe ou les autres, ont impliqué les IECs en tant que modèle de mesure du transfert. Ce travail porte sur les propriétés de transfert d'ADN de LL aux cellules dendritiques (DCs), car ces cellules constituent les principales cellules présentatrices d'antigène de l'organisme et les premières à être en contact direct avec les antigènes dans le TGI.

Nous avons montré que des souches non invasives de *L. lactis*, ou des souches invasives exprimant soit FnBPA de *S. aureus*, soit mInIA de *L. monocytogenes*, pouvaient transférer des BMDCs (bone marrow-derived DCs) et transférer l'ADNc de BLG. Ces propriétés invasives s'avèrent avantageuses et facilitent le contact entre bactérie et cellule, permettant une meilleure translocation du plasmide pValac :BLG. De plus, des BMDCs cultivées en présence de Lactocoques non invasifs ou invasifs ont la capacité de sécréter des niveaux élevés de cytokine pro-inflammatoire IL-12, ce qui suggère que cette réponse immunitaire aux MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) naturellement présents chez *L. lactis*, n'est pas reliée à l'expression de BLG par les BMDCs ou aux invasines mInIA et FnBPA. Afin de comprendre comment les lactocoques interagissent avec les IECs ou les DCs de l'épithélium intestinal, nous avons utilisé une monocouche de cellules Caco-2 comme modèle reproduisant la situation *in vivo*, dans laquelle les bactéries et les antigènes rencontrent une couche protectrice de cellules épithéliales. Tout d'abord, nous avons vérifié que les souches invasives (LL-FnBPA+ et LL-mInIA+) étaient capables de pénétrer la monocouche plus efficacement que la souche sauvage. La co-incubation de bactéries avec des cellules Caco-2 polarisées montre que LL-mInIA+ est 100 fois plus invasive que LL, et autant que la souche LL-FnBPA+. De plus nous avons étudié le dialogue entre IECs différenciées, BMDCs et bactéries en utilisant un modèle de co-culture *in vitro* par Transwell. La co-incubation de souches avec le modèle de co-culture montre que les DCs en contact avec la souche LL-mInIA+ BLG expriment des niveaux plus importants de BLG. Ce phénomène n'est pas observé avec les souches LL-FnBPA+BLG et LL-BLG. Le fait que seule la souche produisant mInIA aboutit à un transfert de plasmide peut être dû à l'expression du récepteur E-cadhérine par les BMDCs, facilitant ainsi le contact et la capture des bactéries.

L'utilisation de *L. lactis* en tant qu'outil de transfert d'ADN s'avère être une alternative prometteuse en matière de nouveaux vaccins muqueux. Considéré globalement, nous pensons que ce travail apporte de nouvelles informations sur les mécanismes à l'origine du transfert de plasmide

par *L. lactis* dans des cellules eucaryotes. Ces données pourront faciliter son utilisation en tant que vecteur d'immunisation dans un futur proche. Les outils décrits dans ce travail pourront aussi mener à la construction de nouveaux vaccins fondés sur *L. lactis*.

III. SOMMAIRE DE LA THESE

Ce manuscrit est organisé en six chapitres et deux appendices. On trouvera ci-dessous une brève description de leur contenu :

Chapitre 1 : Introduction de la thèse concernant les vaccins à ADN, les principes immunologiques de l'immunisation génétique et les vecteurs utilisés pour transférer des plasmides avec en particulier l'utilisation de bactéries, notamment les bactéries lactiques (BL), natives ou recombinantes, en tant que vecteurs de vaccination. Ce chapitre décrit également les principaux mécanismes d'interactions entre BL et le système immunitaire associé à l'épithélium intestinal dans le transfert d'ADNc, par exemple l'ADNc du principal allergène du lait de vache, la B-lactoglobuline.

Chapitre 2 : Présenté sous forme d'un article scientifique, il décrit l'utilisation d'une nouvelle souche recombinante de *L. lactis* exprimant une invasine dérivée de *Listeria monocytogenes* en tant que vecteur de transfert d'ADN *in vitro* ou *in vivo* dans des cellules épithéliales issues de souris BALB/C. Cet article est paru dans BMC Microbiology.

Chapitre 3 : Présenté sous forme d'article scientifique, il décrit les différentes réponses immunitaires obtenues après des essais d'immunisation avec des souches natives ou recombinantes exprimant à leur surface des invasines issues de bactéries pathogènes. Cet article est en révision positive dans PloS One.

Chapitre 4 : Egalement présenté sous forme d'article scientifique, il décrit la capacité de souches invasives de *L. lactis* de transférer des plasmides à des cellules dendritiques *in vitro*. Ce travail sera bientôt soumis pour publication.

Chapitre 5 : Conclusion générale portant sur les résultats obtenus dans les chapitres 2, 3 et 4, et futures orientations de l'étude.

Chapitre 6 : Références

Appendice 1 : Présenté sous forme d'article scientifique, cette partie décrit l'utilisation d'une souche de *L. lactis* exprimant l'internaline A mutée et la listériolysine O, deux protéines issues de *L. monocytogenes*, en tant que vecteur potentiel pour l'immunisation génétique ou contre la listéria.

Appendice 2 : Revue bibliographique sur l'utilisation de probiotiques ou de probiotiques recombinant dans le traitement de maladies allergiques. Cette revue est parue dans Journal of Applied Microbiology.