REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Génie de l'Environnement

Thème

Criblage de molécules biologiques d'origine microbienne en vue d'activité cytotoxique: Comparaison avec l'effet des rayonnements ionisants

Présentée par

Mme ABERKANE Lila épouse MECHEBBEK

Présenté(e) et soutenue publiquement le **Jeudi 22 /04 / 2021 à 11h.**

Composition du Jury:

Président: Mr Madani DROUICHE, Professeur, Département de Génie de l'Environnement (ENP).
Rapporteur: Mme Farida NATECHE-METIAZ, Professeur, Faculté de biologie (USTHB).
Co-Rapporteur: Mr Nabil MAMERI, Professeur, Département de Génie de l'Environnement (ENP).
Examinateur: Mme Salima GANA–KEBBOUCHE, Professeur, Université de Boumerdes (UMBB).
Examinateur: Mme Radia CHEMLAL, (MCA), Faculté de biologie (USTHB).
Examinateur: Mme Rym SALAH-TAZDAÏT, (MCA), Département de Génie de l'Environnement (ENP).
Examinateur: Mr Djaber TAZDAÏT, (MCA), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO).
Invitée: Mme Assia DJEFAL-KERAR, PhD (Chercheur senior) Centre de Recherche Nucléaire d'Alger.

ENP 2021

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Génie de l'Environnement

Thème

Criblage de molécules biologiques d'origine microbienne en vue d'activité cytotoxique: Comparaison avec l'effet des rayonnements ionisants

Présentée par

Mme ABERKANE Lila épouse MECHEBBEK

Présenté(e) et soutenue publiquement le **Jeudi 22 /04 / 2021 à 11h.**

Composition du Jury:

Président: Mr Madani DROUICHE, Professeur, Département de Génie de l'Environnement (ENP).
Rapporteur: Mme Farida NATECHE-METIAZ, Professeur, Faculté de biologie (USTHB).
Co-Rapporteur: Mr Nabil MAMERI, Professeur, Département de Génie de l'Environnement (ENP).
Examinateur: Mme Salima GANA–KEBBOUCHE, Professeur, Université de Boumerdes (UMBB).
Examinateur: Mme Radia CHEMLAL, (MCA), Faculté de biologie (USTHB).
Examinateur: Mme Rym SALAH-TAZDAÏT, (MCA), Département de Génie de l'Environnement (ENP).
Examinateur: Mr Djaber TAZDAÏT, (MCA), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO).
Invitée: Mme Assia DJEFAL-KERAR, PhD (Chercheur senior) Centre de Recherche Nucléaire d'Alger.

ENP 2021

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط والقدرة السامة للخلايا لعصيات ثورينجينز المعزولة من التربة الجزائرية ضد الخلايا السرطانية. في الواقع ، يتم دراسة فئة من البروتينات البلورية غير المُحللة للدم وغير المبيدات الحشرية من :*Bacillus thuringiensis* البارسبورينات (PS) ، على أنها عوامل واعدة مضادة للسرطان بسبب سميتها النوعية للخلايا السرطانية. مجموعه 48 *Bacillus spp.* تم عزلها من مواقع مختلفة في الجزائر . أكدت الاختبارات المظهرية والكيميائية الحيوية ، والتعرف الجزيئي لـ *16S* rRNA والمراقبة المجهرية للكريستال على تحديدBt في عشر سلاسل. تم إجراء فحص البروتينات البلورية غير المحللة للدم. استخلاص وتنقية وتنشيط البروتينات غير الحالة للدم عن طريق التحليل الكروماتوجرافي الناتج عن عدة أوزان جزيئية مختلفة متعددة الببتيدات. تم تحديد PS1 المنقى ببروتين مؤيد يبلغ 81 كيلو دالتون والعديد من الببتيدات ذات الوزن الجزيئي المختلف (18-58 كيلو دالتون) بعد التنشيط عن طريق التربسين من .*BDzG* strain تم ترميز تسلسل NH2 الطرفي بواسطة تحليل BLAST مع بروتين .Bt PS1 بالإضافة إلى ذلك ، تم إجراء فحص لجين بارسبورين 1.(PS1) .النشاط السمي للخلايا نحو نوع ظهارة الإنسان 2 ؛ تمت ملاحظة الخلايا السرطانية للحنجرة البشرية (HEp2) باستخدامIC_{50} يساوي 2.33 ميكروغرام / مل ، في حين تم توضيح السمية المعدلة للخلايا تجاه الخلايا الظهارية السنخية القاعدية البشرية (A549) باستخدام IC_{50} يساوي 18.54 ميكروغرام / مل. لا توجد سمية خلوية للخلايا الطبيعية. كشف الفحص المجهري المفسفر، كروماتين مكثف أو مجزأ ، يشير إلى موت الخلايا المبرمج لخلايا .HEp2 سمح لنا تشعيع الخلايا السرطانية HEp2 و A549بتأكيد أنها مقاومة للإشعاع بقيم SF2 0.58 و 0.74 على التوالي. العلاج الجديد (العلاج باستخدام (PS1-BDzG + δRay))على الخلايا السرطانية يعد أمرًا واعدًا جدًا فقط للخلايا السرطانية A549 ، حيث يتم ملاحظة التأثير التآزري ؛ هذا ليس هو الحال بالنسبة لخلايا السرطان HEp2 ، العلاج الطبيعي مع *BDzG*-PS1 أكثر من كافٍ .يمكن أن يستنتج من هذا العمل أن البارسبورين -1 المعزول من التربة الجزائرية يمكن أن ينضم إلى ترسانة الأدوية الطبيعية المضادة للسرطان ذات الإمكانات العلاجية العالية ويمكن استخدامه في العلاج الإشعاعي الموجه بالتزامن مع الإشعاع δ المؤين بجرعات منخفضة كمسبب للإشعاع .

الكلمات المفتاحية : *Bacillus thuringiensis* ،Parasporin، السمية الخلوية ، زراعة الخلايا ، تأثيرات الإشعاع ، موت الخلايا المبرمج.

Abstract

The aim of this workis to study the activity and cytotoxic potential of *Bacillus thuringiensis* strain isolated from Algerian soil against cancer cells. Indeed, a class of non-insecticidal and non-haemolytic crystalline proteins of *Bacillus thuringiensis*: parasporins (PS), are being studied as promising anti-cancer agents because of their specific toxicity to cancer cells. A total of 48 *Bacillus spp*. isolate have been isolated from different sites in Algeria. Phenotypic and biochemical tests, molecular identification of *16S* rRNA and microscopic observation of the crystal confirmed the identification of Bt in ten strains. Screening for non-haemolytic crystalline proteins was carried out. Extraction, purification and activation of the non-haemolytic proteins by chromatographic analysis resulted in several polypeptides with different molecular weights. A purified PS1 with a pro-protein of 81 kDa and several peptides of different molecular weight (18-58 kDa) after activation by trypsin was identified from the *BDzG* strain. The NH2-terminal sequence deciphered by BLAST analysis showed homology with a Bt PS1 protein. In addition, screening of the parasporin 1 (PS1) gene was also performed. Cytotoxic activity towards human epithelium type 2; human laryngeal carcinoma cells (HEp2) were observed with an IC_{50} equal to 2.33 µg/ml, while moderate cytotoxicity towards human adenocarci1nomic basal alveolar epithelial cells (A549) was demonstrated with an IC_{50} equal to 18.54 µg/ml. No cytotoxicity to normal cells was found. Fluorescence microscopy revealed condensed or fragmented chromatin indicating apoptotic death of HEp2 cells. Irradiation of the HEp2 and A549 cancer cells allowed us to confirm that they are radioresistant with SF2 values of 0.58 and 0.74 respectively. Neoadjuvant therapy (treatment with PS1-BDzG +δ ray) on cancer cells is very promising only for A549 cancer cells, where a synergistic effect is observed; this is not the case for HEp2 cancer cells where monotherapy with PS1-*BDzG* is more than sufficient.

It can be concluded from this work that the parasporin 1 of the *BDzG* strain isolated from Algerian soil could join the arsenal of natural anti-cancer drugs with high therapeutic potential and could be used in targeted radiotherapy in concomitance with gamma ionising radiation in low doses as a radio-sensitiser.

Keywords : Apoptosis, *Bacillus thuringiensis*, Cell culture, Cytotoxicity, Parasporin, Radiation effects.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité et le potentiel cytotoxique des isolats de souches *Bacillus thuringiensis* isolées du sol algérien contre les cellules cancéreuses. En effet, une classe de protéines cristallines non insecticides et non hémolytiques de *Bacillus thuringiensis* : les parasporines (PS), sont étudiées comme des agents anticancéreux prometteurs en raison de leur toxicité spécifique envers les cellules cancéreuses. Au total, 48 isolats de *Bacillus spp.* ont été isolés à partir de différents sites en Algérie. Des tests phénotypiques et biochimiques, l'identification moléculaire de l'ARNr *16S* et l'observation microscopique du cristal ont confirmé l'identification de Bt pour dix souches. Un criblage des protéines cristallines non hémolytiques a été effectué. L'extraction, la purification et l'activation des protéines non hémolytiques par analyse chromatographique ont permis d'obtenir plusieurs polypeptides de poids moléculaires différents. Une PS1 purifiée, avec une pro-protéine de 81 kDa et plusieurs peptides de poids moléculaires différents (18-58 kDa) après activation par la trypsine a été identifiée à partir de la souche *BDzG*. La séquence NH2-terminale déchiffrée par l'analyse BLAST a montré une homologie avec une protéine Bt PS1. En outre, le criblage du gène de la parasporine 1 (PS1) a également été effectué. Une activité cytotoxique envers l'épithélium humain de type 2 ; des cellules humaines de carcinome laryngé (HEp2) ont été observées avec une IC_{50} égale à 2,33 µg/ml, tandis qu'une cytotoxicité modérée envers les cellules épithéliales basales alvéolaires humaines adénocarcinomiques (A549) a été démontrée avec une IC_{50} égale à 18,54 µg/ml. Aucune cytotoxicité envers les cellules normales n'a été constatée. La microscopie à fluorescence a révélé une chromatine condensée ou fragmentée indiquant la mort apoptotique des cellules HEp2. L'irradiation des cellules cancéreuses HEp2 et A549 nous a permis de confirmer que ces dernières sont radio résistantes avec des SF2 de 0.58 et 0.74 respectivement. La thérapie néoadjuvante (traitement par la PS1-*BDzG*+rayonnement) sur les cellules cancéreuses est très prometteuse seulement pour les cellules cancéreuses A549, où l'on observe un effet synergique ; ce qui n'est pas le cas pour les cellules cancéreuses HEp2 où la monothérapie par la PS1-*BDzG* suffit amplement. On peut conclure de ce travail que la parasporine 1 de la souche *BDzG* isolée du sol Algérien pourrait rejoindre l'arsenal des médicaments anticancéreux naturels à fort potentiel thérapeutique et pourrait être utilisée en radiothérapie ciblée en concomitance avec le rayonnement ionisant gamma de faibles doses comme radio-sensibilisateur.

Mots clés : Apoptose, *Bacillus thuringiensis*, Culture cellulaire, Cytotoxicité, Effets des radiations, Parasporine.

Je remercie **ALLAH, le tout puissant** pour la santé, la volonté et la patience qu'il m'a donné pour surmonter toutes les épreuves vécues au cours de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à ma directrice de thèse le professeur **NATECHE-METIAZ Farida** pour avoir encadré patiemment ce travail, et Dieu seul sait à quel point elle était patiente !! Pour ses précieuses remarques constructives, pour son soutien permanant, ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse. La confiance et la liberté qu'elle m'a accordées ont été stimulantes et m'ont permis de m'épanouir scientifiquement et personnellement au travers de cette thèse. Pour toutes ces raisons, et bien d'autres, je lui resterai très reconnaissante à jamais.

Je tiens à remercier vivement Monsieur le Professeur **MAMERI Nabil** mon co-directeur de thèse pour les encouragements et soutien qu'il m'a prodigué au cours de ces années de thèse. Je tiens aussi à exprimer ma sincère gratitude à mon ancien co-directeur de thèse le Professeur **GRIB Hocine** qui a accepté de me prendre sous son aile tout au long de ces années de thèse, je ne le remercierai jamais assez pour sa disponibilité et ses orientations scientifiques et surtout pour sa gentillesse.

Je tiens à exprimer au Professeur **DROUICHE Madani** mes sincères remerciements pour l'immense honneur qu'il me fait de siéger dans ce jury de thèse et le privilège d'en assurer la présidence.

Je remercie chaleureusement Madame le Professeur **GANA-KEBBOUCHE Salima** pour m'avoir honoré en acceptant d'évaluer ce travail. Veuillez trouver ici Madame, l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Je suis également très honorée que le Dr **CHEMLAL RADIA** ait accepté de siéger dans ce jury de thèse et d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Je remercie chaleureusement Dr **SALAH-TAZDAIT Rym** pour l'immense honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'évaluer ce travail. Veuillez trouver ici Madame, l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Dr **TAZDAIT Djaber**, et mes plus sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie chaleureusement Dr **DJEFAL-KERRAR Assia**, Directrice du laboratoire de radiobiologie pour sa grande gentillesse, son soutien, sa confiance en moi et ses encouragements tout au long de ces années et surtout pour les longues journées passées à faire naitre notre article scientifique et pour la rédaction de cette thèse, je lui suis reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordée. Je la remercie également pour avoir accepté de prendre part au jury de soutenance en tant qu'invitée, tout le plaisir est pour moi; je la remercie aussi pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma sincère gratitude pour tout cela.

Je ne pourrais jamais assez remercier toute l'équipe de radiobiologie du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger; ma deuxième famille pour leur aide et leur soutien, chacun d'entre eux, a participé à sa manière à mettre sur pieds ce travail :, Mme AOUALLOUCHE-ABDOUN Khalida (Chef de Département des Applications Médicales) pour sa présence et sa gentillesse, Mme NACER-KHODJA Assia pour ses conseils précieux et ses innombrables orientations, Mme GAIS-SELLIDJ Soumayya, Mme OUDIH-BENAMER Samah, Mme AMARA-HAMAI Hadjira; Mme ARABI-HOCINE Malika, Mr AIT SAID Nacer, Mr BACHTOBDJI Khair-Eddine, Mr DJERAD Amar, Mr OUAFEK Abdelhakim, Mme NEGACHE-LAMARI Houria, Mme MEGUENNI-BOUKANDOURA Houria, Mr MAHLOUS Mohammed, Mme CHERIGUENE Raihana, Mme BOUTOUHA Leila, Mme BOUBEKEUR Yasmina, Mr TAHTAT Djamel, Mr MANSOURI Belgacem, Mr YEFSAH Rabah, Mme ABDELHAFID Karima, Mme LOUNI Ouassila, Mme AOURAGH Khadidja, Mme BOUKETIR-SOUILAH Souad, Mlle SAIDANI Nissa, Mme MAHLOUS Sonia, Mr MOULLA Adnane Sofi pour sa gentillesse et son aide surtout lors de la rédaction de mon article en Anglais, Mr ADJERAD Athmane pour son aide infinie pour tout ce qui est statistique et courbes.

A mes amies, plutôt mes sœurs : Samah, Meriem, Malika, Hadjira, Soumayya, Assia, Khalida, Maya et Assia.

Je ne remercierai jamais assez HAMIDA la secrétaire du département de Génie de l'environnement de l'ENP, sa gentillesse, son amabilité ont fait d'elle une personne très chère pour moi.

Je remercie également M. TOUKAL Rachid, L'ancien Directeur général du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger qui m'a aidé, et mis à ma disposition tous les moyens pour mener à bien mon travail malgré toutes ses responsabilités administratives et ses nombreuses occupations qu'il puisse trouver dans ces remerciement le témoignage de ma gratitude.

Je remercie aussi Monsieur le Commissaire du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger, Dr MELLAH Abdelhamid, qui a toujours facilité mes démarches administratives afin de mener à bien mon travail.

Je remercie aussi chaleureusement Madame la Directrice Générale du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger Dr MOKRANI-LOUNIS Zahra pour ses encouragements.

À tous mes enseignants de graduation et post- graduation sans oublier le Professeur BENAMAR Mohamed El amine (Promoteur Ingéniorat) et le Professeur LOUNICI Hakim (Promoteur Magister), je leurs suis très reconnaissante.

Je remercie également les gens merveilleux que j'ai eu la chance de rencontrer lors de mes manipulations à l'UMBB et qui m'ont énormément aidés parmi eux : Loundja, Dr Lahyani, Dr Amghar, Pr Riba….

A la mémoire de Mme ABDI Nadia, Professeur à l'ENP, sa gentillesse et sa douceur ont fait d'elle une personne inoubliable qu'elle repose en paix.

Je remercie tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de cette thèse

J'espère que je n'ai oublié personne !!!

Je vous dis encore une fois MERCI !!

DÉDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut….

Tous les mots ne s'auraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance…

Ainsi, c'est tout simplement que

Je dédie ce travail,

A mes très chers parents,

Papa, ta présence, tes encouragements et tes conseils m'ont toujours encouragé à avancer vers l'avant. Ton amour, ta chaleur paternelle sont pour moi et seront toujours d'un grand réconfort.

Ma maman chérie, ma douceur, mon havre de paix, ma boussole, sache que ton amour inconditionnel, tes sacrifices tout au long de ces années m'ont permis d'avancer dans cette vie très sereinement.

Mon mari Yacine, ta présence à mes côtés m'ont permis d'avancer encore et encore et ton amour m'a donné la force d'y parvenir.

Mes trésors, la prunelle de mes yeux, mes enfants : Maya, Yanis et Nassim je vous adore.

Ma très chère sœur Mounia, son mari Rachid et leurs enfants : Samy, Mourad et Elias. Mon très cher frère Younes, sa femme Fairouz et leurs enfants : Adam et le tout petit Elias.

A ma belle-famille MECHEBBEK je vous dis à chacun merci pour votre aide, surtout à ma belle-sœur Farida et sa petite famille.

A tous mes tantes et oncles maternels et paternels (Familles ABERKANE et NAAB)

Une triste pensée va à la mémoire de personnes qui me sont chères qui nous ont quittés laissant derrière eux un vide que nul ne pourra combler.

Mes oncles Mourad et Mohamed Akli, ma tante Sekoura et enfin mon cousin Mebarek qui nous a quitté à la fleur de l'âge, Allah yerhamkoum…

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment ☺

« Lorsque vous poursuivez vos objectifs guidés par vos valeurs dans le contexte de vos rêves, des miracles se produisent… »

Paul Mckenna

SOMMAIRE

Liste des figures……
Liste des tableaux……
Liste des abréviations……

INTRODUCTION…….……. 30

CHAPITRE I : Rappels bibliographiques

1. Le cancer…….……. 34
1.1. Epidémiologie……..…. 34
1.2. Les étapes de la cancérisation……..…. 35
- **L'initiation** ……..……. 35
- **La promotion**……..…. 35
- **La progression**……. 35

1.3. Caractéristique d'une cellule cancéreuse……..... 36
1.3.1. Autosuffisance en signaux de croissance (Capacité acquise)……..... 37
1.3.2. Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance (anti-croissance)…….. 38
1.3.3. Esquive à la mort cellulaire programmée (Apoptose)……. 38
1.3.4. Un potentiel de réplication illimité (capacité acquise)……..... 41
1.3.5. Angiogenèse soutenue (capacité acquise)……..... 41
1.3.6. Invasion tissulaire et métastase (capacité acquise)…….……... 42
1.3.7. Une caractéristique habilitante : Instabilité du génome……. 43
1.4. Mort cellulaire……..... 44
1.4.1. Généralités……..... 44
1.4.2. L'apoptose……..……... 44
1.4.2.1. Déroulement de l'apoptose……...…….. 45
a) Phase d'induction……..……. 46
- ✓ **La voie intrinsèque ou mitochondriale**……..……. 46
- ✓ **Voie extrinsèque des signaux extracellulaires**……..……. 47

b) Phase effectrice ou d'exécution de l'apoptose……..… 48
c) Phase de destruction cellulaire et d'élimination……. 48
1.4.2.2. Structure et fonctions des caspases, les protéines effectrices de l'apoptose…. 48
1.4.3. La nécrose……..……..……... 49
1.4.4. L'autophagie……..…….. 50
1.4.5. La sénescence……..…….. 51
1.5. Traitement du cancer……..……..… 52
1.5.1. La chirurgie……..……... 52
1.5.2. La chimiothérapie……...……..……... 52
1.5.3. L'immunothérapie……..……..……... 53
1.5.4. L'hormonothérapie……..…… 53
1.5.5. La thérapie génique ……..……..……..... 53
1.5.6. La phytothérapie……..……..…. 54
1.5.7. Les thérapies ciblées……..…… 54
1.5.8. La radiothérapie (RT)……... 55

2. *Bacillus thuringiensis (Bt)*…… 56
2.1. Histoire de *Bacillus thuringiensis*…… 57
2.2. Classification de *B. thuringiensis*…… 58
2.3. Cycle biologique de *Bacillus thuringiensis*…… 59
a. Croissance végétative…… 59
b. Transition à la sporulation…… 59
c. Sporulation …… 59
d. Maturation de la spore et lyse cellulaire…… 60
2.4. Culture de *B. thuringiensis*…… 60
- **Facteurs affectant la production de cristal…… 61**

2.5. Activité insecticide des δ-endotoxines du Bt et leur mode d'action « poison stomacal »…… 62
2.6. Les δ-endotoxines de *Bacillus thuringiensis*…… 63
2.6.1. Les toxines Cyt…… 64
a. Structure des protéines Cyt…… 64
2.6.2. Les protéines Cry…… 66
a. Structure moléculaire des toxines Cry à trois domaines (3D-Cry)…… 67

3. Les parasporines…… 69
3.1. Découverte desparasporines…… 69
3.2. Classification des parasporines…… 70
3.2.1. Parasporines appartenant à la famille des (3D-Cry) toxines (PS1, PS3 et PS6)…… 71
3.2.1.1. La parasporine1 …… 71
3.2.1.2. La parasporine 3…… 75
3.2.1.3. La parasporine 6…… 79
3.2.2. Parasporines appartenant à la famille Mtx-likeCry toxines (PS2, PS4 et PS5)… 80
3.2.2.1.La parasporine 2…… 80
3.2.2.2.La parasporine 4…… 83
3.2.2.3.La parasporine 5…… 85

4. Les rayonnements ionisants…… 87
4.1.Introduction à la radiobiologie…… 87
4.2. La mort cellulaire sous irradiation…… 88
4.3. L'apoptose radio-induite…… 88
4.4. La radiosensibilité intrinsèque et courbe de survie des cellules irradiées…… 89
4.5. Les principaux types de courbes de survie et leurs modélisations mathématiques... 90
►Le modèle de « une cible à un coup » …… 90
►Le modèle de « n cibles sublétales à un coup»…… 90
►Le modèle de « une cible à deux coups » (modèle quadratique) …… 91
►Le modèle conjuguant les deux premiers modèles « Le modèle linéaire quadratique »…… 91

CHAPITRE II : Matériels & Méthodes

1.Isolement et identification des souches…… 94
1.1. Matériels…… 94
1.1.1. Matériels biologiques…… 94

1.1.2. Milieux de culture…….…….. 95
1.1.3. Produits biologiques, chimiques et réactifs……..... 95
1.1.4. Matériels de laboratoire……. 95
1.2. Méthodologie ……....…….. 96
1.2.1. Isolement des souches bactériennes…….…….. 96
1.2.2. Identification bactériologique des souches sélectionnées……..… 96
1.2.2.1. Etude macroscopique ……..…… 97
1.2.2.2. Etude microscopique……...……. 97
- **Observation par microscopie photonique……..……..……. 97**

- Coloration Gram…….……..…….. … 97
- Coloration de la spore au vert de Malachite ……..…… 97
- Coloration du corps Parasporal (cristaux) au bleu de Coomassie G-250……... 97
- **Observation par microscopie électronique à balayage ……..…… 97**

1.2.2.3. Tests biochimiques classiques……..…….…… 98
- **Test catalase……..... 98**
- **Type respiratoire……. 98**

1.2.2.4. Biotypage de *Bacillus thuringiensis*…….…….... 99
- **Test d'hydrolyse de la lécithine……. 99**

1.2.2.5. Capacité d'hémolyse ……..……..... 99
a. Capacité d'hémolyse des souches sélectionnées…….. 99
b. Capacité d'hémolyse des protéines parasporales…….…… ……. 100
1.2.2.6. Résistance aux antibiotiques…….……. 100
1.2.2.7. Activité antibactérienne…….…… 101
1.2.2.8. Activité anti-archaebactérie ……..…..... 102
1.2.2.9. Activité antifongique…….…. 102
1.2.3. Conservation des souches ……..…….. 103

2. Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées…….…….. 104
2.1. Extraction et purification de l'ADN génomique des souches sélectionnées…..... 104
2.2. Purification des amplicons obtenus et mise en séquençage ……..…… 105
2.3. Construction de l'arbre phylogénétique……...……. 106
2.4. Extraction et dosage de la protéine parasporale…….……. 106
2.4.1. Extraction de la protéine parasporale…….…….....…… 106
2.4.1.1. Rendement de récupération…….…….. 107
2.4.2. Estimation quantitative des protéines……...…….. 107
2.4.3. Solubilisation de la protéine cristalline et activation…...…….. 109
2.4.4.Séparation électro-phorétique des protéines sur gel de polyacrylamide……..……...……. 109
a. Préparation des différents tampons…… 109
b. Révélation des protéines……..... 110
c. Détermination de la masse molaire des protéines……..... 111
2.5. Purification des protéines par chromatographie d'exclusion moléculaire…… 111
a. Conditions opératoires…….…….. 111
b. Détermination des masses moléculaires des fractions protéiques…… 113
2.6. Purification des fractions protéiques par électrophorèse séparative…….. 113
2.7. Recherche des gènes codant pour la parasporine 1, 2, 3 et 4…… 114
2.8. Séquençage NH2 terminal de la parasporine1…… 115

3. Activité cytotoxique des fractions protéiques et de la protéine cristalline…….. 116
3.1. Matériels …….. 116
3.1.1. Matériels biologiques…….. 116
3.1.2. Milieux de culture……...…… 116
3.1.3. Produits biologiques, chimiques et réactifs……..... 116
3.1.4. Matériels de laboratoire…….. 116
3.2. Méthodologie…… 117
3.2.1. Mise en culture des lignées cellulaires……...…….. 117
3.2.1.1. Décongélation des cellules ……. 117
3.2.1.2. Entretien et suivi de la culture des cellules…….…….. 118
3.2.2. Caractérisation des lignées cellulaire…….…… 119
3.2.2.1. Détermination du temps de dédoublement…….…… 119
3.2.2.2. Détection des mycoplasmes …….…… 119
3.2.3. Etude de l'activité cytotoxique et anti-prolifération des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) purifiées par chromatographie ……...…….. 119
3.2.3.1. Mise en contact des différentes fractions protéiques (PS1-*BDzG*) solubilisées et activées avec les différentes lignées cellulaires……..... 119
3.2.3.2. Evaluation de l'activité cytotoxique des fractions protéiques sur la viabilité cellulaire……..... 120
3.2.3.3. Détermination et observation de l'effet cytotoxique des fractions actives de la protéine cristalline (PS1-*BDzG*) envers les lignées cellulaire …… 121
3.2.4. Caractérisation de la mort cellulaire ……..... 121

4. Activité cytotoxique du rayonnement ionisant……..…… 123
4.1. Matériels……..... 123
4.1.1. Matériels biologiques……..... 123
4.1.2. Milieux de culture……..... 123
4.1.3. Produits biologiques, chimiques et réactifs…….…... 123
4.1.4. Equipement…….…… 123
4.2. Méthodes…….……. 124
4.2.1. Caractérisation des lignées cellulaires…….……. 124
- **Détermination du coefficient de collage (*platingefficiency*)……..... 125**
- **Détermination de la clonogénicité des cellules (survie cellulaire)……..….. 128**

4.2.2. Modélisation mathématique de la courbe de survie……..... 129
- **Détermination de la fraction de survie (SF2)…… 129**

4.2.3. Evaluation de la survie cellulaire aux rayonnements……..... 131

5. Activité cytotoxique concomitante (PS1-*BDzG*+rayonnement ionisant)……..... 131
5.1. Matériels……..... 131
5.1.1. Matériels biologiques……..…….. 131
5.1.2. Milieux de culture, Produits biologiques, chimiques et réactifs……..... 131
5.1.3. Equipement……... 131
5.2. Méthodologie……..……..…... 131

6. Analyse statistique……...… 133

CHAPITRE III : Résultats & discussions

1. Isolement et identification des souches……..... 135
1.1. Echantillonnage…….……. 135
1.2. Isolement des souches bactériennes…….……. 135
1.2.1. Etude macroscopique…….. 135
1.2.2. Etude microscopique…….……... 135
a) Observation par microscopie photonique à contraste de phase……. 135
- **Coloration Gram…… 139**
- **Coloration de la spore au vert Malachite……... 139**

b)Observation par microscopie électronique……..…….. 140
1.3. Répartition géographique des souches de *Bacillus* spp.et de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol Algérien et calcul du Bt index…… 140
1.4. Identification bactériologique des souches sélectionnées……. 143
1.4.1. Caractérisation biochimique…….. 143
1.4.2. Biotypage de *Bacillus thuringiensis*…… 144
- **Test d'hydrolyse de la lécithine…….……... 144**

1.4.3. Capacité d'hémolyse……...……. 146
1.4.3.1. Capacité d'hémolyse des souches sélectionnées……..... 146
1.4.3.2. Activité hémolytique des protéines purifiées et activées…… 147
1.4.4. Résistance aux antibiotiques…….…… 148
1.4.5. Activité antibactérienne……..…… 148
1.4.6. Activité antifongique…….……. 151
1.4.7. Activité anti-archaebactérie…….……. 153

2. Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées…….. 154
2.1. Identification génétique par la rRNA*16S*des souches sélectionnées…… 154
2.1.1. Résultats des analyses Blast …….. 155
2. 2. Construction de l'arbre phylogénétique……..…… 155

3. Extraction, solubilisation, purification de la protéine et méthodes analytiques……...…. 158
3.1. Extraction et dosage de la protéine parasporale…….. 158
3.1.1. Rendement de récupération et estimation quantitative des protéines…… 158
3.2 Estimation du poids moléculaire des protéines cristallines ……..… 161
3.3. Purification des protéines activées…….……..…… 162
3.4. Poids moléculaire des fractions protéiques……..…… 165

4. Caractérisation moléculaire……..……..…... 168
4.1. Recherche des gènes codant pour la parasporine……... 168
4.2. Séquençage du gène de la parasporine1 (PS1) de la souche *BDzG*……..... 169
4.3. Séquençage de la protéine de la parasporine1 de la souche *BDzG* …….…… 171

5. Activité cytotoxique de la protéine cristalline et ses fractions ……. 173
5.1. Caractérisation des lignées cellulaires……. 173
5.1.1. Morphologie des lignées cellulaires……..... 173
5.1.2. Détermination du temps de dédoublement……..... 173
5.1.3. Détection des mycoplasmes……..... 175

5.2. Criblage de l'activité cytotoxique et anti-proliférative des fractions protéiques de la PS1-*BDzG*…….……..…….…….. 178
5.3. Détermination de l'effet cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*)…….. 183
5.3.1. Visualisation microscopique de l'effet cytotoxique de la fraction F24 (PS1-*BDzG*)……...…….. 187
a)Observation au microscope à contraste de phase…….…… 187
b)Détermination du type de mort cellulaire induite par la PS1-BDzG……..... 191

6. Activité cytotoxique du rayonnement ionisant…….…….. 193
6.1. Caractérisation des lignées cellulaires……..……..…….. 193
- **La radio- survie cellulaire et détermination de la fraction de survie (SF2)……. 193**

6.2. Evaluation de la survie cellulaire aux rayonnements……..…… 196

7. Activité cytotoxique concomitante (PS1-BDzG+rayonnement ionisant)……. 198

CONCLUSION GÉNÉRALE& PERSPECTIVES

Conclusion générale&perspectives……..… 207

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques…….…….. 213

ANNEXES

- Annexe 1
- Annexe 2
- Annexe 3
- Annexe 4
- Annexe 5
- Annexe 6
- Annexe 7
- Annexe 8
- Annexe 9
- Annexe 10

VALORISATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Evolution du cancer en Algérie…….. **35**

Figure 2: Comment une cellule devient cancéreuse …….. **36**

Figure 3: Les caractéristiques des cellules tumorales acquises au cours de leurs mutations…… **37**

Figure 4: Les voies d'activation principales de l'apoptose……..…….. **41**

Figure 5: Schéma récapitulatif des 3 phases de déroulement de l'apoptose…….. **46**

Figure 6: Les différentes voies impliquées dans le processus de mort cellulaire apoptotique caspase dépendant et indépendant……..... **47**

Figure 7: Principales caractéristiques de la mort cellulaire par voie de nécrose et d'apoptose…… **50**

Figure 8: Les différentes étapes de la formation d'un autophagosome et les protéines impliquées…….. **51**

Figure 9: Spores (**S**) et cristaux (**C**) de *B. thuringiensis* en microscopie à contraste de phase…… **56**

Figure 10: Coupe longitudinale de *B. thuringiensis* en fin de sporulation. Observation par microscopie électronique. ……... **56**

Figure 11 : Schématisation du cycle vital d'un *B.thuringiensis*. …..……..... **60**

Figure 12: Représentation schématique du mode d'action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur une larve de moustique……..... **63**

Figure 13 : Classification des Bt toxines en se basant sur l'homologie des séquences protéiques……... **65**

Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la δ-endotoxine insecticide Cyt 2Ba de *Bacillus thuringiensis*…….. **66**

Figure 15: Structure en trois dimensions des protéines CrylAa, Cry2Aa, Cry3Aa et Cry4Ba. ……..……...…….. **68**

Figure 16: Les toxines Bt et de leur différentes applications……..….. **70**

Figure 17: Dendrogramme illustrant la relation entre les différentes parasporines existantes descendants de six familles, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 et PS6 …….….. **71**

Figure 18: Séquence nucléotidique du gène de la parasporine 1(Cry31Aa1), et la séquence d'acides aminés déduite…….……. **72**

Figure 19: Comparaison des séquences d'acides aminés déduites des régions actives de la parasporine (Cry31Aa1) avec celles des blocs conservés dans les protéines Cry de la

δ-endotoxine de *B. thuringiensis*…….. **74**

Figure 20: Structure cristalline de la forme activée de PS1Aa1…….. **75**

Figure 21: Séquence d'acides aminés déduite de la protoxine PS-3 codée par ORF2…. **77**

Figure 22: Modèle structurel de la protoxine PS-3 montrant l'organisation de la toxine Cry à trois domaines…..……..... **78**

Figure 23: Analyse SDS-PAGE de la protéine cristalline de 37kDa de *Bacillus thuringiensis* 4R2 après coloration au bleu de Coomassie…..…… **80**

Figure 24: Mécanisme d'action de la PS2……. **82**

Figure 25: Structure cristalline de la forme activée de PS2Aa1…..……. **83**

Figure 26: Caractéristiques des six différents groupes de Parasporines. PS1 (Cry31A), PS3 (Cry41A) et PS6 (Cry63A) appartenant aux toxines 3d-Cry. PS2Aa1 (Cry46Aa1), PS4 (Cry45A) et PS5 (Cry64A) appartenant aux toxines Cry de type Mtx……. **86**

Figure 27 : Courbe de survie cellulaire de cellules de mammifères après irradiation.. **90**

Figure 28: Modèle linéaire quadratique. ……..…… **92**

Figure 29 : Schéma représentant la technique utilisée pour la recherche de l'activité antifongique……..… **103**

Figure 30: Chromatographe Pharmacia LKB-UVicord SII (100cm x 2cm)…… **112**

Figure 31 : Photographies représentant les cellules adhérentes en **A** : Véro (ATCC ® CCL-81™), en **B** : HEp2 (ATCC ® CCL23™) et en **C** : A549 (ATCC ® CCL-185™).. **117**

Figure 32 : Photographies représentant l'étape de comptage du nombre de cellules dans la suspension grâce à la cellule de Malassez sous microscope photonique à inversion GX40…… **118**

Figure 33 : Photographie représentant l'Irradiateur (ELDORADO-78AECL) du laboratoire SSDL du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA)……. **124**

Figure 34 : Photographie représentant l'irradiation des cellules au rayonnement gamma du Co^{60} (Irradiateur ELDORADO-78 AECL du CRNA)……... **128**

Figure 35 : Aspect macroscopique des colonies de quelques souches isolées..... **136**

Figure 36: Photographie montrant la germination des spores des différents isolats d'aspect *Bacillus spp.* ,révélée par le test d'acétate de Na…… **137**

Figure 37 : Observation d'une souche de *Bacillus thuringiensis* (**Bt)** au microscope photonique simple **(a)** et à contraste de phase **(b)** GX100 à l'état frais et sans coloration……. **138**

Figure 38: Observation d'une souche de *Bacillus thuringiensis* (**Bt),** en forme caractéristique en chainette colorée au bleu de Coomassie Brillant, au microscope photonique à contraste de phase……. **138**

Figure 39: Observation de la forme végétative de *Bacillus spp.*après coloration de Gram; (Gram + : couleur bleue) au microscope photonique (GX100)…… **139**

Figure 40 : Observation de la spore colorée en vert et les cellules végétatives en rose au microscope photonique (GX100)…… **139**

Figure 41 : Photographies d'isolats de *B.thuringiensis* montrant certaines formes d'inclusion parasporales observées au MEB (GX12000)…….. **141**

Figure 42: Activité positive de la lécithinase sur gélose au jaune d'œuf (halo opaque).. **144**

Figure 43: Activités hémolytiques des souches isolées sur les érythrocytes humains… **147**

Figure 44 : Photographies montrant l'activité anti- bactérienne des souches sélectionnées vis-à-vis de germes pathogènes……..…… **149**

Figure 45 : Photographies montrant l'activité antifongique de quelques souches sélectionnées……. **152**

Figure 46 : Photographie montrant l'activitéanti- archaebactérie des souches S8 (-) et S9(+)…….. **153**

Figure 47 : Analyse PCR des dix souches sélectionnées…….. **154**

Figure 48 : Arbre phylogénétique des dix souches de *Bacillus thuringiensis* sélectionnées…….…. **157**

Figure 49 : Purification biphasique de la protéine parasporale (**A**), observation microscopique de la pureté de la protéine cristalline après séparation biphasique (**B**).. **158**

Figure 50: Photographie montrant les cristaux séchés …….. **159**

Figure 51: Courbe d'étalonnage des protéines déterminée par la méthode de **Bradford, (1976)**…… **160**

Figure 52 : Photographie de gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10% des protéines natives (50µg) des 10 isolats bactériens (S10-S1)……..…….. **161**

Figure 53: Droite de calibration de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephadex G-100…….. **163**

Figure 54 : Chromatogramme de la : Pro-protéine (*BDzB)* ■ solubilisée ;Protéolysée ● et de la Protéinase K (2 mg/ml) ▲…… **166**

Figure 55: Chromatogramme de la : Pro-protéine (*BDzG)* ■ solubilisée ; Activée ● et de la Trypsine pure (1 mg/ml) ▲. …… **166**

Figure 56 : Analyse Electrophorèse SDS-PAGE des protéines d'inclusion parasporale (50µg) de l'isolat *B.thuringiensis (BDzB)*……. **167**

Figure 57 : AnalyseElectrophorèse SDS-PAGE des protéines d'inclusion parasporale (50µg) de l'isolat *B.thuringiensis (BDzG)*……. **167**

Figure 58 : Recherche par PCR du gène codant pour la PS1 …….. **168**

Figure 59: Séquences de nucléotides et d'acides-aminés déduits du gène de paraporine 1 (PS1) de la souche Bt*BDzG* (**MN637834**)…… **171**

Figure 60 : Photographies morphologiques des lignées cellulaires : **(a)** HEp2, **(b)** A549 et **(c)** Véro après 24h d'incubation, observées au microscope photonique à contraste de phase (GX40) …… **174**

Figure 61 : Courbes représentants les temps de dédoublement des cellules HEp2 **(a)**, A549 **(b)** et Véro **(c)**…….. **176**

Figure 62 : La figure illustre des micrographies représentants des noyaux de cellules HEp2 (**a** &**b**) et des cellules A549 (**c** &**d**) non mycoplasmées marquées au DAPI observées au microscope à fluorescence (GX600**)**…….. **177**

Figure 63 : Histogrammes représentants l'activité cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules (HEp2 (**a**), A549(**b**) et Véro(**c**)) à 24h de contact. (Moyenne ± SD), (n=3). (*Différence significative p<0.05)…….... **180**

Figure 64 : Histogrammes représentants l'activité cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules (HEp2 (**a**), A549(**b**) et Véro(**c**)) à 48h de contact. (Moyenne ± SD), (n=3). (*Différence significative p<0.05) ……..... **181**

Figure 65 : Histogrammes représentants l'activité cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules (HEp2 (**a**), A549(**b**) et Véro(**c**)) à 72h de contact. (Moyenne ± SD), (n=3).(*Différence significative p<0.05) ……..... **182**

Figure 66 : Graphiques représentent les courbes dose-réponse des fractions cytotoxiques de la protéine PS1-*BDzG* envers les cellules HEp2 (**a**), A549 (**b**) et Véro (**c**) à 24 h post-inoculum. (Moyenne ± SD), (n=6) ……..…….... **185**

Figure 67: Box charts représentant la différence significative de l'activité cytotoxique que possède la PS1-*BDzG* envers les trois lignées cellulaires (HEp2, A549 et Véro) obtenu grâce au logiciel ANOVA oneWay……..... **186**

Figure 68: Observation de l'activité cytotoxique des protéines extraites des souches (*BDzB* & *BDzG*) envers les lignées cellulaires saine (Véro) et cancéreuses (HEp2 & A549) au microscope à contraste de phase……..... **190**

Figure 69: Changements morphologiques des cellules HEp2 après 24h de traitement avec la protéine PS1- *BDzG*……. **192**

Figure 70 : Observation à l'œil nu de clones sur boite T25 **(a),** Observation au microscope à contraste de phase d'un clone cellulaire de la lignée A549 après coloration au bleu de Giemsa **(b)**……..…. **193**

Figure 71: Courbe de survie des cellules HEp2……... **195**

Figure 72 : Courbe de survie des cellules A549…….. **195**

.

Figure 73 : Courbe de survie des cellules Véro. …….. **195**

Figure 74 : Histogramme représentant la comparaison de l'effet de la dose d'irradiation au rayonnement gamma envers la viabilité des trois lignées cellulaires évalué par le test MTT……..... **197**

Figure 75: (A) Estimation de la viabilité cellulaire des HEp2 sous l'effet du traitement concomitant (PS1-*BDzG* + irradiation gamma)**; (B)** Histogramme représentant les IC_{50} du traitement concomitant envers la lignée HEp2. Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3)…… **202**

Figure 76: (A) Estimation de la viabilité cellulaire des A549 sous l'effet du traitement concomitant (PS1-*BDzG* +irradiation gamma) **(B)** Histogramme représentant les IC_{50} du traitement concomitant envers la lignée A549. Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3)……..…. **203**

Figure 77: (A) Estimation de la viabilité cellulaire des Véro en fonction du traitement concomitant (PS1-*BDzG* +irradiation gamma); **(B)** Histogramme représentant les IC_{50} du traitement concomitant envers la lignée Véro. Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3**)**…… **204**

Figure 78: Histogramme représentant les IC_{50} de la thérapie néoadjuvante (PS1-*BDzG* + irradiation gamma) envers les trois lignées cellulaire (HEp2, A549 et Véro). Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3)…….. **205**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Cytotoxicité des protéines Cry41Aa et Cry41Ab purifiées, activées par la protéinase K, testées sur différentes lignées cellulaires à l'aide du test de viabilité cellulaire MTT ; 24 heures après le traitement par la toxine**……..…. 79**

Tableau 2 : Nature et coordonnées géographiques des différents prélèvements**…….. 94**

Tableau 3: Types biochimiques de *Bacillus thuringiensis* selon **Martin & Travers, (1989)**……..... **99**

Tableau 4: Les différents disques antibiotiques utilisés suivant leurs familles**……..…. 101**

Tableau 5: Amorces universelles utilisées pour l'identification de l' ARNr *16S* bactérien**… 104**

Tableau 6 : Préparation de la courbe d'étalonnage de la B.S.A**…….……..……. 108**

Tableau 7 : Compositions des gels de concentration (5%) et de séparation (10%)**……..… 110**

Tableau 8: Poids moléculaires desprotéines standards utilisées pour l'étalonnage de la chromatographie d'exclusion moléculaire**…….. 113**

Tableau 9: Représentant les concentrations cellulaires utilisées pour le test de clonogénicité**…….. 126**

Tableau 10 : Temps d'irradiation en fonction de la dose d'irradiation (Gy)**……..…. 127**

Tableau 11 : Résultats du test d'acétate de Na (milieu d'isolement de *Bacillus thuringiensis*)**…….. 137**

Tableau 12: Répartition géographique des souches de *B.spp.*et de *B.thuringiensis* isolées du sol Algérien…**……..… 142**

Tableau 13: Répartition géographique (Nord/Sud) des souches de *Bacillus spp.* isolées du sol Algérien**..... 142**

Tableau 14: Bt index en fonction de la zone géographique**…….…… 143**

Tableau 15: Caractères phénotypiques et biochimiques des souches isolées et de références**……. 145**

Tableau 16 : Résultats du biotypage de *Bacillus thuringiensis***…….... 146**

Tableau 17: Résultats de l'activité hémolytique des souches**……..…. 147**

Tableau 18: Résultats du test de l'activité hémolytiques des protéines parasporales purifiées**…….. 148**

Tableau 19: **S**ensibilité aux antibiotiques des 10 souches de *Bacillusspp.* selon les diamètres des zones d'inhibition d'après les recommandations de l'**EUCAST, (2018)…….. 150**

Tableau 20 : Activités anti- bactériennes des dix souches sélectionnées……..….. **151**

Tableau 21 : Activité antifongique des dix souches sélectionnées…….……. **152**

Tableau 22 : Activité anti-archaebactérie……..…..…. **153**

Tableau 23 : Identification ARNr *16 S* des dix souches sélectionnées…….……..… **155**

Tableau 24: Noms d'enregistrement et le numéro d'accession des souches sélectionnées dans GenBanK……..……... **156**

Tableau 25: Rendement de récupération des cristaux (%)…….. **160**

Tableau 26 : Alignement de la séquence d'acides aminés NH_2-terminale de la protéine parasporine1 (*BDzG*) purifiée de la souche Bt -*BDzG* avec les séquences d'autres familles Bt- PS…….……... **172**

Tableau 27: Tableau récapulatif montrant les PM des différentes fractions protéique de la PS1-*BDzG* ayant une IC50<10 envers les lignées HEp2, A549 et Véro…….…. **186**

Tableau 28: Caractéristiques radiobiologiques des cellules HEp2 , A549 et Véro déterminés avec des paramètres dérivés des courbes dose-survie avec un modèle standard LQ…… **194**

Tableau 29 : Estimation de l'effet synergique de la co-administration de la Parasporine1-BDzG et de la radiothérapie sur la mort des cellules……. **201**

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN: acide désoxyribonucléique.
ADNg : acide désoxyribonucléique génomique
A375: cellules cancéreuses de la peau.
A549 (ATCC ® CCL-185™):cellules de l'épithélium basal alvéolaire humain adénocarcinomique.
AKT: serine/threonine protein kinase isolated from the retrovirus AKT8.
Apaf1: facteur d'activation de la voie de signalisation de l'apoptose.

B

BSA: albumine du sérum bovin.
Bt: *Bacillus thuringiensis.*
B. cereus : *Bacillus cereus.*
BXPC-3: cellules cancéreuses du pancréas humain.
B-PFTs: aerolysin-type β-pore-forming.
Bad: BCL-2 Antagonist of cell Death (catégorie des pro-apoptotiques).
Bak: BCL-2-Antagonist/Killer (catégorie des pro-apoptotiques).
Bax: BCL-2-Associated X Protein (catégorie des pro-apoptotiques).
Bim: BCL-2-interacting mediator of cell death (catégorie des pro-apoptotiques).
Bcl-2: B-Cell Lymphoma Protein (catégorie des anti-apoptotiques)
Bcl-XL: BCL-2 related Protein, Long Isoform (catégorie des anti-apoptotiques).
Bcl-W ou BCL2L2:Bcl-2-like protein 2. Elle joue un rôle protecteur sur les cellules lymphoïdes et myéloïdes (catégorie des anti-apoptotiques).
Bid: protein cytoplasmique (BH3-Interacting-domain Death agonist).
b-FGF: basic fibroblastic growth factor.

C

C : Cristaux.
CL_{50}: dose létale médiane.
COS7: African green monkey kidney fibroblast-like cell line.
CEM-SS: cellulesT leucémiques humaines.
CACO-2: cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal.
CIRC: Centre international de recherche sur le cancer, en anglais International Agency for Research on Cancer, est une agence intergouvernementale de recherche sur le cancer, créée en 1965 par l'Organisation mondiale de la santé des Nations unies.
Caspases: cysteinyl aspartate-specific proteinase.
CIPR: Commission Internationale de Protection Radiologique.
CARD: domaine d'association et de recrutement de caspases.
CA-SFM/EUCAST, 2014: La société Française de Microbiologie a créé un Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM) chargé de déterminer les valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques (antérieurement catégories thérapeutiques) et de proposer un guide pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en association avec l'EUCAST.

D

Dom : Domaine.
DLD-1: cellules cancéreuses du colon.
δ-endotoxines: delta-endotoxines.
DISC: Death Inducing Signaling Complex.
DNA-PK: protéine kinase dépendante de l'ADN.
DNA-PKCS: DNA-PK catalytic subunit.
DL: dose létale moyenne.
D: dose.
DO: densité optique.
3D-Cry toxine : toxine Cry à 3 domaines.
DMEM: Dulbecco modified eagle medium.
DMSO: Diméthylsulfoxyde.
dATP : la désoxyadénosine triphosphate.

E

EDTA: Ethylene diamine tetra-acetic acid.
EC_{50} : concentration efficace médiane.
EAC: Ehrlich Ascites Carcinoma tumor cell lines.

Ec: *Escherichia-coli*.

F

Fas: facteur de nécrose tumorale exprimée à la surface des lymphocytes T cytotoxiques.
Fas/CD95: tumor necrosis factor receptor family.
FADD: Fas Associated Death Domain.

G

GS: Growth signal.
GPI: glycosyl phosphatidyl inositol.
GX: Grossissement X.
G^+ /G^- : Gram positif / Gram négatif.
GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.
Gy: Gray (unité de dose).
Gélose TSA: gélose Trypticase-Soja-Agar.
Gélose MH: gélose Müeller Hinton.

H

HéLa: cellules cancéreuses cervicales (cancer du col de l'utérus).
HT-29: cellules cancéreuses du côlon.
HCT- 116: cellules du carcinome de côlon.
HEp2 (ATCC ® CCL23™): cellules épithéliales humaine de type 2, considérées comme provenant d'un carcinome laryngé humain.
HepG2: cancer du foie.
HL-60: précurseur des myéloïdes-granulocytes dans la leucémie de la moelle osseuse (cellule T leucémique).

I

ICPs ou cry: Insecticid Crystal Proteins.
IGF-1/IGF-2: insulin-like growth factor-1/ insulin-like growth factor 2.
IGF-1R: insulin-like growth factor 1.
IL-3: interleukine 3.
IL-3R: récepteur apparenté à IL-3.
IMM: membranes mitochondriales interne.
IPTG: isopropyl-thio-β-D galactopyranoside.

J

Jurkat T: lignée cellulaire immortalisée de lymphocyte T CD4 humain (cellule T leucémique).

K

kHz: kilo Hertz.
K-562: lignée érythroleucémique lignée cellulaire de leucémie myéloïde.
KM20L2: cancer du côlon humain.

L

LDH : lactate déshydrogénase.
LC3-I : microtubule-associated protein light chain 3.
LD-DTT : LD-Dithiothréitol.

M

MW, PM (kDa): poids moléculaires (kilo-Dalton).
MCF-7:cellules cancéreuses du sein.
MOLT-4: cellules leucémiques cancéreuses.
MC-4: cancer du poumon.
Milieu LB: Milieu Luria-Bertani.
Milieu BN: Milieu Bouillon nutritif.
Milieu de culture SG: milieu de culture Shigel Gibbons.
MEB: microscope électronique à balayage.
MTT: bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium).
Mtx-like Cry toxines : Mosquitocidal Cry toxins.
MAPK/ERK: mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase.

N

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NCI-H23: cancer du poumon.
NUGC3: cancer de l'estomac
NCI-H460: carcinome; cancer du poumon à grandes cellules
NCBI: National Center for Biotechnology Information ;

O

OMS: organisation mondiale de la santé.
OMM: membranes mitochondriales externe.

P

P:Parasporine.
PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 et PS6 : Parasporine-1, Parasporine- 2, Parasporine-3, Parasporine-4, Parasporine-5 et Parasporine-6.
Protéines Cry: Protéines cristallines.
PC-3: cellules cancéreuses de la prostate.
PAS: phagophore assembly site.
PI3K: Phophatidyl inositol 3-kinase.
PKC: protein kinase C.
Protein ATM: ataxia telangiectaia mutated.
Ps: *Pseudomonas aeruginosa*.
PCR: Réaction de polymérisation en chaine.
PBS: Phosphate buffered saline
PAR4: Protease-activated receptor 4.

R

RT: radiothérapie.
Rayons γ : rayons gamma.
ROS: Reactive oxygen species.
R: Rayon.

S

SDS: dodécylsulfate de sodium.
SDS-PAGE: électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du lauryl sulfate de sodium ou SDS-PAGE.
S ou Sp: Spores.
SGC-7901: cancer de l'estomac humain.
SF-268: cancer du cerveau humain.
SW480: cancer du colon.
Sawano : cancer de l'utérus.
SAPK/JNK: stress – activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase).
SASM: *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline.
SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.
S: taux de survie.
SEM: Scanning Electron Microscopy.
SVF: Sérum de veau fœtal.
SF2: Surviving fraction at 2 Gy, car une telle dose correspond à la dose moyenne quotidienne reçue lors d'une session de radiothérapie.
SK-Mel-2: cancer de la peau: dérivée de métastases sur la peau de la cuisse.
16S rDNA: ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes.
Sawano: cancer du col de l'utérus résistant au traitement au cisplatine.

T

TCS: cancer du col de l'utérus.
TNF: facteurs de nécrose tumorale.
TNF-α: Tumor Necrosis Factor α, également appelé cachectine ou cachexine.
TNF-R1 : récepteur de facteurs de TNF.
VEGF : facteurs angiogéniques.
TCS: Tumor Cell Solution System.
TNF: facteur de nécrose tumorale.
TNRF: récepteur de mort.
TNFADD: TNF Receptor Associated Death Domain.
TRAIL-R : récepteurs de domaine de mort (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) est le nom d'une cytokine de grande spécificité pour les cellules cancéreuses.
TLR3 et TLR : récepteurs de l'innée, les Toll-like.
TG : autophagy-related gène.

U

UtSMC: cellules normales des muscles lisses de l'utérus.

UFC: nombre de colonies ou unité formatrice de colonie.

V

Véro (ATCC ® CCL-81™): cellules normales épithéliales du rein de singe vert africain.

X

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein (protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X).

Z

Z-VAD-fmk: inhibiteur de caspases à large spectre.

INTRODUCTION

Introduction

A travers le monde, et uniquement pour l'année 2020, plus de 19 millions de nouveaux cas de cancer et 10 millions de décès ont été enregistrés. En Algérie, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclare que cette maladie du siècle s'est transformée en épidémie. En effet, 53076 nouvelles personnes ont été touchées par le cancer et plus de 29000 en sont morts selon les derniers chiffres du Centre International de Recherche sur le Cancer **(CIRC, 2018; CIRC, 2020)**.

Le cancer du poumon reste un des cancers les plus fatals. Il représente à lui seul 18% des cas de décès par le cancer, suivie du cancer colorectal (9,4%), du foie (8,3%), de l'estomac (7,7%) et du cancer du sein (6,9%). Quant au cancer du larynx; il représente environ 7.5% des causes de mortalité par le cancer chez l'homme **(CIRC, 2020)**.

Les traitements conventionnels, radiothérapie et la chimiothérapie, donnent dans l'ensemble des résultats assez satisfaisants au début des traitements. Cependant, à l'arrêtde ces derniers, il arrive fréquemment qu'il y ait rechute dans les mois ou les années qui suivent due probablement à la survenue rapide de deux problèmes limitant l'efficacité de ces traitements, la toxicité sur les tissus sains et l'apparition de population de cellules résistantes à l'effet cytotoxique des agents anticancéreux.

La recherche de thérapies nouvelles et alternatives visant à minimiser les effets secondaires des traitements ainsi que l'augmentation de la survie des patients englobe les explorations d'agents anticancéreux de diverses origines et de nombreuses sources en particulier issues de la microflore environnante.

La production et la synthèse de molécules bioactives est devenue ces dernières années le centre d'intérêt de la communauté de chercheurs.
Les activités anticancéreuses de plusieurs groupes microbiens, notamment les bactéries du groupe *Bacillus spp*. ont été signalés dans de nombreux travaux scientifiques regroupés et cités dans **Ferdous *et al*., (2018).**

Le genre *Bacillus* englobe l'espèce *B.thuringiensis* caractérisée par la production d'un corps

d'inclusion parasporal, le cristal, durant la sporulation **(Abou El-Hag *et al.*, 2011)**.

Ces inclusions contenant des protéines, appelées δ-endotoxines (composés de protéines Cry et Cyt) présentent souvent une forte et spécifique activité insecticide sur les lépidoptères, diptères, coléoptères et les larves. Ce qui rend cette espècel'agent microbien écologique par excellence pour contrôler les insectes ravageurs, d'où son importance dans le domaine de l'agriculture **(Filho *et al.*, 1993; Amano *et al.*, 2005)**.

Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence des protéines Cry uniques, désignées par parasporine (PS), qui, une fois purifiées n'ont pas une activité insecticide, mais sembleraient avoir une capacité cytotoxique préférentielle envers les cellules cancéreuses et non pas envers les cellules saines humaines d'où leur grand intérêt **(Brasseur *et al.*, 2015; Moazamian *et al.*, 2018; Aboul soud *et al.*, 2019).**

Actuellement, les parasporines classées en fonction de l'homologie de leurs séquences d'acides aminés ont fait l'objet de nombreuses études de leuractivité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires **(Kim *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004; Amano *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2007; Ibrahim *et al.*, 2010; Nagamatsu *et al.*, 2010)**.

D'autre part, certains types de tumeurs cancéreuses sont traités par exposition aux radiations ionisantes qui ont la capacité de transférer et déposer une quantité d'énergie aux cellules pour aboutir à l'endommagement de la molécule cible l'ADN et enfin à la destruction des cellules cancéreuses. Ces effets biologiques des rayonnements et leurs conséquences varient selon plusieurs facteurs. Compte tenu des différences de structure, les différentes cellules présentent des niveaux de radiosensibilité variables. En général, les cellules qui ont une plus grande prolifération sont plus sensibles aux radiations ionisantes.

L'amélioration des traitements et la recherche de nouvelles thérapies engagent la combinaison de plusieurs protocoles. De nombreuses études ont évaluées les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur les cellules **(Fard *et al.*, 2017).**

Pour notre part, nous nous intéressons, en particulier aux effets de la radiothérapie néoadjuvante, utilisant les radiations et la parasporine, produite par une bactérie du sol, comme agent anticancer. Cette molécule n'a jamais été entièrement évaluéeen tant que telle et cette étude en est la pionnière.

Les objectifs de notre étude visent à:

- Cribler l'activité cytotoxique d'une protéine (parasporine) extraite d'une souche bactérienne (*Bacillus thuringiensis)* isolée localement du sol Algérien envers les lignées cellulaires Véro, HEp2 et A549 et d'identifier le type de mort impliquée par cette protéine.
- Evaluer la survie cellulaire aux rayonnements ionisants.
- Examiner les effets synergétiques *in-vitro* de la PS1- *BDzG* et des radiations ionisantes sur la mort des cellules cancéreuses HEp2 et A549 et saineVéro.

L'approche méthodologique de recherche abordée est représentée en parties distinctes qui consistent en:

- L'isolement, l'identification de souches microbiennes de notre intérêt dans diverses niches écologiques isolées du sol Algérien.
- Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées.
- Extraction, purification et caractérisation de la biomolécule cytotoxique.
- Evaluation du potentiel cytotoxique et antiproliferatif de cette biomolécule active par :
    - La détermination de la fraction la plus cytotoxique.
    - Etude de l'activité cytotoxique de cette fraction active envers les différentes lignées cellulaires (Véro, HEp2 et A549) et de déterminer le type de mort.
- Etude de l'activité cytotoxique du rayonnement ionisant envers les lignées cellulaires (Véro, HEp2 et A549) et détermination de la radiosensibilité intrinsèque de chacune de ces lignées ainsi que certains paramètres radiologiques.
- Etude des effets de la radiothérapie néoadjuvante, utilisant les radiations ionisantes et la parasporine.

CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1.Le cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle qui correspond à une multiplication anarchique et incontrôlée de certaines cellules normales de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanises normaux de différentiation, de régulation de leur multiplication et résistent à la mort cellulaire programmée. Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome **(Mac Donald, 2003)**. Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses **(Mac Donald, 2003; Mareel & Leroy, 2003; Tigrine, 2014)**.

Parfois, les cellules cancéreuses envahissent les tissus environnants, ou se détachent de la tumeur d'origine pour migrer vers d'autres régions du corps, c'est ce qu'on appelle des métastases. C'est pourquoi il est important de dépister le cancer le plus tôt possible afin d'éviter cette migration **(Lambert, 2017)**.

1.1. Epidémiologie

Dans le monde les principaux cancers répertoriés sont le cancer du poumon qui est responsable du plus grand nombre de décès (1,8 million de décès, ou 18,4 % du total), en raison de son mauvais pronostic dans le monde, suivi du cancer colorectal (881 000 décès, soit 9,2 % du total), du cancer de l'estomac (783 000 décès, 8,2 %) et du cancer du foie (782 000 décès, ou 8,2 % du total). Le cancer du sein chez la femme vient au cinquième rang des causes de décès (627 000 décès, ou 6,6 % du total), son pronostic étant relativement favorable, du moins dans les pays développés. En 2018, il y a eu 53076 nouvelles personnes touchées par le cancer et plus de 29 000 décès en Algérie, selon les derniers chiffres du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dépendant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) **(CIRC, 2018)**. Selon le même rapport, au cours des cinq dernières années, le nombre de cas prévalent égale à 127 306 malades. Il est également indiqué que le nombre de femmes malades avoisine les 29112, avec en première position le cancer du sein. Pour les hommes par contre, c'est le cancer des poumons qui se place en tête, avec un taux de13, 61 %, soit 3271 personnes atteintes (Figure 1). Le cancer du poumon est l'un des plus meurtriers. Chez les personnes atteintes de cancer, le taux de survie, 5 ans après le diagnostic, est de 17% chez les femmes et 14% chez les hommes. Et même si les patients répondent bien au traitement au début, il arrive fréquemment qu'ils rechutent

dans les mois ou les années qui suivent.

Le cancer du larynx représente environ 7.5% des causes de mortalité par le cancer chez l'homme entre 40 et 59 ans. Il survient dans 95 % des cas chez l'homme entre 45 et 70 ans. Le tabac étant le principal facteur prédisposant **(CIRC, 2018 & CIRC, 2020)**.

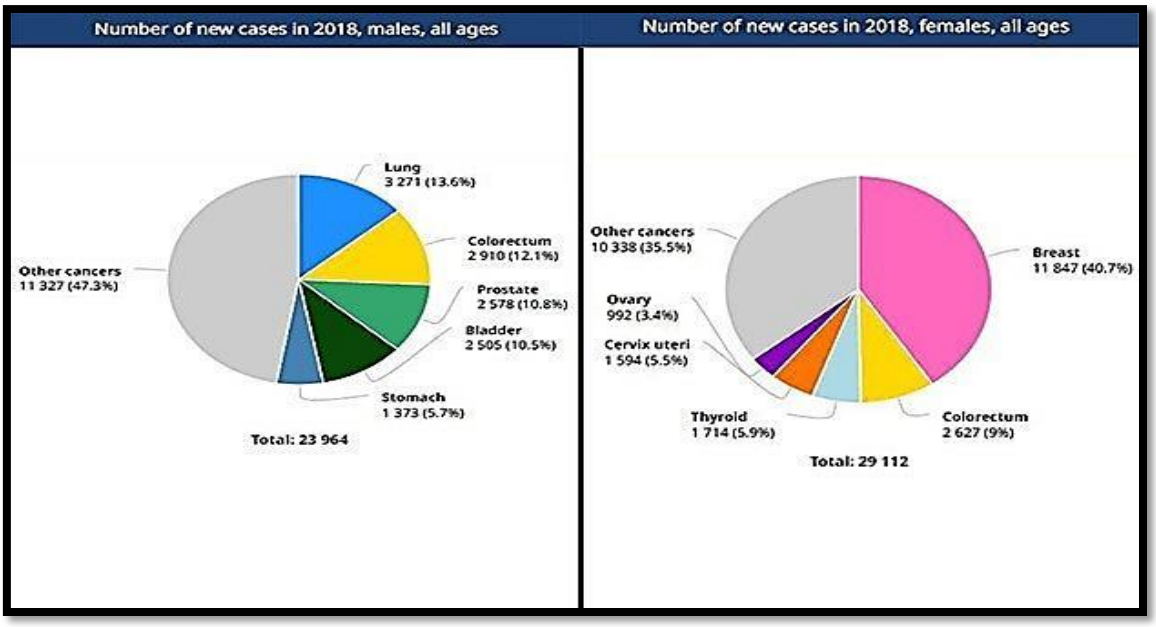


Figure 1: Evolution du cancer en Algérie **(Rapport de l'OMS, 2018)**.

1.2. Les étapes de la cancérisation

Lors de la cancérisation, trois étapes différentes ont été identifiées (Figure 2) :

- **L'initiation :**

Au cours de cette étape, il y'a production d'une lésion majeure irréversible au niveau de l'ADN cellulaire; Il en résulte une transformation de cette cellule.

- **La promotion :**

La cellule ainsi transformée va se développer et proliférer et forme ainsi un groupe de cellules identiquement transformées.

- **La progression :**

La cellule transformée acquiert maintenant toutes les caractéristiques d'une cellule cancéreuse à savoir la multiplication anarchique**;** la perte de son caractère différencié (son identité liée au tissu auquel elle appartenait) et la formation de métastases via le sang et la lymphe à d'autres organes loin de l'organe d'origine où elle s'est formée initialement.

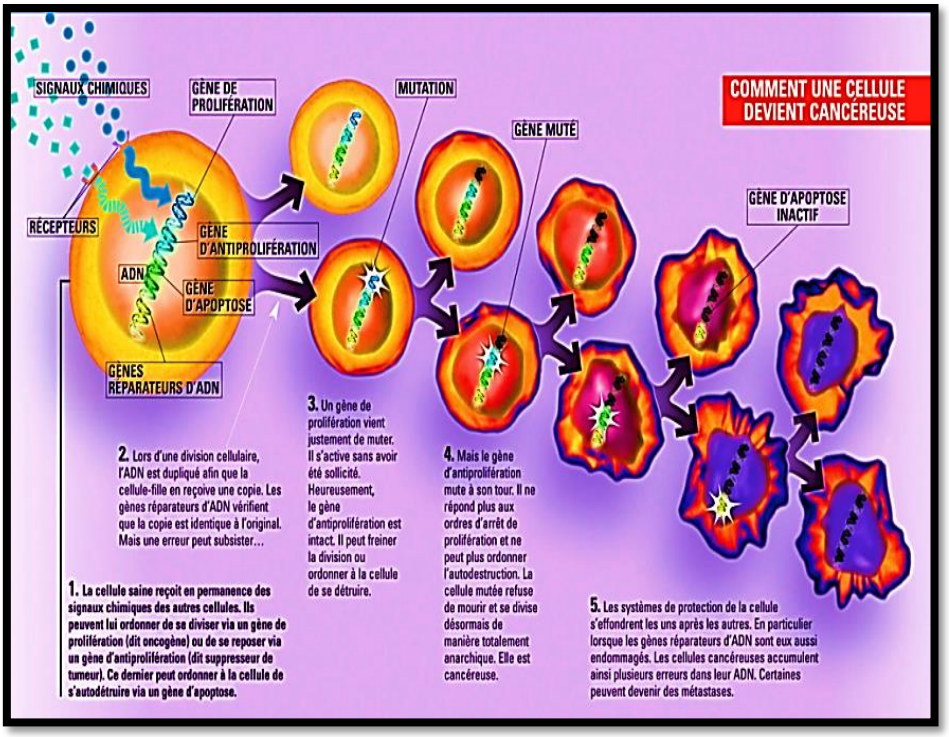


Figure 2: Comment une cellule devient cancéreuse **(Truc, 2016)**.

1.3. Caractéristique d'une cellule cancéreuse

Malgré la grande diversité des cancers, les cellules cancéreuses partagent des caractéristiques similaires qui permettent de les identifier **(Béchohra, 2017)**. Selon le catalogue de génotypes de cellules cancéreuses **(Hanahan & Weinberg, 2000)** nous pouvons suggérer que l'apparition d'un cancer est le résultat de la manifestation de six altérations essentielles de la physiologie cellulaire (Figure 3).

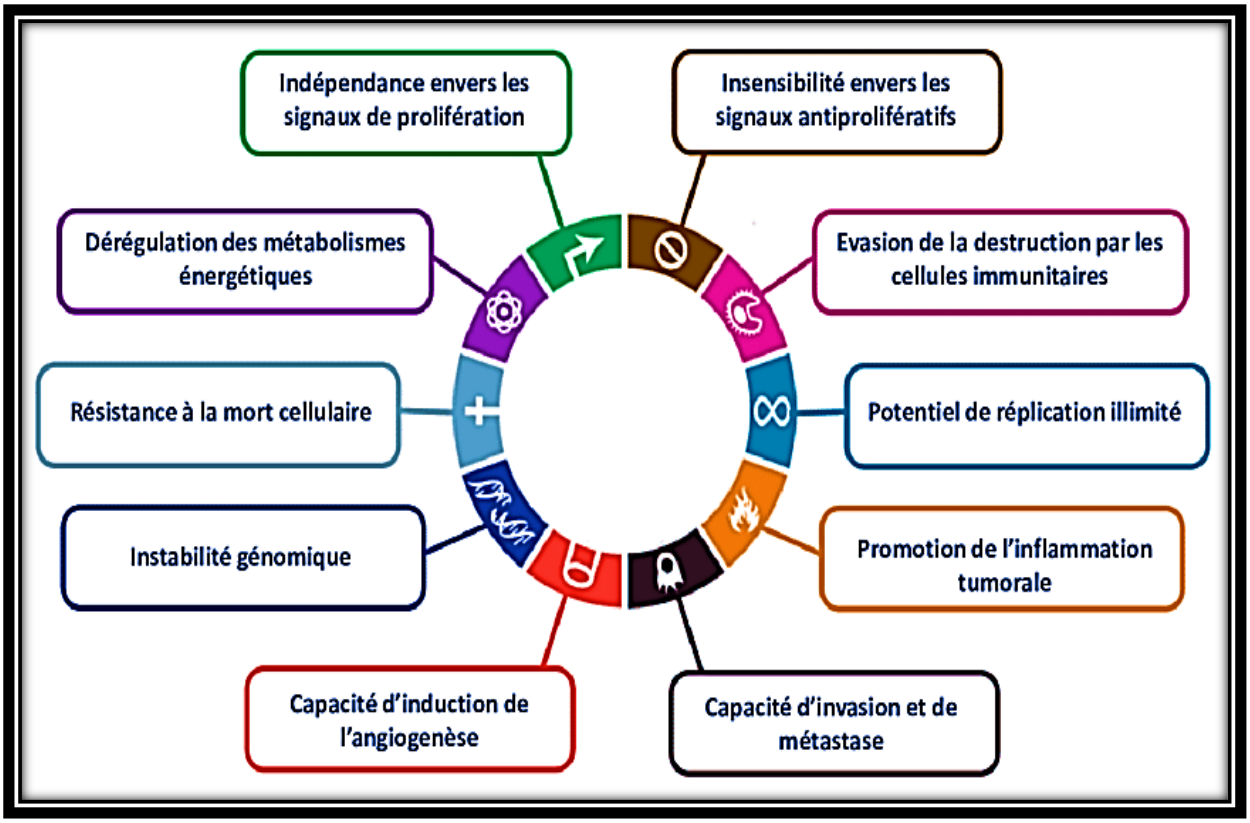


Figure 3: Les caractéristiques des cellules tumorales acquises au cours de leurs mutations **(Hanahan & Weinberg, 2000)**.

1.3.1. Autosuffisance en signaux de croissance (Capacité acquise)

Les cellules normales ont besoin de signaux de croissance mitogénique (GS) avant de pouvoir passer d'un état de repos à un état de prolifération active. Ces signaux sont transmis dans la cellule par des récepteurs transmembranaires qui se lient à des classes distinctes de molécules de signalisation: facteurs de croissance diffusibles, composants de la matrice extracellulaire et molécules d'adhésion/interaction entre cellules. À notre connaissance, aucun type de cellule normale ne peut proliférer en l'absence de tels signaux stimulants. De nombreux oncogènes agissent en imitant d'une manière ou d'une autre les signaux de croissance normale. La conclusion est que les cellules tumorales génèrent un grand nombre de leurs propres signaux de croissance, réduisant ainsi leur dépendance à la stimulation de leur microenvironnement tissulaire normal. Cette libération de la dépendance à l'égard des signaux de croissance exogène perturbe un mécanisme homéostatique d'une importance capitale qui fonctionne normalement pour assurer un comportement correct des différents types de cellules dans un tissu **(Hanahan *et al*., 2000)**.

1.3.2. Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance (anti-croissance)

Dans un tissu normal, de multiples signaux antiprolifératifs agissent pour maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire; ces signaux comprennent à la fois des inhibiteurs de croissance solubles et des inhibiteurs immobilisés, intégrés dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules voisines. Ces signaux inhibiteurs de croissance, comme leurs homologues à action positive, sont reçus par des récepteurs de surface cellulaire transmembranaires couplés à des circuits de signalisation intracellulaires.

Les signaux anti-croissance peuvent bloquer la prolifération par deux mécanismes distincts. Les cellules peuvent être forcées à sortir du cycle actif de prolifération pour passer à l'état de repos (G0), d'où elles peuvent réapparaître à l'avenir lorsque les signaux extracellulaires le permettent. Les cellules peuvent également être amenées à abandonner de façon permanente leur potentiel prolifératif en étant amenées à entrer dans des états post-mitotiques, généralement associés à l'acquisition de traits spécifiques associés à la différenciation.

Les cellules cancéreuses naissantes doivent échapper à ces signaux antiprolifératifs si elles veulent prospérer. Une grande partie des circuits qui permettent aux cellules normales de répondre aux signaux antiprolifératifs est associée à l'horloge du cycle cellulaire, en particulier les éléments régissant le transit de la cellule dans la phase G1 de son cycle de croissance. Les cellules surveillent leur environnement extérieur pendant cette période et, sur la base des signaux détectés, décident si elles doivent proliférer, être au repos ou entrer en état post mitotique.

La prolifération cellulaire ne dépend pas seulement de l'évitement des signaux cytostatiques anti-croissance. Nos tissus freinent également la multiplication cellulaire en donnant aux cellules l'instruction d'entrer de façon irréversible dans des états post-mitotiques et différenciés, en utilisant des mécanismes divers qui sont incomplètement compris; il est évident que les cellules tumorales utilisent diverses stratégies pour éviter cette différenciation terminale.

1.3.3. Esquive à la mort cellulaire programmée (Apoptose)

La capacité des populations de cellules tumorales à augmenter en nombre est déterminée non seulement par le taux de prolifération des cellules mais aussi par le taux d'attrition des cellules. La mort cellulaire programmée ou "l'apoptose" représente une source majeure de

cette attrition. Les preuves s'accumulent, principalement à partir d'études sur des modèles de souris et des cellules en culture, ainsi que d'analyses descriptives des stades biopsies de la carcinogenèse humaine, que la résistance acquise à l'apoptose est une caractéristique de la plupart et peut-être de tous les types de cancer. Les observations accumulées au cours de la dernière décennie indiquent que le programme apoptotique est présent sous une forme latente dans pratiquement tous les types de cellules du corps. Une fois déclenché par divers signaux physiologiques, ce programme se déroule en une série d'étapes chorégraphiées avec précision. Les membranes cellulaires sont perturbées, les squelettes cytoplasmique et nucléaire sont décomposés, le cytosol est ex-poussé, les chromosomes sont dégradés et le nucléus est fragmenté, le tout en l'espace de 30 à 120 minutes. À la fin, le corps cellulaire ratatiné est englouti par les cellules voisines dans un tissu et disparaît, généralement dans les 24 heures **(Wyllie *et al.*, 1980).**

La machinerie apoptotique peut être divisée en deux grandes catégories de composants : les capteurs et les effecteurs : Les capteurs sont chargés de surveiller l'environnement extracellulaire et intracellulaire pour détecter les conditions de normalité ou d'anomalie qui influencent la vie ou la mort d'une cellule. Ces signaux régulent la deuxième classe de composants, qui fonctionnent comme des effecteurs de la mort apoptotique. Les sentinelles comprennent des récepteurs de surface cellulaire qui se lient aux facteurs de survie ou de mort. Parmi les exemples de ces paires ligand/récepteur figurent les signaux de survie transmis par l'IGF-1/IGF-2 par l'intermédiaire de leur récepteur, l'IGF-1R, et par l'IL-3 et son récepteur apparenté, l'IL-3R **(Lotem & Sachs, 1996; Butt *et al.*, 1999)**. Les signaux de mort sont transmis par le ligand de Fas en se liant au récepteur du Fas et par le TNF en se liant au TNF-R1 **(Ashkenazi & Dixit, 1998; Ashkenazi & Dixit, 1999)**. Des capteurs intracellulaires surveillent le bien-être de la cellule et activent la voie de la mort en réponse à la détection d'anomalies, notamment des dommages à l'ADN, un déséquilibre de signalisation provoqué par l'action oncogène, l'insuffisance des facteurs de survie ou l'hypoxie **(Evan & Littlewoo, 1998)**. De plus, la vie de la plupart des cellules est en partie maintenue par des signaux de survie basés sur la matrice cellulaire et l'adhésion cellulaire dont l'abrogation provoque l'apoptose **(Ishizaki *et al.*, 1995; Giancotti *et al.*, 1999)**. Les signaux de régulation apoptotiques solubles et immobilisés reflètent probablement les besoins des tissus pour maintenir leurs cellules constitutives dans des configurations architecturales appropriées.

Bon nombre de signaux provoquant l'apoptose convergent vers les mitochondries, qui

répondent aux signaux pro-apoptotiques en libérant le cytochrome C, un puissant catalyseur de l'apoptose **(Green & Reed, 1998)**. Les membres de la famille des protéines Bcl-2, dont les membres ont une fonction soit pro-apoptotique (Bax, Bak, Bid, Bim), soit anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W), agissent en partie en gouvernant la mort mitochondriale en le signalant par le relargage du cytochrome C. La protéine suppresseur de tumeur p53 peut provoquer l'apoptose en régulant l'expression de Baxproapoptotique en réponse à la détection de dommages à l'ADN; Bax stimule à son tour les mitochondries pour libérer le cytochrome C (Figure 4).

Les effecteurs ultimes de l'apoptose comprennent un ensemble de protéases intracellulaires appelées caspases **(Thornberry & Lazebnik, 1998)**. Deux caspases, 8 et 9, sont activées respectivement par des récepteurs de mort tels que le Fas ou par le cytochrome C libéré par les mitochondries. Ces caspases déclenchent l'activation d'une douzaine de caspases effectrices qui exécutent le programme de mort, par la destruction sélective des structures sous-cellulaires et des organites, et du génome.

La possibilité que l'apoptose serve de barrière au cancer a été évoquée pour la première fois par **Kerr*et al.*, (1972)**, lorsqu'ils ont décrit une apoptose massive dans une population cellulaire à croissance rapide, ces tumeurs hormono-dépendantes mourraient suivant le retrait des hormones.

La résistance à l'apoptose peut être acquise par les cellules cancéreuses par le biais de diverses stratégies. La perte la plus fréquente d'un régulateur pro-apoptotique par mutation concerne certainement le gène suppresseur de tumeur p53. L'inactivation fonctionnelle de son produit, la protéine p53, est observée dans plus de 50% des cancers humains et entraîne la suppression d'un composant clé du capteur de dommages à l'ADN qui peut induire la cascade d'effecteurs apoptotiques **(Harris, 1996)**.

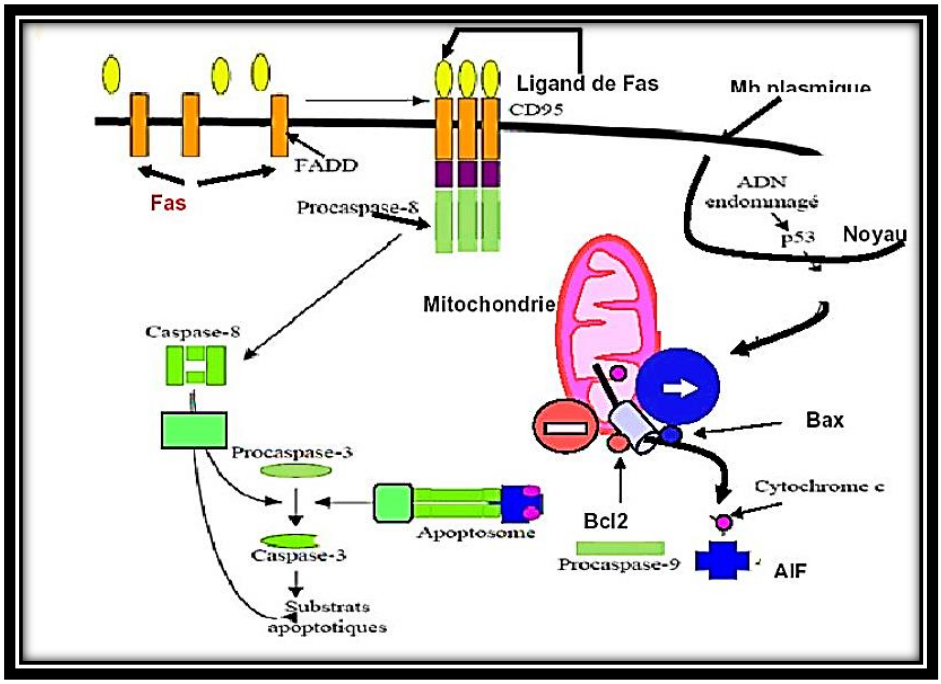


Figure 4: Les voies d'activation principales de l'apoptose **(Boudard, 2016).**

1.3.4. Un potentiel de réplication illimité (capacité acquise)

De nombreux types de cellules de mammifères, et peut-être même tous, sont dotés d'un programme intrinsèque et autonome qui limite leur multiplication. Ce programme semble fonctionner indépendamment des voies de signalisation intercellulaire décrites ci-dessus. Il doit lui aussi être perturbé pour qu'un clone de cellules puisse atteindre une taille qui constitue une tumeur macroscopique potentiellement mortelle.

De façon provocante, la plupart des types de cellules tumorales qui se sont propagées en culture semblent immortalisées, ce qui suggère que le potentiel de réplication illimité est un phénotype qui a été acquis *in-vivo* pendant la progression de la tumeur et qui était essentiel pour le développement de leur état de croissance maligne **(Hayflick, 1997)**. Ce résultat suggère qu'à un certain moment au cours de la progression tumorale en plusieurs étapes, les populations de cellules prémalignes en évolution épuisent leur fin de doublement autorisé et ne peuvent mener à bien leur programme tumorigène qu'en franchissant la barrière de mortalité et en acquérant un potentiel de réplication illimité**.**

1.3.5. Angiogenèse soutenue (capacité acquise)

Une fois qu'un tissu est formé, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, le processus

d'angiogenèse est transitoire et soigneusement régulée. En raison de cette dépendance vis-à-vis des capillaires voisins, il semble plausible que les cellules proliférant dans un tissu ayant une capacité intrinsèque à favoriser la croissance des vaisseaux sanguins. Pour que les nouvelles cellules du tissu continuent à être correctement desservies par la circulation sanguine, de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de ceux à proximité, grâce à la prolifération des cellules constituant les vaisseaux sanguins : les cellules endothéliales.

En situation saine, la prolifération cellulaire fait partie d'un vaste programme de construction du tissu qui s'accompagne naturellement d'une induction de l'angiogenèse. À l'inverse, la prolifération des cellules tumorales est anormale et par conséquent la croissance de la tumeur ne s'accompagne pas de l'angiogenèse. La prolifération de ces cellules provoque leur éloignement de la circulation sanguine. Lorsque la tumeur atteint une certaine taille, sa croissance s'arrête puisqu'elle n'est plus suffisamment alimentée par la circulation sanguine. Pour que la croissance tumorale continue, la tumeur doit acquérir la capacité à stimuler l'angiogenèse. Cette obligation constitue une barrière naturelle contre l'apparition de cancers.
Les tumeurs qui font l'acquisition de cette capacité induisent l'angiogenèse de façon permanente en sécrétant des facteurs angiogéniques tel que le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui active la prolifération des cellules endothéliales pour vasculariser la tumeur. Cette stimulation dérégulée donne naissance à un réseau vasculaire tumoral désorganisé et anarchique. Une tumeur qui est capable d'induire l'angiogenèse peut croître de façon démesurée puisqu'elle n'a plus de limite d'approvisionnement. Cette forte croissance tumorale peut asphyxier les tissus sains de l'organe que la tumeur occupe et peut provoquer leur mort, ce qui a pour conséquence de menacer la fonctionnalité de l'organe touché **(Hanahan *et al.*, 2000).**

1.3.6. Invasion tissulaire et métastase (capacité acquise)

Tôt ou tard, au cours du développement de la plupart des types de cancer humain, les masses tumorales primaires génèrent des cellules pionnières qui se déplacent, envahissent les tissus adjacents et, de là, se déplacent vers des sites éloignés où elles peuvent réussir à fonder de nouvelles colonies. Ces colonies éloignées de cellules tumorales "les métastases" sont la cause de 90% des décès par cancer chez l'homme **(Sporn, 1996).** La capacité d'invasion et de métastase permet aux cellules cancéreuses de s'échapper de la masse tumorale primaire et de coloniser de nouveaux terrains dans le corps où, du moins au début, les nutriments et l'espace

ne sont pas limités. Les métastases nouvellement formées se présentent sous la forme d'amalgames de cellules cancéreuses et de cellules de soutien normales enrôlées dans le tissu hôte. Comme la formation de la masse tumorale primaire, le succès de l'invasion et de la métastase dépend des cinq autres capacités acquises **(Hanahan *et al.*, 2000)**.

1.3.7. Une caractéristique habilitante : Instabilité du génome

L'acquisition des six capacités énumérées points", qui interviennent au cours de la progression de la tumeur crée un dilemme**.** Les données disponibles suggèrent que la plupart sont acquises, directement ou indirectement, par des modifications du génome des cellules cancéreuses. Mais la mutation de gènes spécifiques est un processus inefficace, qui reflète le maintien incessant et fastidieux de l'intégrité génomique par un ensemble complexe d'enzymes de contrôle et de réparation de l'ADN. Ces équipes de maintenance du génome s'efforcent de garantir que les informations sur la séquence de l'ADN restent intactes. L'ordre caryotypique est garanti par d'autres gardiens, appelés "check- à des moments critiques de la vie de la cellule, notamment lors de la mitose. Ensemble, ces systèmes garantissent que les mutations sont des événements rares, si rares en fait que les mutations multiplexes dont on sait qu'elles sont présentes dans les gènes des cellules tumorales sont très peu susceptibles de se produire au cours d'une vie humaine.

Pourtant, les cancers apparaissent à une fréquence importante dans la population humaine, ce qui amène certains à affirmer que les génomes des cellules tumorales doivent acquérir une mutabilité accrue pour que le processus de progression de la tumeur puisse s'achever dans plusieurs décennies **(Loeb, 1991)**.Le dysfonctionnement de certains composants spécifiques de ces systèmes génomiques de "gardiens" a été invoqué pour expliquer cette mutabilité accrue **(Lengauer *et al.*, 1998).** Le membre le plus important de ces systèmes est la protéine suppresseur de tumeur p53, qui, en réponse aux dommages causés à l'ADN, provoque soit l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre à l'ADN de se réparer, soit l'apoptose si les dommages sont excessifs.

En effet, il est maintenant clair que le fonctionnement de la voie de signalisation des dommages à l'ADN p53 est perdu dans la plupart, sinon la totalité, des cancers humains **(Levine, 1997)**. En outre, un nombre croissant d'autres gènes impliqués dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN, ou dans la garantie d'une ségrégation chromosomique

correcte pendant la mitose, se sont révélés perdus dans différents cancers, qualifiant ces gardiens de suppresseurs de tumeurs **(Lengauer *et al.*, 1998)**. Leur perte de fonction est envisagée pour permettre l'instabilité et la variabilité du génome et la génération de cellules mutantes en conséquence avec des avantages sélectifs. Il est intéressant de noter que des preuves récentes suggèrent que l'apoptose peut également être un vecteur d'instabilité génomique, dans la mesure où l'ADN des corps cellulaires apoptotiques peut être incorporé dans les cellules voisines après phagocytose **(Holmgren *et al.*, 1999)**, en principe en diversifiant génétiquement tous les types de cellules constitutives d'une tumeur. Nous plaçons cette caractéristique acquise de l'instabilité génomique en dehors des six capacités acquises associées au phénotype des cellules tumorales et à la physiologie des tumeurs : elle représente le moyen qui permet aux populations évolutives de cellules pré-malignes d'atteindre ces six paramètres biologiques. Pour chacune de ces altérations, existe un mécanisme de défense. Cette multiplicité de défenses peut expliquer pourquoi le cancer est relativement rare au cours d'une vie humaine moyenne **(Hanahan *et al.*, 2000).**

1.4. Mort cellulaire

1.4.1. Généralités

La mort cellulaire se produit dans l'organisme eucaryote par plusieurs mécanismes, mais principalement par nécrose et apoptose. La nécrose est associée à une mort cellulaire incontrôlée, passive et désordonnée résultant d'une blessure ou d'un traumatisme, comme une coupure, une brûlure ou un contact avec un agent chimique,… etc. La nécrose est associée à la mort des cellules de l'organisme eucaryote. La cellule impliquée dans le processus de nécrose subit un gonflement intense et irréversible. Ce gonflement est tel que la cellule va ensuite éclater, libérant ses organites, son ADN et son contenu enzymatique dans le milieu extracellulaire. Cette libération incontrôlée entraînera un phénomène d'inflammation non souhaité par l'organisme dans les tissus et cellules environnants **(Goldsby *et al.*, 2001; Didur, 2007)**.

1.4.2. L'apoptose

C'est en 1972 que Kerr et ses collaborateurs **(Kerr *et al.*, 1972)** ont décrit et étudié pour la première fois le phénomène d'apoptose et l'ontcaractérisé comme étant un mécanisme primordial au maintien de l'homéostasie et à la survie de l'organisme. Ce phénomène d'apoptose permettait d'après eux, d'activer la mort cellulaire et de ce fait d'induire le suicide programmé des cellules par exemple au moment du développement de l'embryon (exemple,

lors de la formation des doigts) ou lorsque des cellules présentaient des mutations ou des dommages irréparables au niveau de l'ADN (ces dommages ou mutations de l'ADN cellulaire peuvent provenir de différentes sources environnementales telles que : les infections virales ou bactériennes, les substances chimiques et toxiques, les rayons ionisants, etc… **(Earnshaw *et al.*, 1999)**.

Le phénomène d'apoptose se traduit par une série d'événements au niveau de la cellule, tout d'abord on observe un gonflement de la cellule qui est le résultat d'une entrée massive d'eau dans la cellule, suivi d'une condensation du contenu cellulaire et du cytoplasme, puis de la condensation et ségrégation de la chromatine se soldant par la dégradation de l'ADN en petits fragments et enfin la fragmentation de la membrane nucléaire et la formation des corps apoptotiques **(Nijhawan *et al.*,2000)** que l'on peut voir très aisément après coloration à l'Acridine orange par microscopie à fluorescence sous forme de petits points verts fluorescents.

Ces corps apoptotiques vont être ensuite phagocytés par les cellules voisines, par les macrophages ainsi que par d'autres cellules présentatrices d'antigènes. Le contenu intracellulaire d'une cellule ayant subi l'apoptose n'entrera jamais en contact avec les autres cellules et donc n'induira pas de phénomène d'inf1ammation. Le système de contrôle entre la survie cellulaire et l'apoptose est un équilibre entre la synthèse, l'activation ou l'inactivation de protéines pro et anti apoptotiques. On distingue des protéines telles que Bak, Bad et Bax dans la catégorie des pro-apoptotiques, ainsi que Bcl-2 et Bel-XL dans la catégorie des anti-apoptotiques **(Nijhawan *et al.*, 2000; Didur, 2007)**.

1.4.2.1. Déroulement de l'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire active qui nécessite la participation de la cellule pour sa propre mort par le biais d'événements intracellulaires qui sont en fait placés sous contrôle génétique. De manière schématique un processus apoptotique peut-être décomposé en 3 phases successives (Figure 5) :

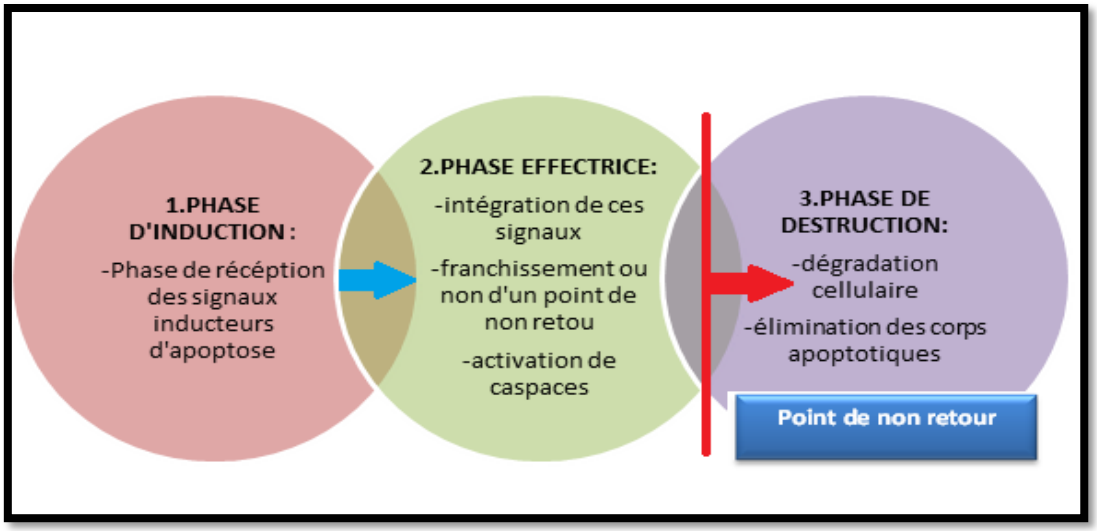


Figure 5: Schéma récapitulatif des 3 phases de déroulement de l'apoptose **(Boudard, 2016).**

a) Phase d'induction

La survie des cellules dépend de leur capacité à trouver dans leur environnement proche les signaux qui leur permettent de réprimer le déclenchement de leur suicide jour après jour. Ces signaux seront intégrés par la cellule qui, en fonction de son génotype et de son état physiologique, orientera sa réponse soit vers la mort, soit vers la survie, la prolifération ou la différenciation de la cellule **(Callen *et al*., 2005)**.

L'apoptose est principalement activée ou induite selon deux voies principales de signalisation (Figure 6):

- ***Voie intrinsèque*** des signaux mitochondriaux (tel le relâchement de cytochrome C).
- ***Voie extrinsèque*** des signaux extracellulaires (liaison d'une molécule au récepteur de mort).

✓ **La voie intrinsèque ou mitochondriale**

Dans le cas de la voie intrinsèque ou de signalisation mitochondriale, il y'a un débalancement entre des protéines (chargées) pro- et anti-apoptotiques situées sur les membranes mitochondriales, ces protéines créent un débalancement électrostatique entre les membranes mitochondriales internes (IMM) et externes (OMM) **(Ding *et al*., 2003; Wang *et al*., 2005).**

Cette dépolarisation ainsi crée va favoriser la création de pores inter-membranaires permettant un relâchement de cytochrome C au niveau du cytoplasme. L'ensemble composé du :

Cytochrome C, Apaf- l (facteur d'activation de la voie de signalisation de l'apoptose), de la désoxyadénosine triphosphate (ATP) et la pro-caspase 9 forment un complexe heptahédrique appelé apoptosome**(Wang *et al.*, 2005).** Une fois l'apoptosome formé, il permettera l'autoclivage et l'activation de la pro-caspase 9 en caspase 9 activée **(Earnshaw *et al.*, 1999)**. La pro-caspase 9 possède un domaine d'association et de recrutement de caspases (CARD) à son extrémité NH_2, permettant l'association de la pro-caspase 9 avec Apaf1 et le cytochrome C. Grâce au domaine CARD, la caspase 9 peut par la suite recruter et cliver d'autres pro-caspases comme les pro-caspases 3, 6 et 7 **(Wang *et al.*, 2005)**. L'activation de la pro-caspase 3 en caspase 3, permet l'activation d'autres caspases effectrices telles la 6 et la 7, et/ou active le processus de condensation de la chromatine et la formation des corps apoptotiques **(O'Neil *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998; Didur, 2007).**

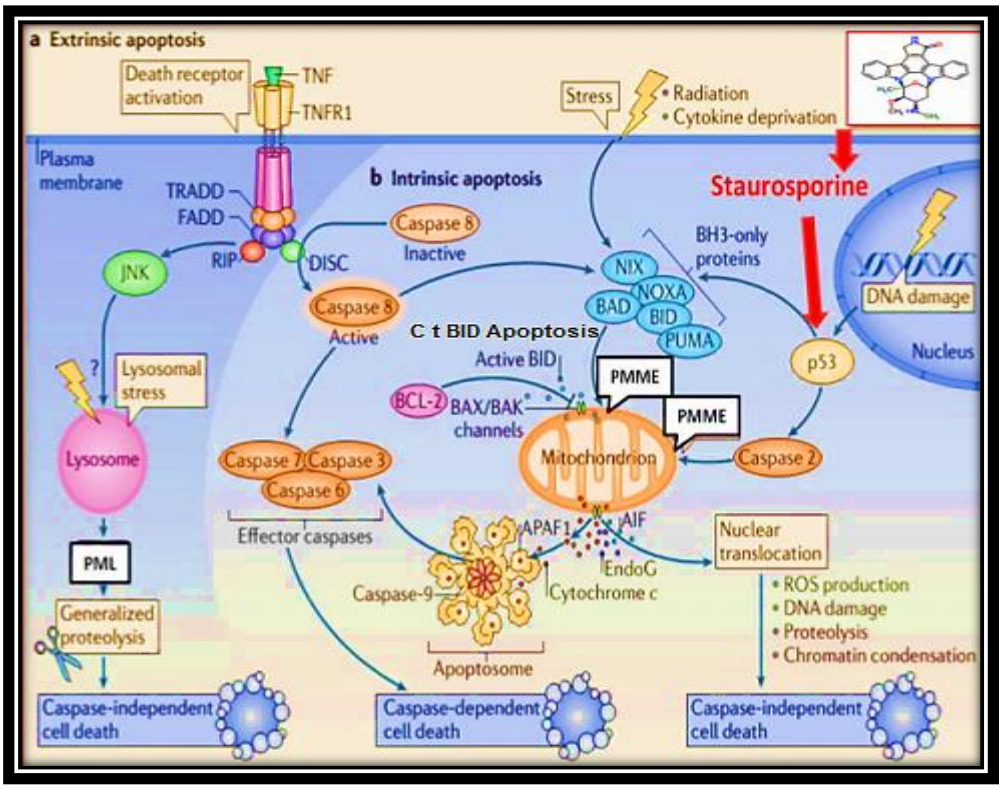


Figure 6: Les différentes voies impliquées dans le processus de mort cellulaire apoptotique caspase dépendant et indépendant **(Nicolier *et al.*, 2009; Mariño *et al.*, 2014).**

- ✓ **Voie extrinsèque des signaux extracellulaires**

Certains des membres de la superfamille des TNFR (tumor necrosis factor receptor), connus sous le nom de « récepteurs de mort », ont la particularité de posséder dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée le « domaine de mort » (DD, death domain), qui

permet la transmission du signal de mort par ces récepteurs **(Couzinet *et al.*, 2002).** Cette liaison entraîne la trimérisation du récepteur pour former un complexe d'induction de signalisation de mort (DISC) qui permet l'activation de la pro-caspase 8 en caspase 8 active. Une fois la caspase 8 active, elle peut, grâce au domaine CARD, recruter et ensuite activer la pro-caspase 3 en caspase 3, qui à son tour peut activer d'autres caspases effectrices telles les caspases 6 et 7 ou tout simplement démarrer le processus de condensation de la chromatine et de formation des corps apoptotiques **(Didur, 2007).**

b) Phase effectrice ou d'exécution de l'apoptose

Les voies extrinsèques et intrinsèques se terminent toutes deux au point de la phase d'exécution, considérée la voie finale de l'apoptose. C'est l'activation des cascades d'exécution qui amorce cette phase d'apoptose. Les cascases d'exécution activent l'endonucléase cytoplasmique, qui se dégrade et les protéases dégradent ainsi les protéines nucléaires et cytosquelettiques **(Elmore, 2007)**. Cette phase se caractérise aussi par l'activation de protéine caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinase). L'activation des caspases est commune à toutes les voies possibles de transduction du signal inducteur. Il s'agit d'une phase régulable correspondant à l'intégration du signal apoptotique et des signaux inhibiteurs d'apoptose présents au sein de la cellule ou dans son milieu environnant **(Didur, 2007).**

c) Phase de destruction cellulaire et d'élimination

Au cours de cette phase, la cellule franchira ou non un point de non-retour correspondant à l'étape où le processus apoptotique est enclenché de manière sûre et irréversible. Cette étape marque le début de la phase de destruction cellulaire (Figure 7) **(Callen & Perasso, 2005)**.

1.4.2.2. Structure et fonctions des caspases, les protéines effectrices de l'apoptose

Les caspases existent dans la cellule sous forme de précurseurs inactifs appelés pro-caspases. Lors de leur activation, elles sont successivement activées en cascade, et leur activation conduit irrémédiablement la cellule à sa mort, avec les caractéristiques morphologiques et biochimiques précédemment citées.

Le mécanisme par lequel l'apoptose est induite à l'intérieur des cellules diffère selon qu'il provient d'un signal extracellulaire ou d'un signal influençant la balance électrochimique des membranes de la mitochondrie. Il n'existe pas moins de quatorze caspases différentes, habituellement sous forme inactive (zymogène), situées dans le cytoplasme et dans la

mitochondrie. On peut les diviser en quatre catégories selon leurs fonctions **(Callen & Perasso, 2005)**:

- *Les caspases initiatrices de l'apoptose* (caspases 2, 8, 9,10 et12)
- *Les caspases effectrices de l'apoptose* (caspases 3, 6 et 7)
- *Les caspases activatrices des cytokines contrôlant les mécanismes inflammatoires* (caspases l, 4, 5, 11 et 13).

1.4.3. La nécrose

La nécrose correspond à la mort anormale accidentelle et non programmée d'une cellule ou d'un tissu. Elle s'oppose donc à l'apoptose et caractérise un état pathologique : infection bactérienne ou fongique, venin, ischémie, etc. Dans certains cas, elle se répand tellement qu'elle finit par en être mortelle (exemple de la septicémie ou de la gangrène). Ses caractéristiques morphologiques ont été décrites comme étant un gain du volume cellulaire, un gonflement des organelles, une perte de l'intégrité membranaire et une fuite du contenu cellulaire responsable du processus inflammatoire (Figure7) **(Kroemer *et al.*, 2009; Béchohra, 2017)**.

Des récepteurs de domaine de mort (Fas/CD95, TNF/TNFR1, TRAIL-R) et les récepteurs del'immunité innée, les Toll-like (TLR3 et TLR4) sont impliqués dans la régulation de la mort cellulaire nécrotique **(Galluzzi *et al.*, 2007; Galluzzi *et al.*, 2012b)**. De plus, il a été observé dans certains modèles, qu'une inhibition des caspases, soit par une absence de l'activateur essentiel de caspases Apaf-1, soit *in- vitro* avec l'ajout de l'inhibiteur de caspases à large spectre Z-VAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone), suffit pour rediriger une mort cellulaire apoptotique vers une mort cellulaire nécrotique **(Chautan *et al.*, 1999)**. En fonction du contexte, la nécrose peut donc être complètement accidentelle, non contrôlée, ou alors au contraire « programmée » et constituerait un moyen efficace d'éliminer des cellules tumorales *in-vivo* en cas d'échappement à la résistance à l'apoptose **(Golstein & Kroemer, 2007)**.

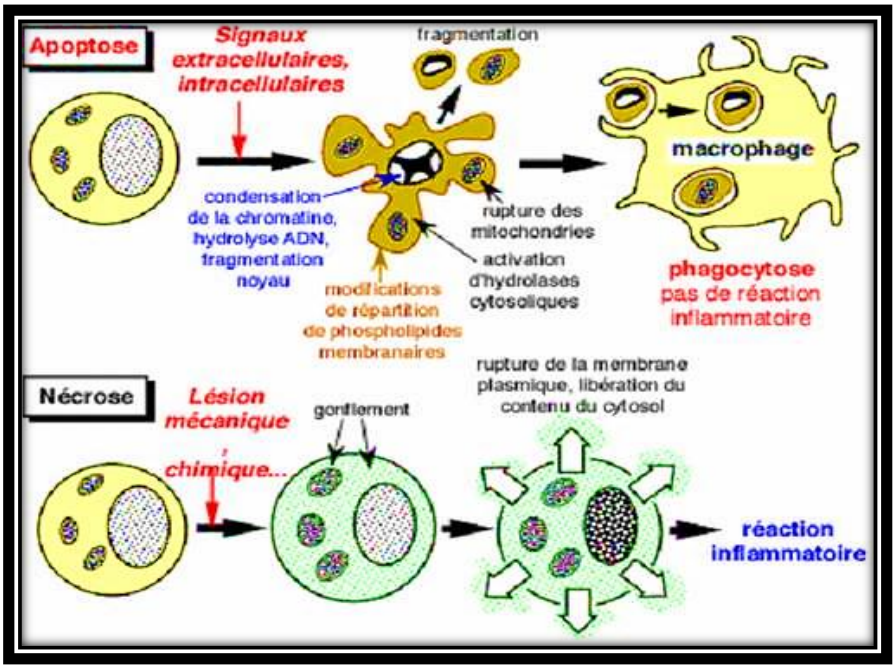


Figure 7: Principales caractéristiques de la mort cellulaire par voie de nécrose et d'apoptose **(Béchohra, 2017).**

1.4.4. L'autophagie

L'autophagie, est définit comme étant un processus cellulaire déclenché dans des conditions de stress. C'est un mécanisme de survie cellulaire, caractérisé par trois phases distinctes (Figure 8) :

- ***La phase initiale ou de nucléation*** : où des autophagosomes se forment aux niveaux des sites d'assemblage phagophore assembly site (PAS), composés de phagophores en formation et de protéines autophagiques. La nucléation survient après l'induction des phosphatidyl inositol-kinase de type 3(PI3K) de classe I régulateur négatif de l'autophagie par les mechanistic target of rapamycin (mTOR). Les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 jouent un rôle inhibiteur de l'autophagie en se fixant et inhibant le complexe vacuolar protein sorting 34 (VPS34)-Beclin 1 **(Mariño *et al.*, 2014; Jenzer *et al.*, 2017)**. Cette phase est caractérisée par l'isolement d'une double membrane, appelée phagophore, où une enveloppe forme le cargo autophagique. Cette membrane peut être dérivée du réticulum endoplasmique, de la membrane mitochondriale externe ou encore de la membrane plasmique.

- ***La phase d'élongation du phagophore*** : implique l'action de Atg12 (autophagy-

related proteins 12), Atg5, Atg16 et la conversion de LC3-I (microtubule-associated protein light chain 3) en LC3-II, forme associée à l'autophagosome. Les facteurs Atg 10, Atg 12 et Atg 16L achèvent la formation de l'autophagosome **(Thorburn, 2008; Janku *et al.*, 2011; Mariño *et al.*, 2014)**.

- ***La phase de maturation :*** l'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour former l'autophagolysosome ou l'autolysosome **(Galluzzi *et al.*, 2007; Kroemer *et al.*, 2009; Béchohra, 2017).**

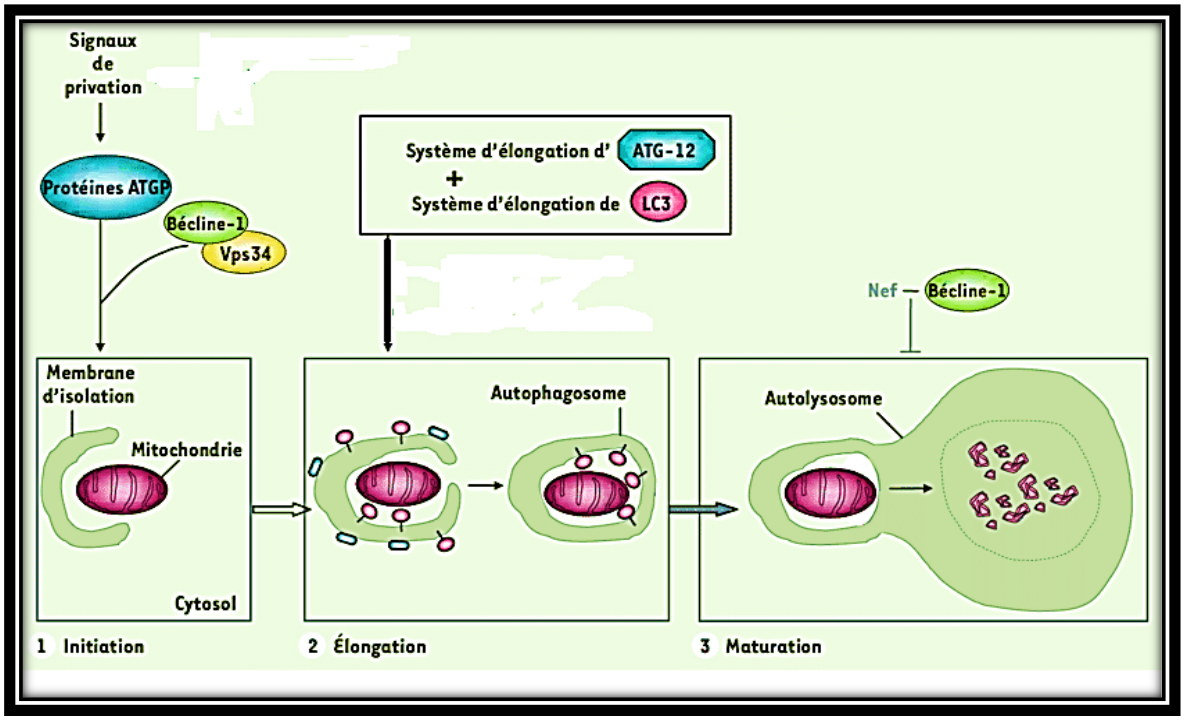


Figure 8: Les différentes étapes de la formation d'un autophagosome et les protéines impliquées. L'autophagie comprend 3 phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la maturation. La première phase **(1)** est initiée par la cellule en souffrance, les protéines ATG (autophagy-related proteins) sont activées et la membrane isolant l'organite endommagé ou le pathogène commence à se former. La deuxième phase **(2)** dite d'élongation fait intervenir le complexe ATG12 (formé des protéines ATG12, 5 et 16) ainsi que la protéine LC-3, qui, une fois clivée, se localise dans l'autophagosome. Dans la troisième étape **(3)** il y a fusion de l'autophagosome avec les lysosomes permettant ainsi la dégradation de l'organite ou du pathogène**(Le Roux *et al.*, 2010)**.

1.4.5. La sénescence

La sénescence est un arrêt irréversible en G1 radio-induit associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule. Après une irradiation, les cellules qui auraient

incomplètement réparé les dommages radio-induits, perdent leur capacité à se diviser et vont former des cellules géantes et /ou polynuclées. Au stade tardif, elle est caractérisée par la synthèse de grandes quantités de β-galactosidase et par l'érosion des télomères **(Béchohra, 2017)**.

1.5. Traitement du cancer

L'objectif du traitement du cancer est l'élimination de la tumeur cancéreuse ainsi que la prévention de l'apparition d'autres tumeurs localisées ou métastatiques. D'une façon générale, le traitement du cancer se fait grâce à des méthodes classiques ou alternatives **(Tigrine, 2014).**

1.5.1. La chirurgie

La chirurgie est un des principaux traitements des cancers, associée ou non à d'autres approches (chimiothérapie, radiothérapie…). Le traitement chirurgical d'un cancer consiste à retirer la tumeur ainsi qu'une marge de tissu sain l'entourant et les ganglions lymphatiques avoisinants, on parle de ″ tumorectomie ″. Malheureusement dans certains cas, l'ablation de la tumeur ne peut se faire sans retirer une partie importante, voire la totalité de l'organe malade. Parfois, en raison de sa localisation au sein de l'organe atteint ou de sa taille trop importante, la tumeur ne peut être retirée par chirurgie. Une chimiothérapie ou une radiothérapie dite ″ néoadjuvante″ peut alors être proposée ; en conduisant à une réduction du volume de la tumeur, ces traitements peuvent rendre l'opération finalement possible. Dans d'autres cas, le chirurgien se contentera de retirer une partie de la tumeur sans qu'il soit possible de la retirer entièrement. On parle alors de″ chirurgie palliative″ : le but n'est pas de guérir le patient mais de le soulager. Ce type d'intervention est notamment pratiqué lorsque la tumeur provoque des douleurs ou altère le fonctionnement d'un organe en appuyant sur les structures qui l'entoure **(https://sante.lefigaro.fr/)**.

1.5.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie passe par l'administration de médicaments qui détruisent les cellules cancéreuses. Elle peut être utilisée seule ou en association avec d'autres approches thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, thérapie ciblée…). En cas d'association avec une chirurgie ou une radiothérapie, la chimiothérapie peut être réalisée au préalable. On parle de chimiothérapie ″ néoadjuvante ″. L'objectif est généralement d'obtenir une réduction du

volume de la tumeur afin de faciliter la chirurgie ou la radiothérapie. La chimiothérapie peut aussi être prescrite après une chirurgie ou radiothérapie **(Chabner & Roberts, 2005)**. Elle est alors qualifiée ″d'adjuvante ″. Cette stratégie permet de détruire les cellules cancéreuses qui persisteraient dans l'organisme du malade après le premier traitement afin de minimiser le risque de rechute.

Les médicaments de chimiothérapie sont des molécules dites ″ cytotoxiques ″ qui agissent par différents modes d'action pour détruire les cellules qui se multiplient activement, en particulier les cellules cancéreuses. Malheureusement, elles exercent aussi leur toxicité sur certaines cellules saines telles que les cellules du sang, celles des muqueuses digestives, ou encore les poils et les cheveux **(Zelnak, 2007; Gerber, 2008).** C'est la raison pour laquelle elles entraînent de nombreux effets secondaires parfois pénibles. La plupart d'entre eux peuvent être soulagés par des traitements adaptés. Selon le niveau respectif auquel ils interviennent, ils sont classés comme suit: Les anti-métabolites, les alkylants, les antibiotiques anticancéreux et les antimitotiques **(Chabner & Roberts, 2005).**

1.5.3. L'immunothérapie

L'immunothérapie consiste à aider l'organisme à booster son système immunitaire, de façon à ce qu'il reconnaisse et élimine les cellules cancéreuses. On distingue trois formes d'immunothérapies **(Paul & Étienne, 2002)**: L'immunothérapie spécifique, l'immunothérapie non spécifique et l'immunothérapie cellulaire adoptive.

1.5.4. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est souvent utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hormono-dépendants, notamment le cancer de la prostate, le cancer du col de l'utérus, le cancer de la thyroïde et le cancer du sein. Elle agit sur la production des hormones responsables de la prolifération des cellules tumorales, soit par prise de médicaments pour la supprimer temporairement, soit par ablation de l'organe sécréteur de l'hormone impliquée **(Bershtein *et al*., 2004).**

1.5.5. La thérapie génique

En théorie, la thérapie génique repose sur une idée simple: si un gène est responsable d'une maladie, par exemple un cancer, il suffirait de le remplacer par un gène sain pour que la maladie guérisse d'elle-même. Mais en pratique, cette technique est encore loin d'être au

point! De plus, dans le cadre du cancer, son efficacité n'a pas encore été démontrée **(Ardaillou, 2002)**

1.5.6. La phytothérapie

Plusieurs études scientifiques ont confirmés les biens faits des plantes médicinales dans la guérison ou le soulagement de plusieurs maladies y compris le cancer. En effet, un nombre importants d'études *in- vitro* ont montré que les extraits bruts, aqueux ou hydro-alcooliques, de quelques plantes médicinales exercent un effet cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses **(Jo *et al*., 2008; Ray *et al*., 2010; Rakhi *et al*., 2011)**. Les flavonoïdes sont considérés parmi les molécules bioactives les plus importantes.

1.5.7. Les thérapies ciblées

La thérapie ciblée est le fondement de la médecine de précision. C'est un type de traitement du cancer qui cible les protéines qui contrôlent la façon dont les cellules cancéreuses se développent, se divisent et se propagent. À mesure que les chercheurs en apprennent davantage sur les modifications de l'ADN et les protéines qui sont à l'origine du cancer, ils sont mieux à même de concevoir des traitements prometteurs qui ciblent ces protéines.

Ils agissent en ciblant des molécules présentes en quantité importante au niveau des cellules tumorales mais absentes ou rares dans le reste de l'organisme.

Il existe désormais de nombreuses familles de molécules de thérapie ciblées des cancers, agissant chacune sur des cibles différentes pour bloquer la multiplication des cellules cancéreuses.

Il existe également des traitements ciblés dits ″anti-angiogéniques ″. Ces médicaments bloquent la formation des vaisseaux qui irriguent les tumeurs. Les vaisseaux en question sont nécessaires à l'approvisionnement des cellules tumorales en oxygène et en nutriment. Les traitements anti-angiogéniques agissent donc en asphyxiant et en affamant les tumeurs**(https://www.cancer.be/les-cancers/jeunes-et-cancer/les-traitements/les-nouveaux-traitements-anti-cancer)**.

La thérapieciblée présente cependant, certains inconvénients. En voici quelques-uns : Les cellules cancéreuses peuvent devenir résistantes à la thérapie ciblée. C'est pourquoi elles peuvent être plus efficaces lorsqu'elles sont utilisées avec d'autres types de thérapie ciblée ou avec d'autres traitements anticancéreux, comme la chimiothérapie et la radiothérapie. Les

médicaments pour certaines cibles sont difficiles à mettre au point. Les raisons en sont notamment la structure de la cible, la fonction de la cible dans la cellule, ou les deux.

1.5.8. La radiothérapie (RT)

La radiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique les plus importants pour faire face aux cancers, elle est fondée sur l'utilisation de rayonnements ionisants de haute énergie qui vont détruire les cellules cancéreuses. Les rayons provoquent des lésions sur toutes les cellules qu'ils touchent, que ce soient des cellules cancéreuses ou saines. C'est ce qui explique les effets secondaires. Donc le travail du radiothérapeute est de maximiser l'efficacité de la radiothérapie sur la tumeur, tout en minimisant la toxicité sur les tissus sains et les organes avoisinants, aussi appelés organes à risque. Pour cela, il faut concentrer le plus précisément possible l'irradiation sur le volume de la tumeur. Cette stratégie peut être utilisée seule ou en association avec d'autres méthodes (chirurgie, chimiothérapie…). Elle peut être administrée selon deux types de modalité : en externe ou en interne **(Meyer *et al*., 2007).**

►**La radiothérapie externe :** Dans ce cas les rayonnements ionisants sont émis sous la forme de faisceaux par un accélérateur linéaire de particules situé à distance du patient. Ils traversent la peau pour atteindre la tumeur. La dose de rayons nécessaire à la destruction de la tumeur dépend des caractéristiques de cette dernière. Elle est calculée par le radiothérapeute, puis fractionnée pour être administrée au cours de plusieurs séances (généralement quatre à cinq séances par semaine pendant plusieurs semaines).

►**La radiothérapie interne ou curie thérapie :** Elle est basée sur l'utilisation de sources radioactives placées dans le corps du patient, directement au contact de la tumeur. Ces sources sont généralement des billes ou des fils. Elles peuvent être placées dans une cavité naturelle de l'organisme (vagin, utérus, œsophage…) ou implantées au sein même de la tumeur (tumeur prostatique ou mammaire) **(https://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/cancer-presentation-generale/radiotherapie).**

2. *Bacillus thuringiensis (Bt)*

L'espèce *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est une bactérie aérobie, sporulée, Gram positif en forme de bâtonnet. Elle se caractérise par la production d'un cristal protéique lors de sa sporulation **(Höfte *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1989)** (Figures 9 &10). Durant sa phase végétative (active), *Bt* a une longueur de 5 µm et une largeur de 1 µm et est pourvue de flagelles. C'est une bactérie ubiquitaire, ce qui signifie que l'on peut la retrouver un peu partout dans la nature; que ce soit dans le sol, sur le feuillage, dans l'eau et même dans l'air. Elle fait partie du groupe *Bacillus cereus* qui comprend six espèces dont : *B.anthracis*, *B.cereus*, *B.mycoides*, *B.pseudomycoides* et *B.weihenstephanensis* **(Auger, 2015)**. C'est d'ailleurs par son inclusion parasporale sous la forme d'un cristal protéique que l'on distingue formellement *B. thuringiensis* de *B.cereus* **(Glare & O'Callaghan., 2000)**.

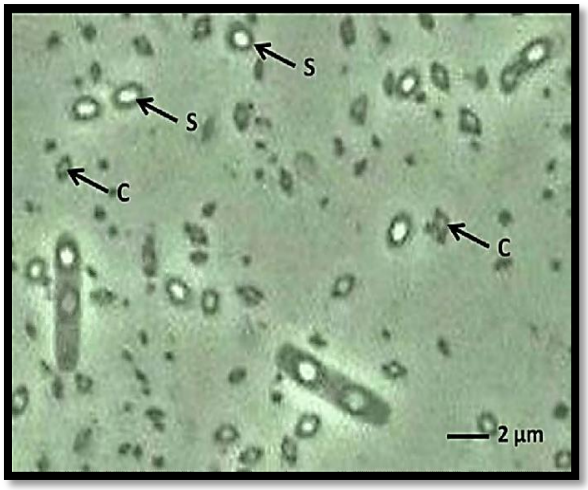


Figure 9: Spores (**S**) et cristaux (**C**) de *B. thuringiensis* en microscopie à contraste de phase (photo Jim Deacon, Université d'Edimbourg) **(Martin *et al.*, 2012).**

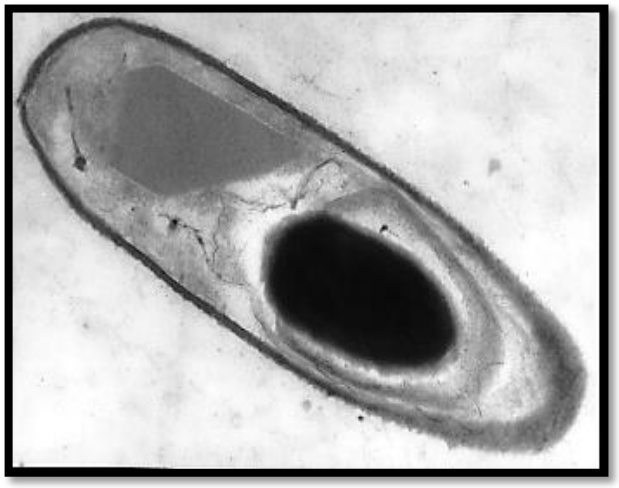


Figure 10: Coupe longitudinale de *B.thuringiensis* en fin de sporulation. Observation par microscopie électronique. On distingue le cristal protéique à propriétés insecticides (inclusion parasporale de forme bipyramidale) et la spore (forme ovoïde noire) **(Sanchis *et al.*, 2016).**

2.1. Histoire de *Bacillus thuringiensis*

En 1901 et 1902, une bactérie sporulée a été isolée par un biologiste japonais, Ishiwata Shigetane à partir de larves de ver à soie malades, *Bombyx mori*. En 1905, il a décrit cette bactérie comme étant l'agent causal d'une maladie affectant les vers à soie "bacille de la maladie de Sotto" **(Ishiwata, 1901; Ishiwata, 1902; Ishiwata, 1905)**.

En 1908, Iwabuchi, et en 1915 et 1916, Aoki et Chigasaki, ont ré-étudié cette bactérie qu'ils ont désignée sous le nom de *Bacillus sotto* **(Iwabuchi, 1908; Aoki & Chigasaki, 1915; Aoki & Chigasaki, 1916)**.Ils ont constaté que son activité était due à une toxine présente dans les cultures sporulées, mais pas dans les cultures de cellules végétatives.

C'est en 1911, que l'allemand a décrit pour la première fois une nouvelle souche de bacille, *Bacillus thuringiensis* (avec son corps parasporal), isolée de la pyrale méditerranéenne de la farine "*Anagasta kuehniella*"(= Ephestiakiihniella) **(Berliner, 1911).** Il lui a donné le nom de la province de Thuringe, située en Allemagne, où la pyrale infectée a été trouvée **(Roh et *al*., 2007).**

En 1927, Mattes a ré-isolé le bacille du même insecte **(Mattes, 1927)**. Metalnikov et Chorine (1929) ont appelé ce microorganisme *Bacterium thuringiensis*.

Un regain d'intérêt pour le *Bt* a été attribué à Edward Steinhaus, qui a obtenu une culture en 1942 et a attiré l'attention sur le potentiel du *Bt* par ses études ultérieures **(Steinhaus *et al*., 1951)**.

En 1951, Toumanoff et Vago **(Toumanoff & Vago,1951)** ont isolé une bactérie similaire à la bactérie japonaise et aux souches allemandes qu'ils sont appelée *Bacillus cereus var. alesti*.

En 1953, Hannay travaillant avec le *Bacillus thuringiensis Berliner* a suggéré pour la première fois que la pathogénicité de l'organisme pourrait être associée aux corps parasporaux en forme de "diamant" ou aux "cristaux" formés dans le sporangium au moment de la formation des spores **(Hannay, 1953).**

Puis, en 1956, le microbiologiste canadien Fitz-James Angus a démontré que les inclusions de protéines cristallines formées au cours de la sporulation étaient responsables de l'action insecticide de *Bt* **(Angus *et al*., 1956)** et a confirmé l'hypothèse de Hannay.

La production commerciale a débuté en France en 1938, sous le nom de "Sporeine" **(Lambert *et al*., 1992).**

Au début des années 1980, Gonzalez et *al*., ont révélé que les gènes codant pour les protéines cristallines (Cry) étaient localisés sur des plasmides transmissibles, en utilisant une technique de traitement de plasmides **(Gonzalez *et al*., 1982).**

En 1981, les scientifiques Schnepf et Whiteleyont été les premiers à cloner et caractériser les gènes codant pour le cristal des protéines toxiques sur *E. coli* à partir de l'ADN plasmidique du *Btsubsp*. *kurstaki HD-1* **(Schnepf *et al*.,1981; Bravo *et al*.,2005)**.

Ce premier clonage a été suivi rapidement par le clonage de nombreux d'autres gènes *cry* et a finalement conduit au développement de plantes transgéniques *Bt*. Dans les années 1980, plusieurs scientifiques ont successivement démontré que les plantes peuvent être génétiquement modifiées, d'où la naissance de coton-*Bt* en 1996 **(Ben-Dov *et al*., 1997; Shelton *et al*.,2002; Roh *et al*., 2007).**

2.2. Classification de *B. thuringiensis*

Le Bt appartient aux *Bacillaceae* et est étroitement lié à *Bacillus cereus* avec des teneurs en ″G + C″allant de 32 à 69% **(Gordon *et al*., 1973; Buchanan *et al*.,1974; Jensen *et al*.,2003; Lee *et al* ., 2006).** La seule différence phénotypique notable entre les deux est la production d'un ou plusieurs cristaux insecticides. Cependant, il existe de nombreux cristaux de Bt sans activité insecticide connue.

En outre, de nombreuses souches cristallifères ont été décriteset peuvent être facilement obtenues soit par mutagenèse chimique ou par curage plasmidique, ce qui nous donne des cellules phénotypiquementimpossible à distinguer de *B.cereus*. En outre, des études récentes d'un grand nombre de souches ont indiqué que *B. thuringiensis* et *B. cereus* doivent être considérés comme une seule espèce **(Roh *et al*., 2007; Okassov *et al*., 2015).**

La classification des souches Bt a été réalisée par le sérotypage H, la réaction immunologique à l'antigène flagellaire bactérien **(deBarjac *et al*., 1962)**. Le gène *hag* codant pour la flagelline est responsable du déclenchement de la réaction immunologique dans le sérotypage H. Des séquences spécifiques d'acides aminés de flagelline ont été corrélées à des sérotypes H spécifiques de Bt et au moins 69 sérotypes H et 82 variétés sérologiques (sérovars) de *Bt* ont été caractérisés **(Lecadet *et al*., 1999; Ibrahim, 2010).**

Le sérotypage H est toutefois limité dans sa capacité à distinguer les souches du même sérotype H ou du même sérovar, il est devenu nécessaire de développer des outils alternatifs pour la classification et le regroupement des souches et isolats *Bt*. En conséquence, plusieurs programmes de criblage ont été mis en place pour isoler de nouvelles souches Bt aux propriétés insecticides uniques **(Ibrahim, 2010).**

Selon la classification de **Sanchis *et al,* (2008)**, *Bacillus thuringiensis* appartient au :

Règne: *Bacteria*

Embranchement:*Firmicutes*

Classe: *Bacilli*

Ordre:*Bacillales*

Famille :*Bacillaceae*

Genre : *Bacillus*

Espèce : *B.thuringiensis*

2.3. Cycle biologique de *Bacillus thuringiensis*

Cette espèce appartient au groupe I; selon **(Gordon et *al*., 1973).** Sa croissance est similaire aux autres espèces endosporogènes, elle passe par 4 principales étapes **(Hilbert & Piggot, 2004; Berbert-Molina *et al*., 2008)** (Figure 11):

a.Croissance végétative

Bacillus thuringiensis est sous sa forme végétative (germination de la spore) que lorsque les nutriments sont suffisants et les conditions environnementales sont convenables pour sa croissance. La cellule végétative se divise en deux cellules filles uniformes par la formation d'un septum de division initié à mi-chemin le long de la membrane plasmique. Durant cette phase de croissance végétative, les cellules de *B.thuringiensis* continuent à se multiplier jusqu'à ce qu'un des nutriments (sucres, acides aminés ou phosphate) ou le dioxygène dissous deviennent insuffisants pour la croissance végétative **(Liu & Tzeng, 2000; Rahbani, 2015).**

b. Transition à la sporulation

Dans ces conditions, la bactérie sporule produisant une spore et une inclusion cristalline.

c. Sporulation

La sporulation est une manifestation physiologique de la bactérie une fois que les nutrimentsnécessaires à sa survie deviennent rares et les conditions environnantes difficiles. Lors du passage de la phase végétative à la sporulation, des changements significatifs sont observés au niveau du métabolisme et de la cinétique cellulaire **(Rivera, 1998).** La production de protéines cristallines de *B.thuringiensis* résultant de l'assemblage de plusieurs sous unités protéiques (dites δ-endotoxines) pendant la sporulation est un phénomène biologique unique

régulé génétiquement qui, probablement, soulage le stress physique par compensation de la perte d'eau au cours de la formation de spores **(Molva *et al.*, 2009)**. De plus, elle offre un avantage de survie supplémentaire en exerçant une action létale contre les insectes hôtes qui sous l'action toxique offrent des nutriments permettant la germination de la spore et son retour à la croissance végétative **(Rahbani, 2015**).

d. Maturation de la spore et lyse cellulaire

Quand le milieu devient propice, le sporange s'autolyse et libère la spore et le cristal. La spore peut ainsi germer pour redonner à nouveau la cellule végétative qui prolifère en trouvantde bonnes conditions **(Loudhaief, 2018).**

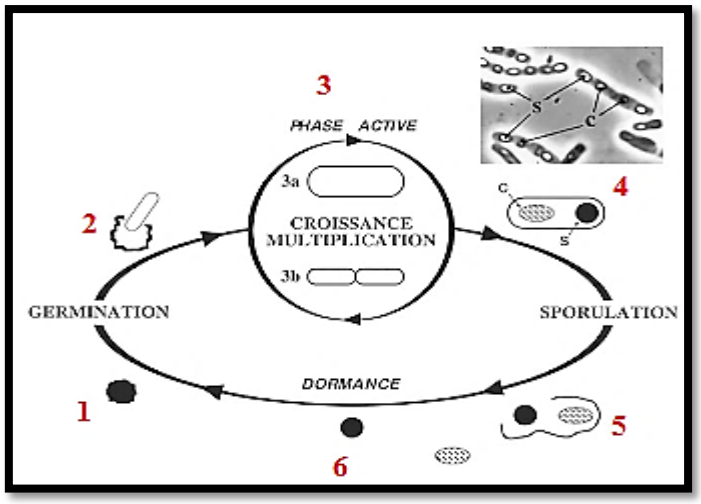


Figure11 : Schématisation du cycle vital d'un *B.thuringiensis.* **1** : Germination (réhydratation de la spore), **2** : Germination (Production de la cellule végétative), **3** : croissance et multiplication des cellules végétatives, **4** : sporulation (formation de la spore (s) et de l'inclusion cristalline (c)), **5** : Lyse (libération de la sporange), **6** : Période de dormance (la spore résiste aux conditions défavorables) **(Lacoursière *et al.*, 2004; Rahbani, 2015).**

2.4. Culture de *B.thuringiensis*

La production commerciale de Bt est réalisée à l'aide de milieux de culture basés sur des sources de nutriments complexes. Le but principal de la fermentation est d'obtenir de grandes quantités de cristaux de Bt. Le cristal parasporal du Bt peut représenter jusqu'à 25 % du poids sec de la cellule sporulée. Pour optimiser la production de cristaux, il est nécessaire de disposer d'un milieu de culture approprié car la toxicité obtenue à la fin de la fermentation dépend du milieu de culture et des conditions de fonctionnement. Les milieux de culture qui

ont été signalés dans la littérature pour une croissance et une sporulation élevées peuvent être utilisés pour toute variété de Bt. Une croissance cellulaire élevée ne garantit pas toujours une production élevée de protéine Cry ou une activité insecticide accrue. Divers milieux de culture ont été utilisés pour la croissance et la sporulation élevées de Bt en laboratoire : milieu 2XShigel Gibbons "SG" **(Leighton & Doi, 1971)**, milieu Pomme de terre Agar "PDA"**(Thorne, 1968)**, G medium additionné de 0.01 M tris(hydroxymethyl)aminomethane"G-Tris" **(Aronson *et al.*, 1971)**, milieu de Nakata ou chemicallydefinedgrowth and sporulation médium "CDGS" **(Nakata, 1964).** D'autres milieux avec des substrats peu coûteux ont été signalés par **(Dulmage *et al.*, 1970; Goldberg *et al.*, 1980; Smith, 1982; Salama *et al.*, 1983; Foda *et al.*, 1985; Pearson & Ward, 1988).**

- **Facteurs affectant la production de cristal**

D'après les revues de littérature, la composition du milieu de culture, les paramètres et les conditions de fermentation semblent affecter la croissance, la sporulation, la synthèse des cristaux et des endotoxines **(Foda *et al.*, 1985; Bernhard & Utz, 1993; Sachveda *et al.*, 1999)**.

Plusieurs facteurs influencent la production de cristaux :

1) La source de carbone : Le glucose est la source de carbone la plus appropriée pour la croissance et la sporulation du Bt **(Smith *et al.*, 1982)**. Lorsque le glucose a été épuisé lors de la fermentation, son absence peut déclencher la sporulation. L'utilisation de l'une ou l'autre source de carbone affecte l'activité biologique et la morphologie des cristaux **(Dulmage *et al.*, 1970).**

2) Source d'azote : Une source appropriée d'acides aminés permet des taux de croissances élevées et une forte sporulation des souches de Bt. Son absence retarde la sporulation et le faible rendement des protéines Cry **(Goldberg *et al.*, 1980)**.

3) Rapport carbone/azote : Des tauxcarbone/azote(C:N) plus élevés n'épuisent pas le glucose à la fin de la fermentation et le rendement de la biomasse diminue. Plusieurs auteurs ont recommandé un rapport C:Nde (7,5:1) **(Salama *et al.*, 1983; Foda *et al.*, 1985)**.

4) Oxygène : Des taux d'aération élevés sont importants pour une formation élevée de spores

et de toxines. Comme le coefficient de transfert d'oxygène (kLa), l'augmentation de la biomasse et la formation de protéines Cry sont augmentées **(Rowe & Margaritis, 1987**).

5) Potentiel d'oxydo-réduction (pH) : Le pH optimal pour la croissance du Bt est de 6,8 à 7,2. Si le pH s'élève à 9,0, la protéine Cry peut être dissoute

6) Température : La température optimale du Bt est de 28-32°C. Des températures plus élevées favorisent les pertes de plasmides ou de mutants Bt **(Rowe & Margaritis, 1987).**

2.5. Activité insecticide des δ-endotoxines du *Bt* et leur mode d'action « Poison stomacal »

Lorsqu'une larve se nourrit de feuilles traitées par le Bt, les inclusions cristallines de ce dernier sont partiellement dissoutes dans son tractus digestif alcalin, libérant ainsi de longues chaînes de protéines qui sont les différents précurseurs des toxines appelées protoxines ou ∂-endotoxines (delta-endotoxines).

Ces protoxines ou ∂-endotoxines sont clivées par des protéases pour nous donner de petites protéines ou peptides de tailles prédéterminées que l'on dénomme «toxines». La protéine cristalline du *Bt* contient au moins quatre de ces segments toxiques, chacun possédant sa propre activité **(Ibarra & Federici, 1986; Ward *et al.*, 1986; Becker & Margalit, 1993; Margalith & Ben-Dov, 2000).**

Des travaux antérieurs ont démontré que le site initial de l'action toxique se situeau niveau des cellules de la paroi de la portion médiane du tractus digestif de la larve **(de Barjac, 1978; Hofmann & Lüthy, 1986)**. Le liquide alcalin composé d'enzymes intestinales va scinder la protéine en petits segments toxiques, ces derniers vont venir par la suite se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques du tube digestif (les toxines sont ainsi immobilisées sur la membrane de ces cellules) **(Honée & Visser, 1993).**

L'activation des toxines va provoquer un déséquilibre biochimique, les cellules affectées se gonflent et éclatent, causant la perforation de la paroi du tube digestif (Figure 12) **(Charles & de Barjac, 1983).** Ensuite, passage du suc digestif dans la cavité corporelle de l'insecte et de ce fait causer un mouvement inverse de l'hémolymphe (l'équivalent du sang chez les insectes) qui va causer à son tours de graves effets neurologiques **(Cheung *et al.*, 1986)**. Cependant, l'éclatement de son tube digestif semblerait être la cause de la mort par empoisonnement de

l'insecte **(Lüthy & Ebersold., 1981 (a et b); Chilcott *et al*., 1990).**

La présence ou l'absence de récepteurs cellulaires appropriés semble être un des facteurs primordial pour la toxicité des cristaux de Bt. Étant donné que le type de protéines assemblées dans l'inclusion cristalline peut varier entre sous-espèces de *Bt*, l'intensité de l'effet toxique observée serait donc le résultat de la grande affinité ou du grand nombre de récepteurs présents chez une espèce d'insecte donnée **(Honée & Visser, 1993).** Ceci explique sans doute la différence de susceptibilité d'un insecte aux cristaux des différentes sous-espèces de *Bt*. Par exemple, les cristaux de *Bt* var. *kurstaki* sont très actifs contre les lépidoptères, mais ne démontrent qu'une faible activité contre les moustiques et aucune activité contre les mouches noires, tandis que les cristaux de *Bt* var. *israelensis* sont très actifs contre les moustiques et les mouches noires, mais n'ont qu'une faible, voire aucune activité contre les larves de lépidoptères **(Federici *et al*., 1990).**

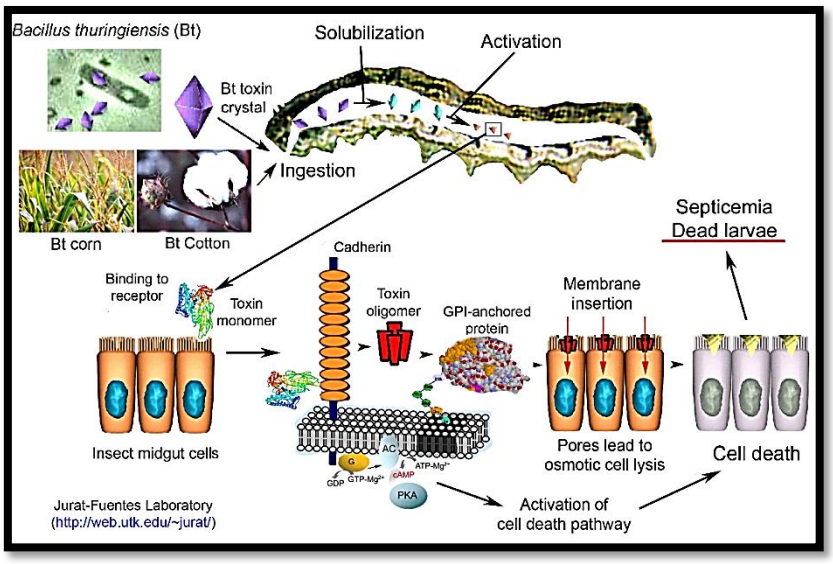


Figure 12: Représentation schématique du mode d'action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur une larve de moustique **(Agaisse *et al*., 1999; Schünemann, 2014)** Modifié par (**Whalon & Wingerd, 2003)**.

2.6. Les δ-endotoxines de *Bacillus thuringiensis*

L'activité insecticide de *Bacillus thuringiensis* est due à sa capacité de produire de grandes quantités de protéines, qui se trouvent dans l'inclusion parasporal pendant la phase de sporulation. Ces protéines cristallines sont également connues comme les δ-endotoxines.

Il existe deux familles de delta-endotoxines: la famille des cristaux delta-endotoxines(Cry) à

activité insecticide spécifique et la famille des protéines cytolysines (Cyt), à activité cytolytique non spécifique. Ces δ-endotoxines peuvent représenter 20 à 30 % du poids sec des cellules sporulées **(Helassa, 2008)**. Elle sont synthétisées suite à l'expression des gènes Insecticid Crystal Proteins (ICPs) ou *cry* présents sur des plasmides dont la taille est supérieure à 30 MDa **(Gonzàlez et *al*.,1981; Aronson *et al*.,1986; Whiteley & Schnepf, 1986; Lereclus *et al*., 1989; Djenane, 2017).**

La famille des Cry protéines comprend les toxines Cry à 3 domaines (3D-Cry), les toxines binaires (Bin) de *Bacillus sphaericus* et les toxines Epsilon /*Bacillus* mosquitocidal toxin (Etx/Mtx) (Figure 13). Elles partagent un certain degré d'homologie, ce qui suggère qu'elles ont une origine évolutive commune **(de Maagd *et al*., 2003a).** La plus grande catégorie du groupe est celle des toxines à 3 domaines **(Crickmore *et al*., 2018)**. L'homologie de séquence des acides aminés a permis d'identifier plus de 300 holotypes de toxines Bt qui ont été organisés en 73 familles de Cry et 3 familles de Cyt **(Xu *et al*., 2014).**

La famille des toxines de Cyt partagent peu d'homologie de séquence avec les toxines Cry. Le terme "toxine cytologique" est défini comme suit : "la ou les toxines dérivées de Bt présentent une activité hémolytique et toute autre protéine présentant une similarité de séquence évidente est désignée comme telle **(Schnepf *et al*., 1990; Schnepf *et al*., 1998; El Higazi, 2019).**

2.6.1. Les toxines Cyt

a. Structure des protéines Cyt

Les protéines Cyt sont des pro-toxines de ~23 à 40 kDa présentes exclusivement dans les inclusions cristallines de certaines souches de *Bacillus thuringiensis* actives sur les larves de Diptères. Les trois classes de toxines Cyt possèdent 39% d'identité en acides aminés **(Koni & Ellar, 1993)**; en revanche, elles ne présentent aucune similitude avec les protéines Cry **(Crickmore *et al*., 1998)**. Sa structure consiste en un seul domaine composé d'une couche externe d'hélice α enroulé autour de plusieurs feuillets β **(Schnepf *et al*., 1998)**. L'activité toxique implique les mêmes étapes de solubilisation, d'activation protéolytique et d'insertion dans la membrane que les toxines Cry. Cependant, à la différence de ces dernières, les toxines Cyt interagiraient avec la bicouche lipidique membranaire sans intervention de protéines membranaires spécifiques **(Knowles *et al*., 1989; Knowles, 1994)** (Figure 14).

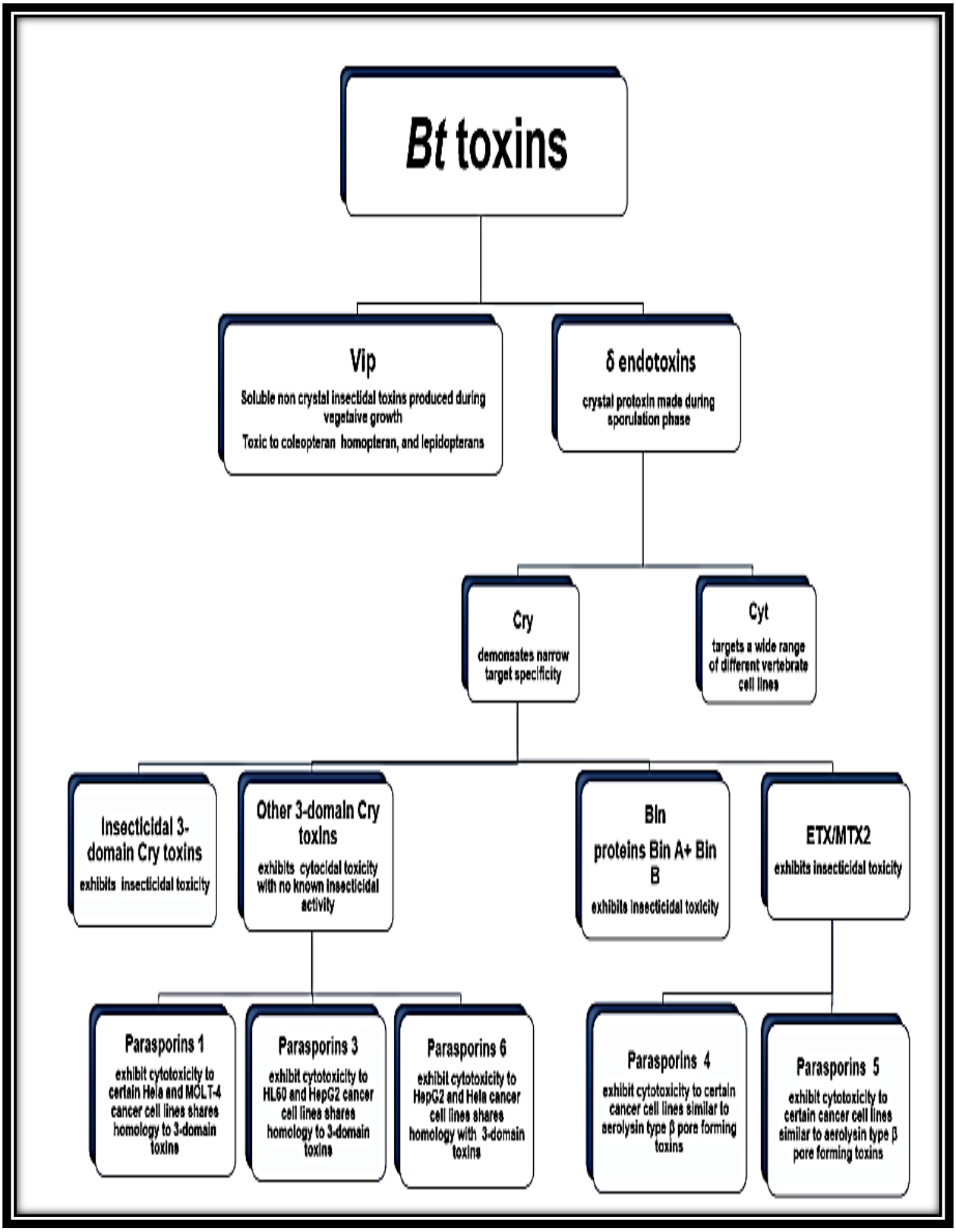


Figure13 : Classification des Bt toxines en se basant sur l'homologie des séquences protéiques**(El- Higazi, 2019).**

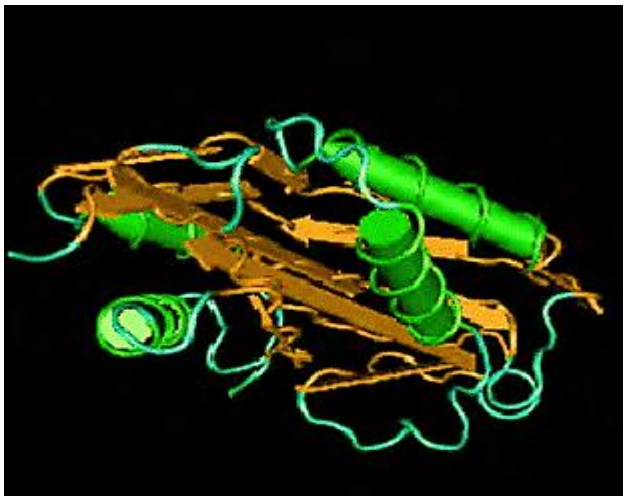


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la δ-endotoxine insecticide Cyt 2Ba de *Bacillus thuringiensis* **(Cohen *et al*., 2008).**

2.6.2. Les protéines Cry

Les protéines Cry sont synthétisées sous forme de protoxines d'environ 70 kDa à 130 kDa dont la forme toxique est de 66-67 kDa (moitié N-terminale du précurseur) **(Helassa, 2008)**.

Les toxines ont été classées à l'origine par **Höfte & Whiteley** en **1989**, présentées dans une classification avec quatorze séquences de gènes codant pour les protéines Cry en quatre classes, en fonction de leur homologie de séquence d'acides aminés et de leur spécificité insecticide supplémentaires **(Hernández-Fernández *et al*., 2011)**.

Dans la classification proposée par **(Crickmore *et al*., 1998),** les gènes *cry* sont divisés en 51 groupes et sous-groupes et les toxines Cry sont séparées en six grandes classes selon les spécificités de leur insecte hôte et comprennent selon **Feitelson *et al*., (1992)**:

Groupe 1 : Lepidoptère (Cry1, Cry9 et Cry15) ;

Groupe 2 : Lepidoptère et diptère (Cry2) ;

Groupe 3 : Colécoptère (Cry3, Cry7 et Cry8) ;

Groupe4 : Diptéride (Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20) ;

Groupe 5 :Lepidoptère et coléoptère (Cry1I) ;

Groupe 6 : Nématodes (Cry6)

Récemment, et selon les mêmes critères, **(Crickmore *et al*., 1998)** ont établi un nouveau système de classification. Dans leur méthode de classification, chaque protéine a acquis un nom composé du Cry mnémonique et de quatre lignes hiérarchiques composées de chiffres,

de majuscules des lettres, des minuscules et des chiffres (par exemple Cry1Aa1). Par conséquent, les protéines ayant moins de 45 % sont placées au niveau primaire (Cry1, Cry2, etc.), et avec 78% et 95% constituent les frontières du niveau secondaire et du niveau tertiaire, respectivement. Ce système remplace l'ancienne nomenclature qui utilisait les chiffres romains. Cette classification est constamment mise à jour et disponible à l'adresse suivante : **(http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).**

a. Structure moléculaire des toxines Cry à trois domaines (3D-Cry)

Les protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* sont composées de trois domaines dont la structure est étroitement liée à leur mode d'action (Figure 15).

- **Le domaine I :** constitué de 7 hélices α. L'hélice α5, très hydrophobe, est entourée par les 6 autres hélices. Ce domaine présente des similitudes structurales avec la région formatrice de pores à travers la membrane **(Slatin *et al.*, 1990; Crochulski *et al.*,1995).**Compte tenu de ces caractéristiques, les protéines Cry sont classées comme des toxines formatrices de pores (PFT). C'est dans ce sens que le domaine I est le mieux conservé parmi toutes les toxines Cry, comme c'est le cas de la colicin Ia (autre PFT) **(Mendoza-Almanza *et al.*, 2020)**.

- **Le domaine II :** composé de 3 feuillets β antiparallèles arrangés en prisme. Ce domaine est considéré comme étant la région déterminant la spécificité, qui pourrait être impliquée dans la reconnaissance des récepteurs membranaires **(Ge *et al.*, 1989; Widner & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*,1990; Masson *et al.*,1994)**.

- **Le domaine III :** composé de deux feuillets β antiparallèles organisés en sandwich β **(Grochulski *et al.*, 1995)**. Il correspond au domaine le plus conservé entre les deux protéines Cry et Cyt, mais sa fonction n'a pas encore été clairement établie. Il pourrait être impliqué dans la stabilité de la toxine, en protégeant la protéine de la dégradation par des protéases **(Li *et al.*, 2011)**.

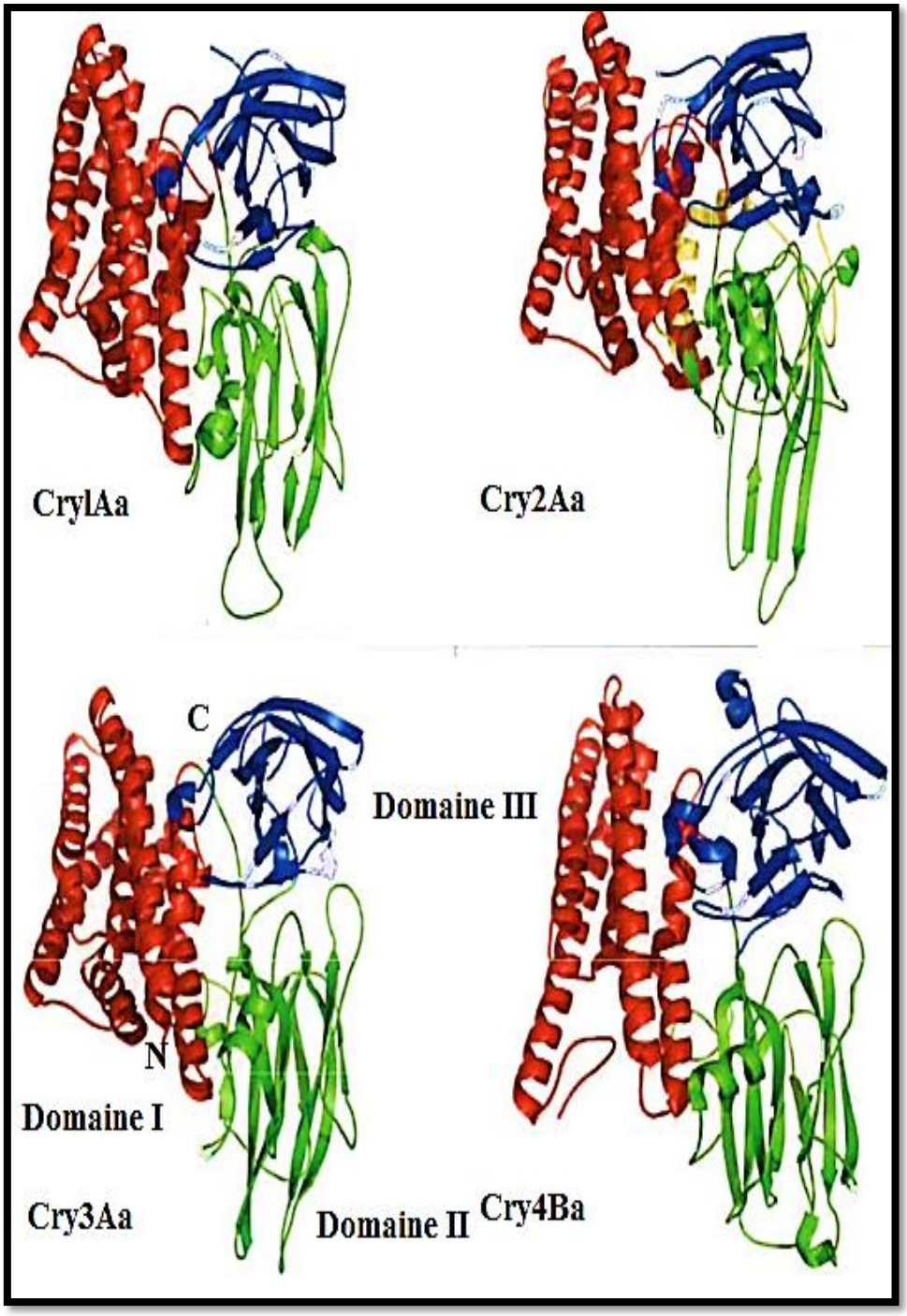


Figure 15: Structure en trois dimensions des protéines CrylAa, Cry2Aa, Cry3Aa et Cry4Ba. **Le domaine I** (**Rouge**), situé du côté N-terminal, est constitué d'hélices alpha. Il serait le responsable de la formation de pores dans la membrane cellulaire de l'insecte. **Le domaine II** (**vert**) assure la spécificité au récepteur grâce aux régions hypervariables qu'il contient. **Le domaine III (bleu**) protège l'extrémité C-terminale de la toxine contre l'activité protéolytique du tube digestif de l'insecte **(Pigott & Ellar, 2007; Guo *et al*., 2009).**

3. Les Parasporines

3.1. Découverte des parasporines

Des études sur des souches de *B. thuringiensis* isolées de milieux naturels divers ont révélées que de nombreuses souches de *B. thuringiensis* produisaient une protéine cristalline non insecticide.

Ces souches sont plus largement distribuées que les souches produisant les protéines insecticides **(Ohba *et al*., 1978; Meadows *et al*.,1992; Roh *et al*.,1996)**. Ainsi, la question se pose à savoir ce que peut bien avoir ces protéines d'inclusion non insecticides comme activité biologique? Bien que cette question demande encore à être clarifiée, des études récentes ont fourni une réponse, en prouvant que quelque unes de ces souches de *B. thuringiensis* produisant des protéines d'inclusion non insecticides possédaient une activité cytotoxique envers les cellules humaines cancéreuses. Ce qui soulève la possibilité que ces protéines appelées « parasporine » pourraient être utilisées à des fins médicales **(Mizuki *et al*., 1999)** (Figure 16).

C'est en **1999**, que **Mizuki** et ses collaborateurs ont étudié pour la première fois les protéines d'inclusion parasporale. Un total de 1744 souches de *B. thuringiensis* ont été testées aussi bien pour l'activité cytotoxique envers les cellules T de leucémie humaine que pour l'activité hémolytique envers les érythrocytes de mouton.

La majorité des souches de *B.thuringiensis* n'ont pas d'activité hémolytique (1684 souches), alors que 42 présentaient une activité cytotoxique *in-vitro* envers les cellules T leucémique. Ces souches non hémolytiques mais cytotoxiques envers les cellules leucémiques appartenaient à plusieurs H-serovars dont : le *Dakota*, le *neoleonensis*, le *shandongiensis*, le *coreanensis* et autres sérogroupes non identifiés **(Mizuki *et al*., 1999)**.

Les inclusions parasporales purifiées de 3 souches sélectionnées, désignées **84-HS-1-11**, **89-T-26- 17** et **90-F-45-14**, ne présentaient aucune activité hémolytique et aucune activité insecticide contre les insectes diptères et lépidoptères, mais elles étaient hautement cytotoxiques envers les cellules T de la leucémie ainsi que d'autres cellules cancéreuses avec des spectres de toxicité différents et des niveaux d'activité variés.

En outre, les protéines des souches **84-HS-1-11** et **89-T-26-17** ont été capables de faire la distinction entre les cellules T cancéreuses de la leucémie et les cellules normales en tuant spécifiquement les cellules cancéreuses leucémiques et non saines. Suite à cette découverte

des scientifiques, ont conclu que ces résultats pourraient conduire à l'utilisation de ces protéines d'inclusion de *B. thuringiensis* en tant que biomolécule anticancéreuses.

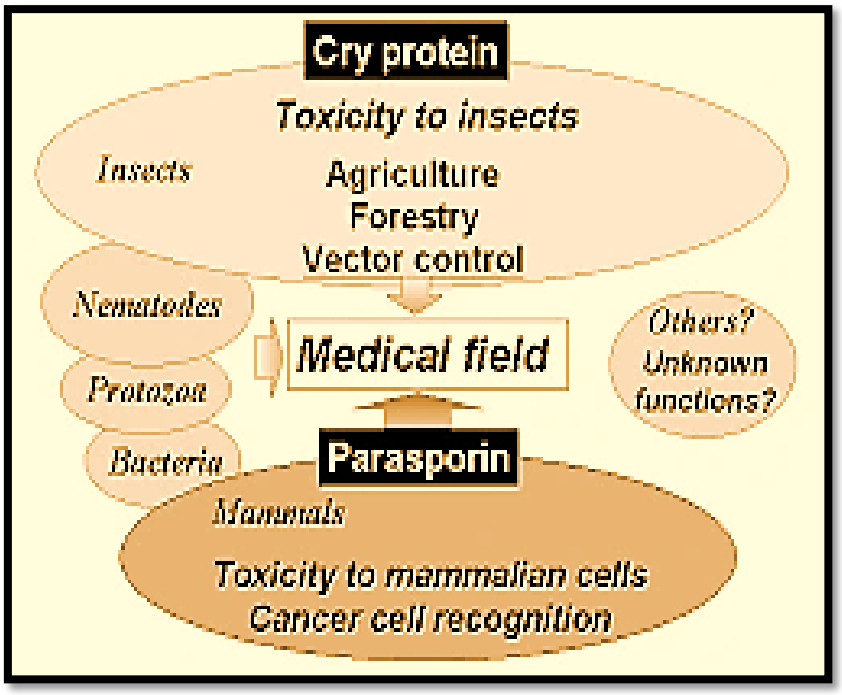


Figure 16: Les toxines Bt et de leur différentes applications **(Kitada *et al.*, 2009).**

3.2. Classification des parasporines

La parasporine (PS) est une collection généalogique de protéines Cry hétérogènes synthétisées uniquement par la souche *Bacillus thuringiensis*. Une caractéristique importante couramment associés à la protéine PS est la forte activité cytocide préférentielle pour des cellules cancéreuses humaines de différentes origines (ces protéines ont une activité cytocide seulement quand elles sont digérées par les protéases).

Actuellement, un total de 19 parasporines ont été identifiées et classées en six groupes :

PS1, PS2, PS3, **PS4, PS5 et PS6** selon "The Committee of Parasporin Classification and Nomenclature" **(http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/index.html)** (Figure17). Des différences marquées sont évidentes dans les spectres de cytotoxicité et les niveaux d'activité entre les six familles. L'activité hémolytique et la toxicité envers les insectes n'ont pas été associées à ces protéines PSs **(Katayama *et al.*, 2005)**.

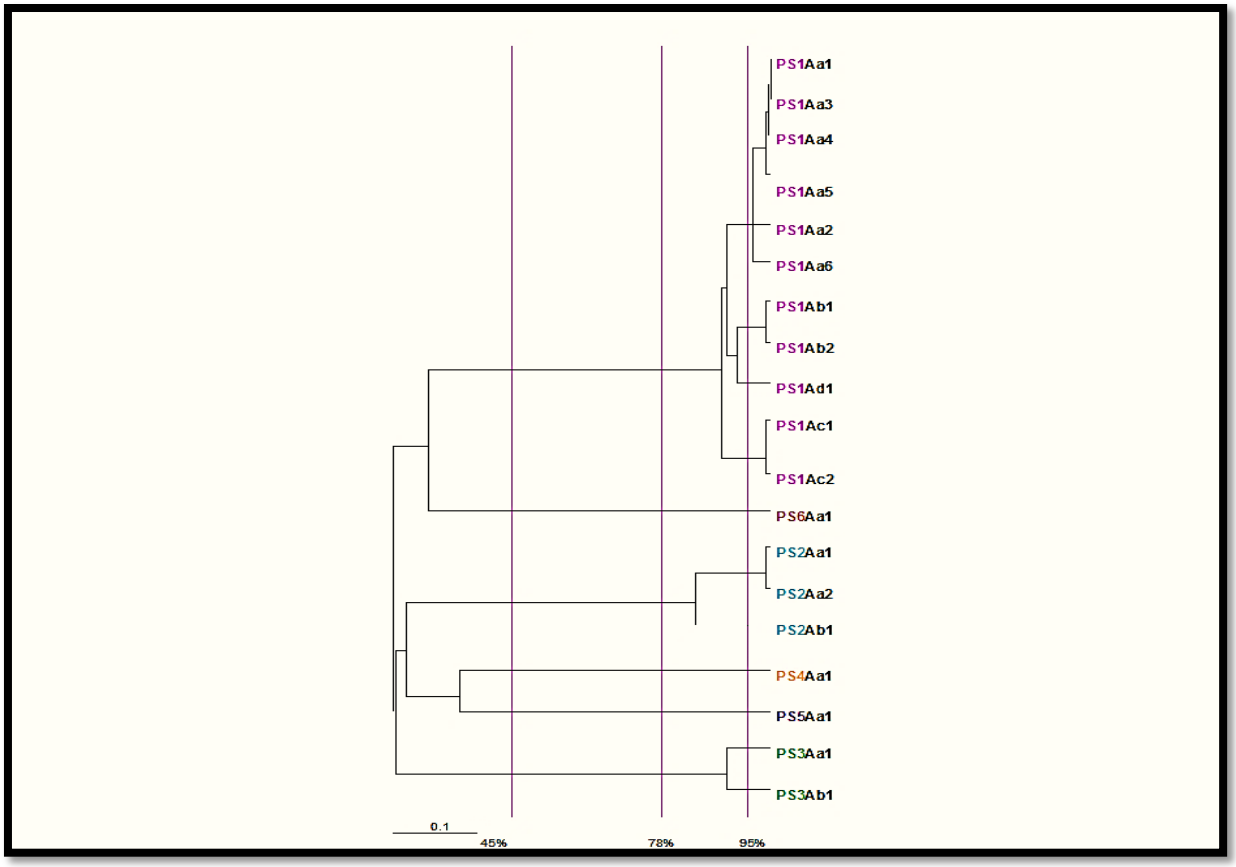


Figure 17: Dendrogramme illustrant la relation entre les différents parasporines existantes descendants de six familles, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 et PS6 **(http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/d120703.pdf).**

Les parasporines classées en six groupes (PS1-PS6) peuvent être classées en deux types en fonction de leur structure :

3.2.1. Parasporines appartenant à la famille des (3D-Cry) toxines (PS1, PS3 et PS6)

Trois parasporines différentes appartiennent au groupe des toxines Cry à 3 domaines (3D-Cry) :

La PS1 (Cry31A), PS3 (Cry41A) et la PS6 (Cry63A).

3.2.1.1. La parasporine1

Plusieurs études ont montrés l'effet anti-cancer de la PS1 **(Mizuki *et al.*, 2000)**. Il s'agit de la première parasporine découverte. Le mécanisme d'action de la PS1 produite par *Bt* A1190 (souche communément connue par **84-HS-1-11**) a été bien élucidé dans l'étude menée par **(Katayama *et al.*, 2005).** Une fois clonée **(Roh *et al.*, 1996)**; ils ont trouvés que la

parasporine1 (Cry31Aa1) était en fait un polypeptide de 723 de résidus d'acides aminés, encodée par un gène de 2 169 pb de long, dont le poids moléculaire est de 81 045 Da (Pro-PS1) (Figure 18).

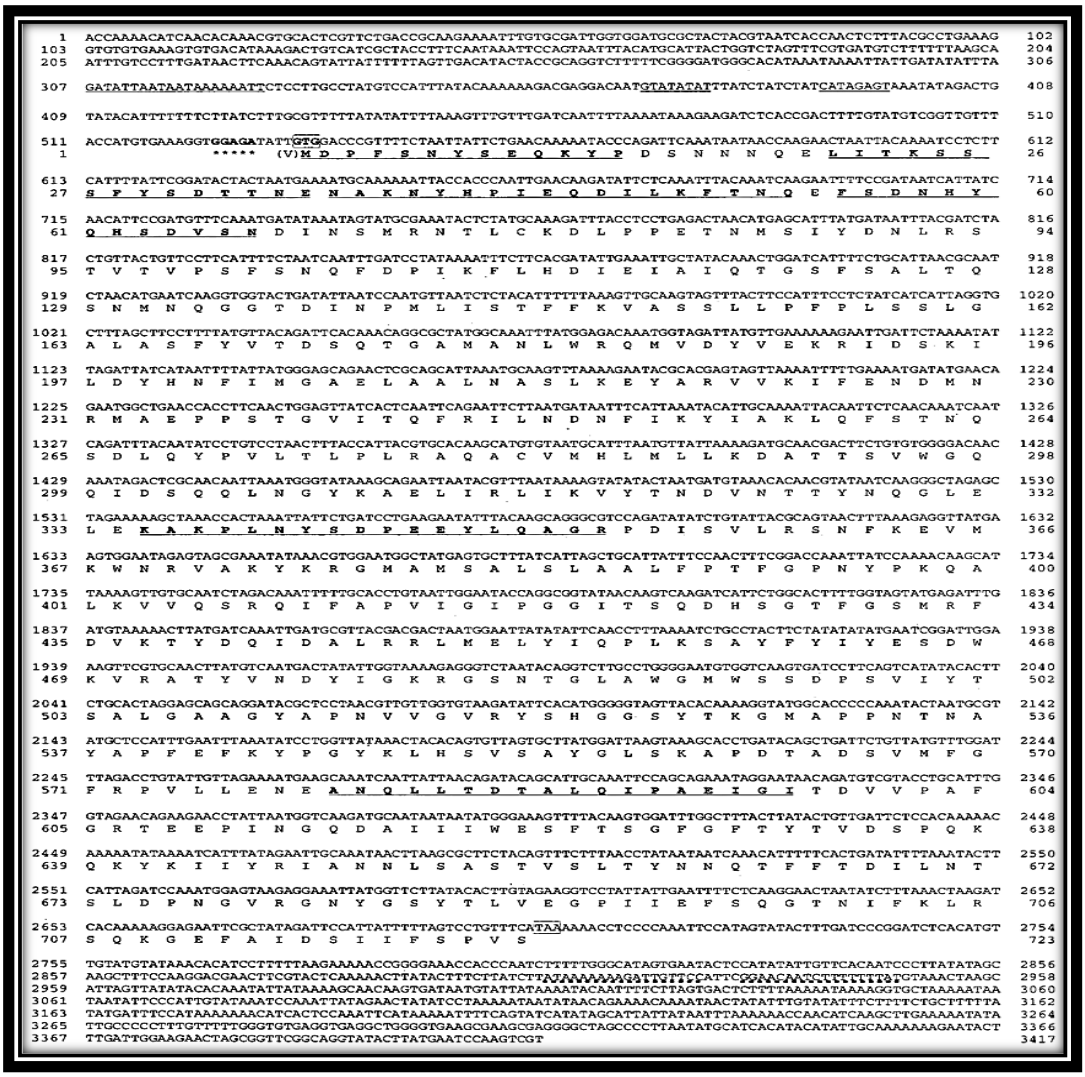


Figure 18: Séquence nucléotidique du gène de la parasporine 1(Cry31Aa1), et la séquence d'acides aminés déduite. La région du promoteur présumé est doublement soulignée. Le site de liaison aux ribosomes est marqué en astérisques. Les codons de départ et d'arrêt sont encadrés. Une séquence terminale est soulignée par une ligne pointillée. Une séquence N-terminale et cinq séquences d'acides aminés internes d'une protéine de type sauvage de 81 kDa, sont soulignées. Les chiffres sur les côtés sont les nombres de nucléotides (en haut) et d'acides aminés (en bas) **(Mizuki *et al*., 2000; Akiba *et al*., 2016)**.

La parasporine1 présentait une activité cytotoxique que lorsqu'elle est dégradée par les protéases en petites molécules de 40 à 60 kDa. La trypsine et la protéinase K activaient la parasporine1, tandis que la chymotrypsine ne l'avait pas fait **(Mizuki *et al*., 2000)**.

Sous activation, la PS1 est composée de deux sous-unités de 15 kDa et 56 kDa et ce par clivage par la trypsine de la pro-parasporine de 81 kDa. Ces deux fragments sont étroitement associés l'un à l'autre en tant que complexe actifqui ne pourrait pas être séparé même en présence de détergent ou d'agent dénaturant. Selon l'analyse structurelle, les fragments de 15 et 56 kDa pourraient être disposés en un hétéro dimère dans un rapport de 1:1**(Katayama *et al.*, 2005).**

La PS1Aa1 présente une forte spécifique cytotoxicité envers les cellules Héla, MOLT-4 (cellule T leucémique), HL60 (cellule promyélocytaire), avec des concentrations létales médianes (CL_{50}) de 0.12, 2.2 et 0.32 µg/mL respectivement. Alors qu'aucune toxicité n'a été détectée envers les cellules normales, y compris les cellules musculaires lisses de l'utérus, les hépatocytes, et les cellules T du sang périphérique humain **(Katayama *et al.*, 2005).**
Les études des réponses des cellules sensibles à la PS1Aa1 suggèrent qu'il est difficile d'appliquer un modèle de formation de pores communément proposé pour les toxines Cry à trois domaines à cette toxine. La toxine n'induit ni dépolarisation ; ni augmentation de la perméabilité membranaire qui doivent toutes deux accompagner la formation des pores. Au lieu de cela, il y'a une augmentation de l'afflux de Ca^{2+} qui induit une élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} des cellules sensibles, activant probablement la voie de signalisation apoptotique (**Katayama *et al.*, 2007).**

Des expériences de réticulation photoréactive ont permis d'identifier un suppresseur de tumeur, la Beclin-1, qui a été proposé pour coordonner à la fois l'autophagie et l'apoptose, en tant que récepteur pour PS1Aa1, et l'interférence observée des anticorps anti-beclin-1 a confirmé une interaction entre les deux protéines **(Katayama *et al.*, 2009)**.

Chez les mammifères, la Beclin-1 existe dans les lignées cellulaires de carcinome épithélial du sein humain avec une expression limitée, mais elle est abondante dans l'épithélium mammaire normal **(Liang *et al.*,1 999; Xu *et al.*, 2014).** Elle joue un rôle clé dans les processus d'autophagie et est cruciale dans plusieurs voies chez toutes les espèces eucaryotes **(Wirawan *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014).**

La séquence de la parasporine 1 contient 5 blocs conservés que l'on trouve couramment dans les protéines Cry de *B. thuringiensis* (Figure 19); cependant, seules une très faible homologie (<25%) entre la parasporine et les classes existantes de protéines Cry et Cyt étaient détectée.

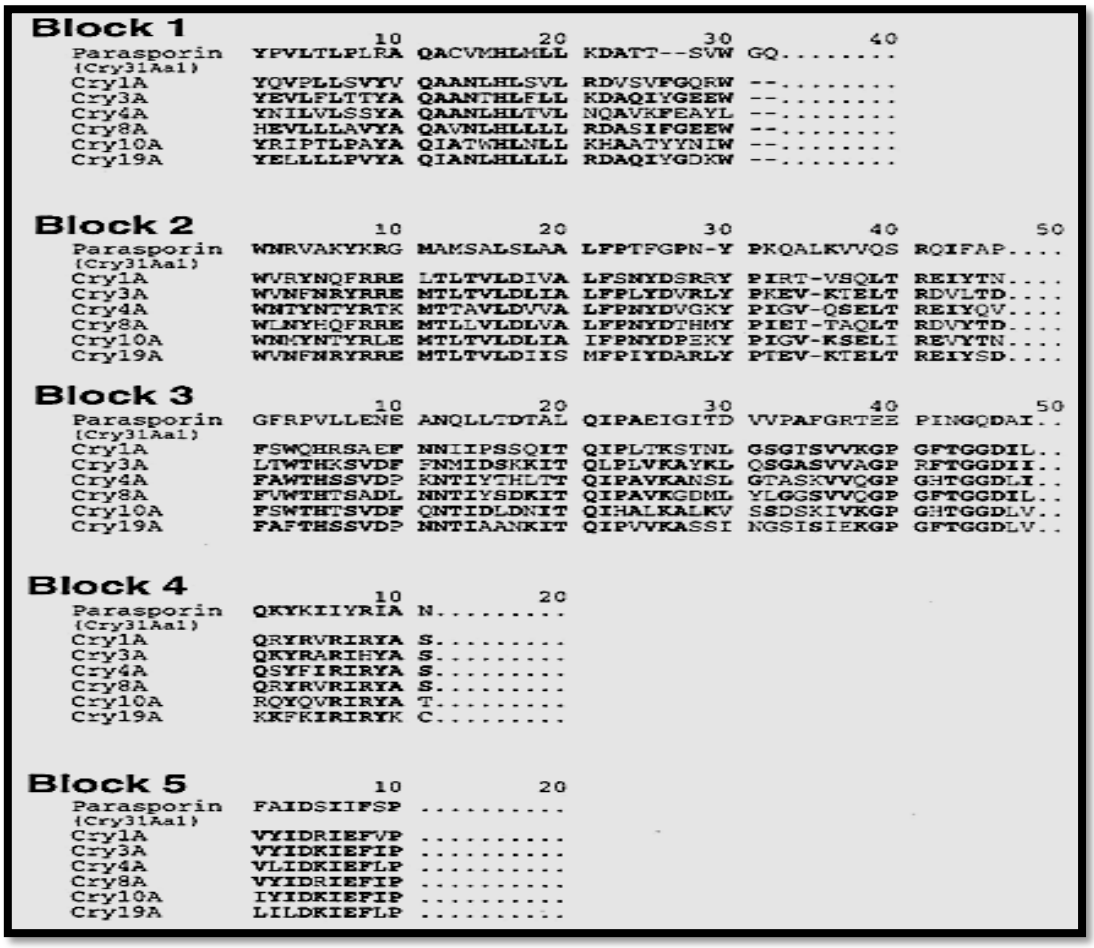


Figure 19: Comparaison des séquences d'acides aminés déduites des régions actives de la parasporine (Cry31Aa1) avec celles des blocs conservés dans les protéines Cry de la δ-endotoxine de *B. thuringiensis*. Les résidus hautement conservés sont en gras **(Mizuki *et al.*, 2000).**

La structure cristalline de la forme activée de PS1Aa1 a été déterminée à 1,76 Å de résolution **(Akiba *et al.*, 2005).** Elle confirme que la toxine a effectivement la structure cristalline typique de structure à trois domaines établie pour les toxines Cry à trois domaines, bien qu'elle soit séparée en deux polypeptides. Chacun des trois domaines a un pli de chaîne caractéristique : *le domaine 1* est un faisceau de sept hélices, *le domaine 2* est un prisme, et le *domaine 3* est en sandwich de type lectine. Le site de clivage séparant les polypeptides 15kDa et 56kDa sont situés dans la courte boucle exposée qui relie les troisième et quatrième hélices du faisceau à sept hélices du *domaine 1* ; il est visualisé comme une toute petite entaille dans la densité électronique continue de la chaîne principale (Figure 20). Le clivage ne semble

guère affecter le cheminement des polypeptides ou l'intégrité de la toxine. Il est particulièrement intéressant de noter qu'il existe un segment N-terminal supplémentaire précédant le noyau. La présence d'une telle extension sous la forme active est inhabituelle car un segment comparable n'est observé que dans la forme inactive de la protoxine de Cry2Aa et non dans les structures des toxines Cry sous forme active (Cry1A par exemple). Le segment N-terminal s'étend le long de la frontière entre les *domaines 2 et 3* et forme un virage serré sous la forme d'une série de β-helices étroitement liés du côté extérieur du faisceau d'hélices du noyau par interaction hydrophobe ; ainsi, le segment N-terminal contraint les trois domaines, ce qui suggère que la grande transformation structurelle ou le réarrangement des domaines postulé dans le modèle classique de formation des pores est peu probable. Ainsi, on suggère que la PS1Aa1 fonctionne très probablement comme un agent d'activation de la voie de signalisation apoptotique **(Vachon *et al.*, 2012; Akiba *et al.*, 2016)**.

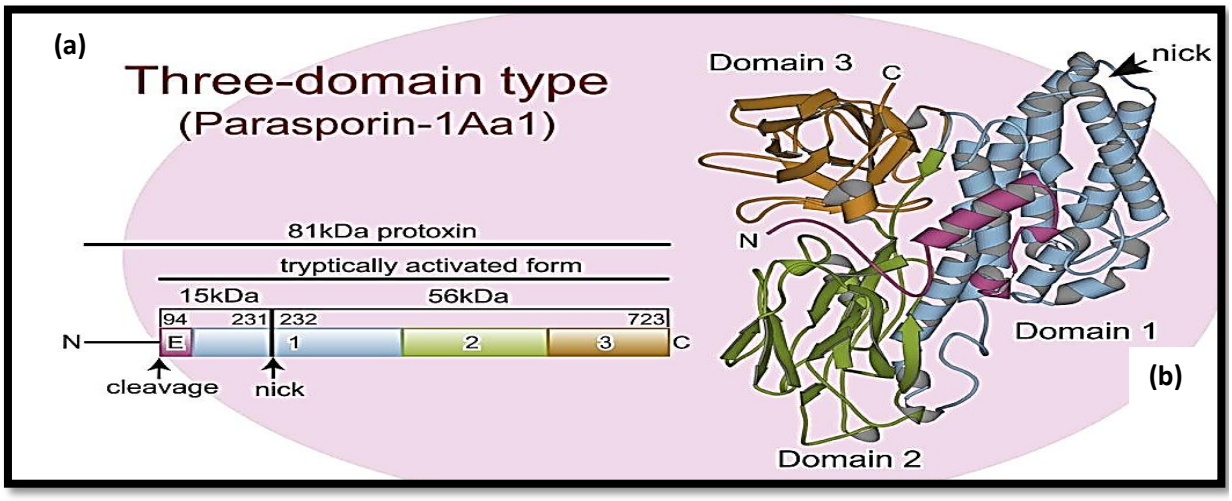


Figure 20: Structure cristalline de la forme activée de PS1Aa1. **(a)** Schéma du processus d'activation de la protéine (Trypsination). **(b)** Vue orthogonale du ruban représentant la structure cristalline. Les domaines 1, 2 et 3 sont représentés en bleu clair, vert et orange respectivement. Les extensions N-terminales de PS1Aa1 sont indiquées en violet **(Akiba *et al.*, 2016).**

3.2.1.2. La parasporine 3

La parasporine 3 (PS3Aa1et PS3Ab1), correspondant à Cry41Aa1 issue de la souche A1462 (anciennement **89-T-26-17**) de *B. thuringiensis*, a une structure typique à trois domaines avec séquences en cinq blocs communément conservées, activée par digestion N- et C-terminale de la protéine Cry **(Ohba *et al.*, 2009)** (Figure 21).

C'est un polypeptide de 825 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 88 kDa, partageant de faibles homologies avec des protéines Cry insecticides. Il est intéressant de noter que la séquence C-terminale de la PS3Aa1est similaire à celle de l'hémagglutinine de *Clostridium botulinum* HA-33 **(Tsuzuki *et al.*, 1990; Ohba *et al.*, 2009).** Une digestion protéolytique est nécessaire pour l'activation de la PS3Aa1; le précurseur de 88-kDa est converti en fraction toxique de 64 kDa par transformation des régions N et C-terminales **(Ohba *et al.*, 1986)**.

En revanche, la parasporine PS3 (Cry41A), n'active pas la voie d'apoptose **(Krishnan *et al.*, 2017)**. Il a été proposé que cette toxine fonctionne comme toxine formant de pores dans la membrane, entraînant une diminution de l'ATP, gonflement des cellules et des dommages membranaires **(Krishnan *et al.*, 2017)**. La toxine PS3 a montré un effet cytotoxique envers la cellule HL-60 (cellule T leucémique) et la lignée cellulaire HepG2 (cancer des hépatocytes humains), avec des concentrations efficaces médianes (EC_{50}) de 1320 ng/ml et 2800 ng/ml, respectivement, cependant elle n'était pas toxique envers la lignée cellulaire Héla (Tableau1) **(Okassov *et al.*, 2015)**.

L'analyse des séquences primaires a révélé que cette protéine est codifiée par un opéron composé de trois gènes, dont le premier ORF1 a une fonction inconnue, le second ORF2 codifie pour le fragment toxique Cry41Aa montrant les trois domaines typiques de la famille des 3D-Cry et un domaine supplémentaire à l'extrémité C-terminale qui présente des similitudes avec le domaine de type ricine **(Yamashita *et al.*, 2005; Krishnan *et al.*, 2017)**. Le domaine de la ricine a été trouvé dans d'autres toxines telles que Cyt1Ca, Cyt1Da et Cry42Aa et est impliqué dans la reconnaissance des surfaces cellulaires en raison de sa capacité de liaison aux glucides **(Krishnan *et al.*, 2017)**.

Cependant, lors de la suppression de ce domaine de la ricine, il a été démontré que ce dernier n'est pas nécessaire pour avoir un effet cytotoxique envers les cellules HepG2.

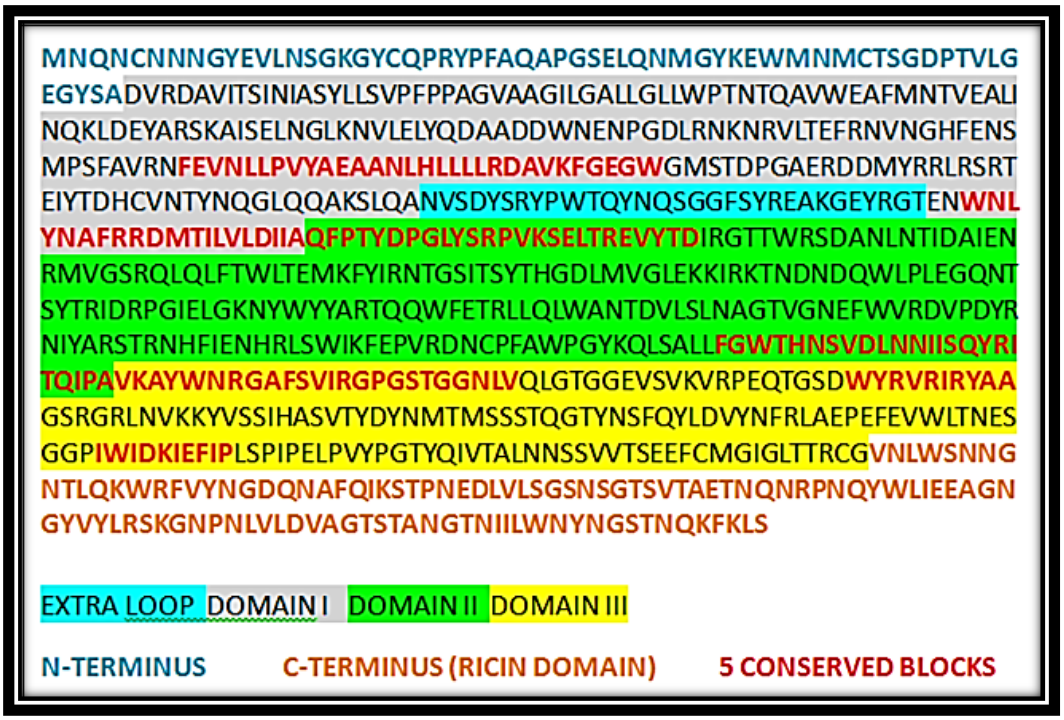


Figure 21: Séquence d'acides aminés déduite de la protoxine PS-3 codée par ORF2. Les domaines putatifs marqués par des cases colorées ont été identifiés sur la base de la comparaison de la séquence avec les trois autres domaines des toxines Cry **(Elhigazi *et al.*, 2019)**. Les blocs conservés écrits en rouge sont basés sur la comparaison des séquences de **Yamashita *et al.*,** (**2005**). Les régions N- et C-terminales de la protoxine, incorporant un domaine de type ricine et très probablement clivées par la protéinase K, sont placées à l'extérieur des cases colorées. La région de boucle supplémentaire dans une boîte bleue représente une région que l'on ne trouve pas dans les trois autres domaines des toxines Cry **(Domanska, 2016).**

Enfin, le troisième ORF3 a beaucoup de similitudes avec la région C-terminale des protoxines Cry et il est nécessaire pour la bonne expression de Cry41Aa, car en son absence la protéine Cry41Aa n'est pas soluble et pourrait ne pas être activée **(Krishnan *et al.*, 2017)**. Des mutations dans la boucle 3 du domaine II de la PS3 (Figure 22) ont affectées l'activité cytotoxique envers les cellules HepG2, ce qui suggère que des régions impliquées dans la reconnaissance des récepteurs des 3D-toxines Cry insecticides sont également impliqués dans la reconnaissance des récepteurs de la protéine PS3 dans les cellules cancéreuses. Il est important de mentionner qu'il a été constaté que la Cry41Aa a une activité insecticide puisqu'elle a été capable de tuer le puceron *Myzus persicae* avec un CL_{50} de 32,7 µg/ml **(Palma *et al.*, 2014)** indiquant que certaines parasporines peuvent également avoir une activité insecticide.

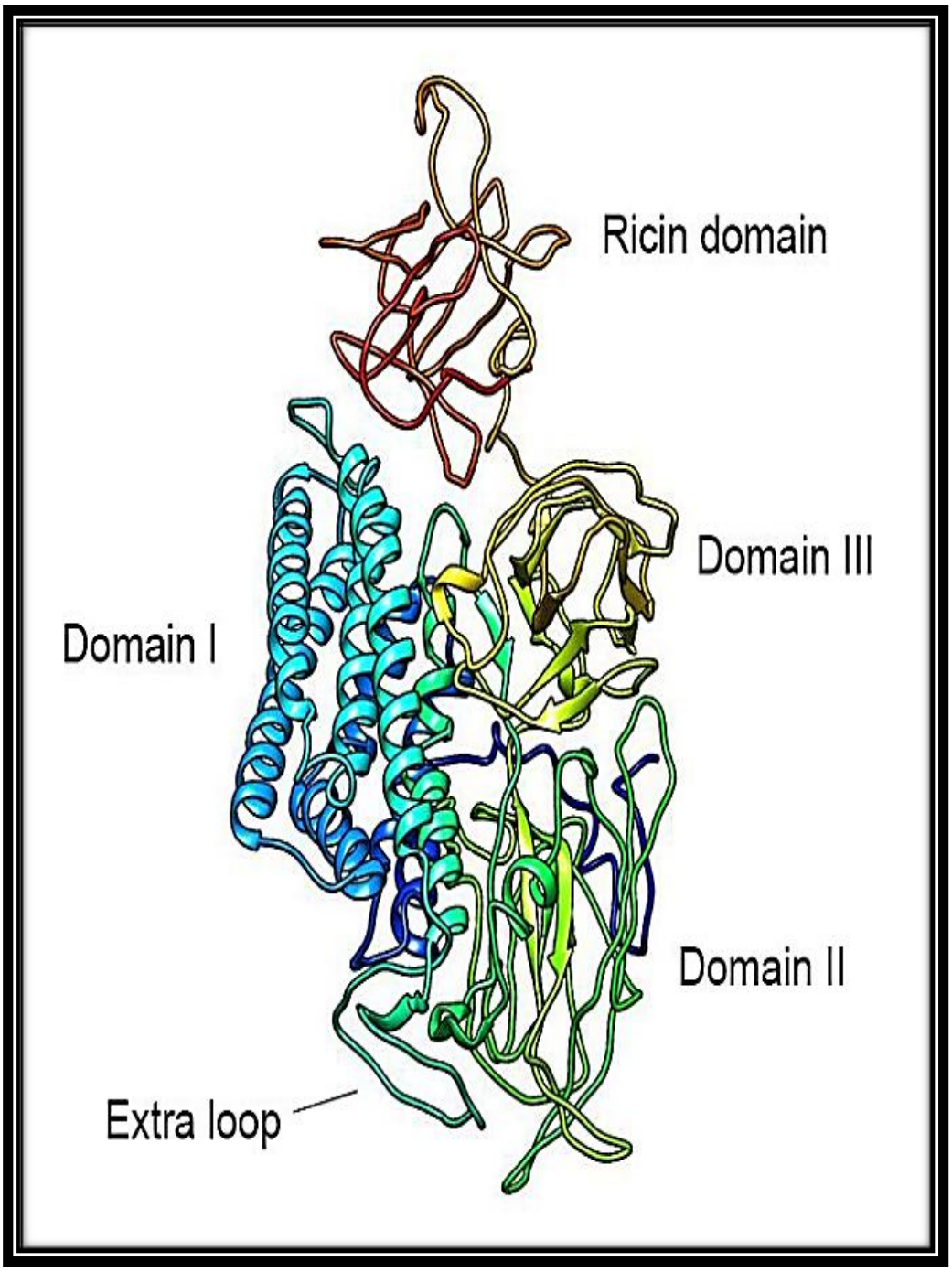


Figure 22: Modèle structurel de la protoxine PS-3 montrant l'organisation de la toxine Cry à trois domaines. Sur la base de 13 modèles, 792 résidus de la protoxine PS-3 (96 %) ont été modélisés avec une précision supérieure à 90 % par Phyre2. Le **domaine I** est représenté par le faisceau en hélice bleu, le **domaine II** par les feuilles vert clair β-sheets et le domaine III par le β-sandwich jaune. Le domaine C-terminal de la ricine est représenté en rouge et la boucle supplémentaire non structurée du domaine I est présentée en bleu clair **(Domanska, 2016).**

Tableau1 : Cytotoxicité des protéines Cry41Aa et Cry41Ab purifiées, activées par la protéinase K, testées sur différentes lignées cellulaires à l'aide du test de viabilité cellulaire MTT; 24 heures après le traitement par la toxine **(Yamashita *et al.*, 2005)**.

Cell		Origin	EC_{50} (µg/ml)	
			Cry41Ab	Cry41Aa
Human				
	MOLT-4	Leukemic T cell	>10	>10
	Jurkat	Leukemic T cell	>10	>10
	HL60	Myeloid leukemia	1.32	1.25
	HeLa	Uterus cervix cancer	>10	>10
	TCS	Uterus cervix cancer	>10	>10
	Sawano	Uterus cancer	>10	>10
	HepG2	Hepatocyte cancer	2.80	1.86
	A549	Lung cancer	>10	>10
	CACO-2	Colon cancer	>10	>10
	T cell	Normal T cell	>10	>10
	UtSMC	Normal uterus	>10	>10
	HC	Normal hepatocyte	>10	>10
	MRC-5	Normal lung	>10	>10
Simian				
	Vero	African green monkey kidney	>10	>10
	COS-7*	African green monkey kidney	>10	>10
Murine				
	NIH3T3-3	Mouse embryo	>10	>10

3.2.1.3. La parasporine 6

La parasporine 6 (Cry63Aa) a été isolée des souches M109 et CP84 de *B. thuringiensis* **(Nagamatsu *et al.*, 2010; Okassov *et al.*, 2015)** avec une protoxine de 84 kDa qu'une fois activée par protéolyse produit deux peptides de 14 et 59 kDa. L'analyse des séquences suggère qu'il s'agit d'une souche à toxine à trois domaines. La toxine protéolytiquement active était cytotoxique contre les cellules du cancer hépatocellulaire humain (HepG2) et les cellules du cancer du col de l'utérus (Héla) montrant des valeurs de EC_{50} de 2300 ng/ml et 7200 ng/ml respectivement **(Nagamatsu *et al.*, 2010; Soberón *et al.*, 2018)**. Ces valeurs sont inférieures à celles des valeurs de toxicité de la parasporine 1 et de la parasporine 2 envers les mêmes lignées cellulaires **(Nagamatsu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014)**. Le traitement par cette toxine s'est manifesté par un gonflement des cellules et la formation de vacuoles dans le cytoplasme des cellules sensibles. Peu de travaux ont été signalés sur cette toxine Cry de mammifère. Cependant le mécanisme d'action de la PS6 (Cry63A) n'a pas encore été bien décrit.

3.2.2.Parasporines appartenant à la famille Mtx-likeCry toxines (PS2, PS4 et PS5)

3.2.2.1. La parasporine 2

La parasporine2 a été découverte pour la première fois chez le *B. thuringiensis* A1547 (anciennement **94-F-45-14**), qui appartient à *B. thuringiensis serovar dakota* (H15) **(Ito *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014).** La protéine PS2Aa1 (Cry46Aa1) est un polypeptide de 338 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 37 446 Da, avec un gène codant de 1 017 pb de long (Figure 23), elle présente une similarité limitée avec la plupart des protéines Cry ou Cyt établies.

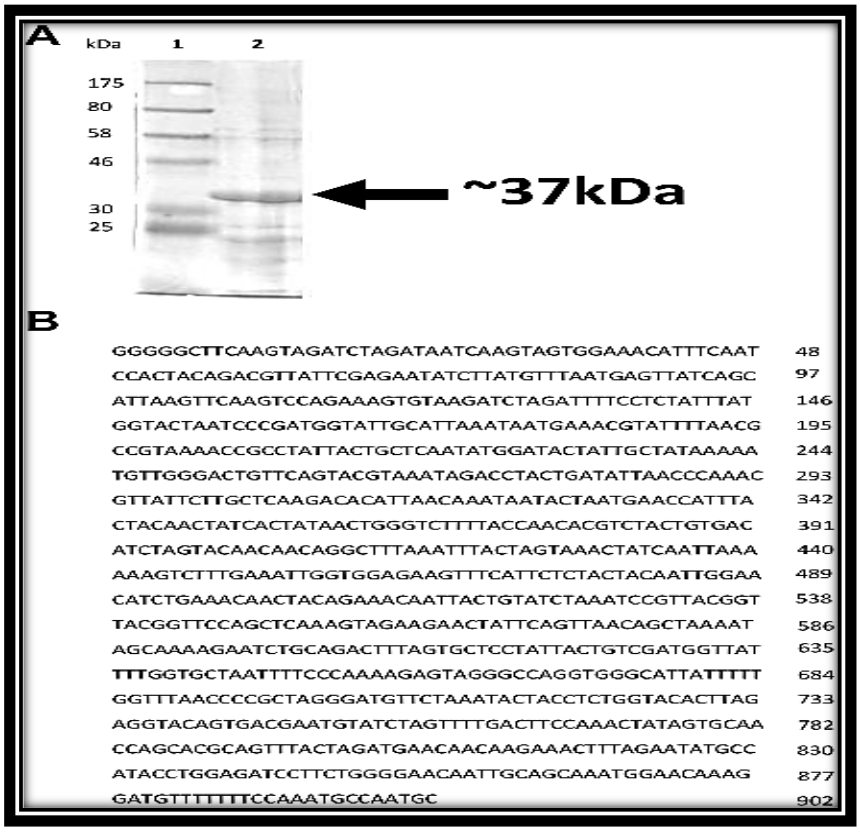


Figure 23: Analyse SDS-PAGE de la protéine cristalline de 37kDa de *Bacillus thuringiensis* 4R2 après coloration au bleu de Coomassie. (A) **Colonne 1** : marqueur de poids moléculaire; **Colonne 2** : pro-PS2Aa1 solubilisée. (B) Séquence de nucléotides du fragment du gène *cry*46Aa1 obtenu après amplification avec la paire d'amorces Bt4R2-2F et Bt4R2-1R **(Brasseur *et al.*, 2015).**

La protéinase K clive la pro-PS2Aa1 en une forme active de 30 kDa après protéolyse aux niveaux N- et C terminaux **(Mizuki *et al.*, 1999; Kitada *et al.*, 2006).**

Contrairement à la PS1Aa1, la PS2Aa1 n'est pas une protéine à trois domaines, ne possède pas de blocs de séquences de protéines Cry insecticides conservés. Cette protéine ne partage une homologie de séquence qu'avec la Cry15Aa (23,5 %) parmi les classes existantes de Cry et Cyt protéines de *B. thuringiensis* **(Ito *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 1992).**

La forme activée est très toxique envers les cellules de carcinome hépatocellulaire (HepG2), les cellules du cancer du côlon (CACO-2) et les cellules T leucémiques humaines telles que les cellules MOLT-4, Jurkat et HL-60; la dose létale médiane (DL_{50}) de ces cellules est d'environ 20 ng/ml. Une activité cytocide remarquable a été prouvée envers la lignée cellulaire de cancer de l'utérus Sawano, avec une EC_{50} de 1,7 ng/ml **(Okassov *et al.*, 2015).** Une toxine assez similaire, nommée PS2Ab (Cry46Ab) a montré une augmentation importante de la toxicité par rapport à la toxine PS2Aa, puisque des valeurs létales de 0,56 et 0,74 ng/ml ont été rapportées envers les cellules MOLT-4 et Jurkat, respectivement **(Hayakawa *et al.*, 2007)**. Elle est beaucoup moins toxique (DL_{50}> 1µg/mL) pour les hépatocytes normaux et le cancer du col de l'utérus Héla. L'exposition à la toxine provoque des changements morphologiques frappants dans les cellules sensibles, y compris le gonflement, saignement et la lyse ainsi que le désassemblage des microtubules, enchevêtrement de filaments d'actine, et fragmentation des mitochondries et des réticules; ces changements s'accompagnent d'une localisation de la protéine dans le plasma et une augmentation rapide de la perméabilité de la membrane. D'autres études ont démontrés que les molécules de PS2Aa1 s'accumulent et forment d'énormes oligomères dans les bicouches lipidiques de la membrane plasmique **(Abe *et al.*, 2008; Kitada *et al.*, 2009; Shimada & Kitada, 2010)**. Les protéines ancrées dans le glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) sont nécessaires à la cytolyse, tandis que le cholestérol membranaire affecte légèrement l'efficacité de l'action d'oligomérisation.

Une structure cristalline de la forme active de PS2Aa1 a été déterminée à 2,38 Å **(Akiba *et al.*, 2009)**. Il présente une forme inhabituellement allongée exclusivement dominée par des brins β tout au long de l'axe de la molécule. Étonnamment similaires aux structures cristallines des PFT de type aérolysine, qui comprennent aussi la epsilon-toxine *de Clostridium perfringens* **(Nagahama *et al.*, 2006)**, la lectine hémolytique de *Laetiporus sulphureus* **(Mancheño et *al.*, 2005)**, et l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila* **(Moniatte *et al.*, 1996)**. Chacune de ces molécules peut être divisée en trois domaines le long de son axe longitudinal.

Le domaine 1 présente une grande diversité structurelle et est riche en résidus aromatiques; il

est probablement responsable de la fixation des récepteurs. En revanche, **les domaines 2 et 3** sont tous deux des β-sandwiches aux plis remarquablement conservés. L'épingle à cheveux (β-hairpin) amphipathique proéminente dans le domaine 2 est caractéristique de ce groupe de toxines et est censé être inséré dans la membrane lors de la formation des pores **(Briggs *et al.*, 2011)**. En plus de ces similitudes structurelles, les caractéristiques de l'action cytolytique de PS2Aa1, décrites précédemment, ressemblent à celles rapportées pour les PFT de type aérosol.

Par conséquent, PS2Aa1 agit probablement sur les cellules sensibles par un mécanisme proposé pour ce type de β-PFT : les molécules de toxines se lient à des récepteurs spécifiques (probablement certains GPI) dans les couches lipidiques et s'y accumulent pour former des oligomères, qui insèrent ensuite leurs épingles à cheveux (β-hairpin) pour pénétrer la membrane et former des pores (Figure 24).

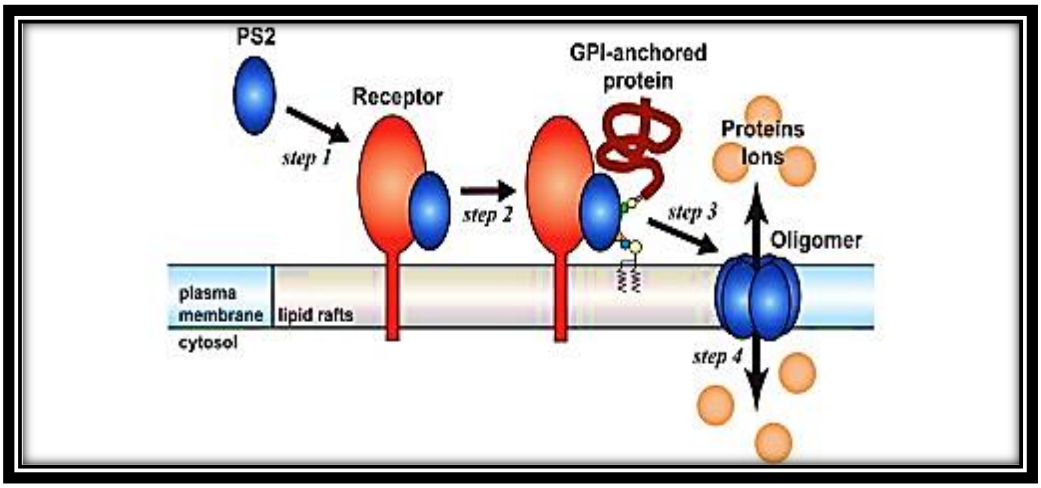


Figure 24: Mécanisme d'action de la PS2 (**Abe *et al*, 2017**).

La PS2Aa1 est activée par l'élimination des résidus 51 et 32 de ses N et C terminaux, respectivement, par la protéinase K **(Kitada *et al.*, 2006)** (Figure 25). L'élimination du segment N-terminal est une condition préalable à la cytotoxicité, et l'élimination supplémentaire du segment C-terminal accélère l'action cytocide. Cela est en contraste avec les cas des aérosolysines et des toxines- epsilon, où seul le segment C-terminal est responsable de l'inhibition de la toxicité. **(Akiba *et al.*, 2009)**.

En outre, il a également été signalé que la réponse à la mort cellulaire induite par la toxine

PS2 implique l'activation de l'apoptose. Après exposition aux toxines, différentes lignées de cellules cancéreuses ont montré une activation des caspases 3 et 9 responsables de l'activation de l'apoptose. Il a été aussi constaté que certaines effecteurs de survie telles que l'AKT, le XIAP et le suppresseur de tumeur PAR4 étaient inhibées après l'administration de la toxine PS2, et que l'inhibition de la voie Pi3K/AKT avec la valmanine a induit un effet synergique à la réponse de la mort activée par la PS2 depuis qu'une activation accrue de la caspase 3 a été observée, ce qui a entraîné une multiplication par trois de l' apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate PC-3 **(Brasseur *et al.*, 2015)**. L'hypothèse est que PS2 forme des pores dans la membrane plasmique ce qui permettent le transport des ions qui induirait l'apoptose comme cela a été prouvé aussi pour d'autres toxines formant des pores comme la α-toxin de *Staphylococcus aureus* **(Jonas *et al.*, 1994)**.

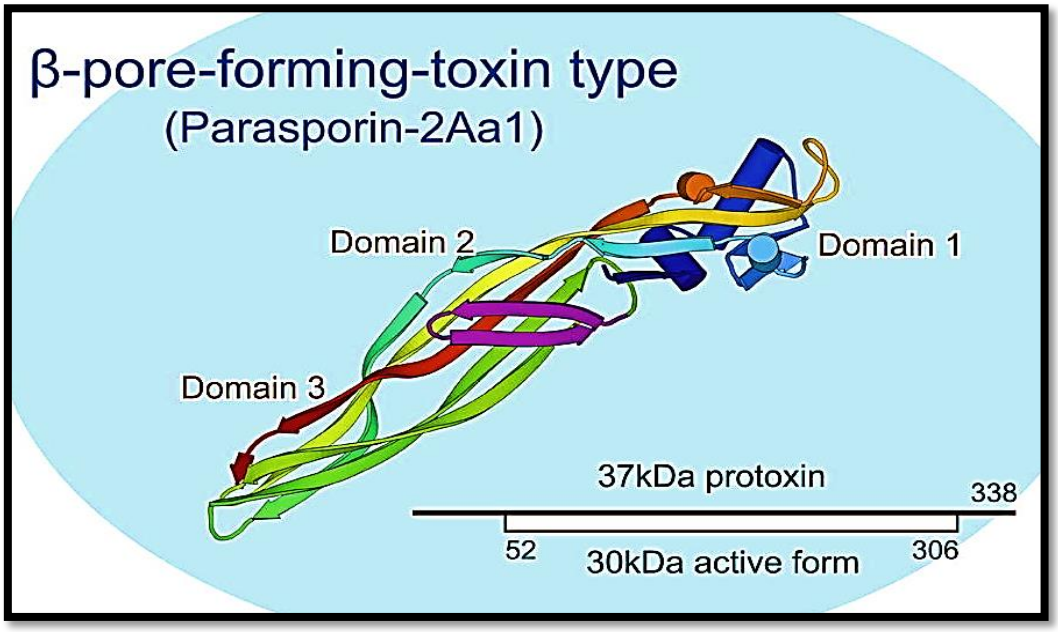


Figure 25: Structure cristalline de la forme activée de PS2Aa1. (a) Schéma du processus d'activation de la protéine **(Akiba *et al.*, 2016).**

3.2.2.2. La parasporine 4

La PS4 (Cry45Aa1) de *B. thuringiensis* (**89-T-34-22)** communément appelée A1470 est une protoxine de 31 kDa qui est clivée par des protéases dans la région C terminale, ce qui donne une toxine activée de 27 kDa. Elle est constituée de 275 résidus d'acides aminés, avec un poids moléculaire de 30 078 Da. Le gène codant pour cette protéine est constituée de 828 pb

de long. Aucune séquence des cinq blocs communément conservées dans la plupart des protéines Cry (y compris PS1Aa1 et PS3Aa1), n'est conservée chez PS4Aa1 **(Ohba *et al.*, 2009; Okassov *et al.*, 2015).**

La parasporine-4 (PS4) n'est pas une toxine Cry protéine à trois domaines (3D-Cry) activée par la digestion C-terminale **(Saitoh *et al.*, 2006; Okassov *et al.*, 2015).**

Le modèle structurel de la PS4 a été construit, ce qui montre que cette toxine fait également partie des toxines aerolysin-type β-pore-forming (β-PFTs) **(Akiba & Okumura, 2016**).

Cette toxine est active contre les lignées cellulaires cancéreuses du côlon et de l'utérus (cellules Caco-2 et Sawano) avec des valeurs EC_{50} de 124 et 240 ng/ml, respectivement **(Okassov *et al.*, 2015)**.

Il a également été démontré que les cellules T leucémiques humaines (MOLT4) étaient 100 fois plus sensibles que les cellules Héla et les cellules T normales aux protéines de (**89-T34-22)**. La cytotoxicité était dose-dépendante et la EC_{50} pour le MOLT4 était de 3,5 µg/ml **(Lee *et al.*, 2000).**

Cette toxine a provoqué des saignements, des rétrécissements nucléaires et un ballonnement des cellules. Il semblerait qu'elle formerait des pores dans la membrane plasmique des cellules sensibles puisqu'elle induit une fuite dela lactate déshydrogénase et l'afflux de la Fluoresceine isothiocyanate(FITC)-dextrans extracellulaires.

La PS4 se lie à la membrane et forme des oligomères de poids moléculaire (90-200 kDa), mais le récepteur spécifique n'a pas encore été identifié **(Okumura *et al.*, 2011)**. Son activité est cholestérol indépendante puisque la réduction du cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine n'a pas affecté la cytotoxicité de la PS4 envers les cellules Caco-2 **(Okumura *et al.*, 2011)**. L'analyse des caspase 3 et caspase 7 a indiqué une cytotoxicité de la PS4 envers les cellules Caco-2 **(Okumura *et al.*, 2011)**; alors que ces deux dernières n'étant pas activées ce qui suggère que l'apoptose n'est pas impliqué dans le mécanisme d'action de la PS4 **(Soberón *et al.*, 2018).**

En 2010**,** Krishnan et *al.*, ont menés une enquête très intéressante en utilisant un isolat malaisien de *B. thuringiensis*, appelé *Bt 18*. Il produit une protéine parasporale qui présente une activité cytotoxique préférentielle pour les cellules T leucémiques humaines (CEM-SS) mais qui n'est pas cytotoxique envers les lymphocytes T normaux ou d'autres cellules cancéreuses comme le cancer du col de l'utérus (Héla), le cancer du sein (MCF-7) et le cancer du côlon (HT29), ce qui suggère des propriétés similaires à celles de la parasporine. Dans cette étude, **(Krishnan *et al.*, 2010)** ont cherché à identifier la protéine de liaison de *Bt 18* aux

cellules T leucémiques humaines. Des tests de liaison ont été utilisés pour identifier la protéine de liaison de la protéine parasporale *Bt 18* sur les cellules CEM-SS, il a été révélé que la protéine de liaison était la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Ce résultat a été confirmé après pré-incubation de l'anticorps anti-GAPDH avec les cellules CEM-SS qui a provoqué une diminution de la liaison du *Bt 18* à la GAPDH des cellules sensibles. Sur la base des résultats d'une analyse qualitative de l'immunoblot et de l'immunofluorescence ; la GAPDH a été identifiée comme étant la protéine de liaison de la protéine parasporale *Bt 18* (PS4) sur la membrane plasmique des cellules CEM-SS.

3.2.2.3.La parasporine 5

La parasporine-5 (Cry64Aa) a été isolée de la souche A1100 de *B.thuringiensis* par Ekino et Shinen 2009 (**Ekino *et al.*, 2009**). Peu de travaux ont été rapportés pour cette parasporine. L'analyse des séquences révèle que la parasporine-5 (Cry64Aa) est une toxine Epsilon/Mtx **(Ekino *et al.*, 2014).**

La PS5 (Cry64A) est produite sous forme d'une protoxine de 33 kDa et est activée à l'extrémité C-terminale pour produire une toxine activée de 30 kDa. Elle a montré une cytotoxicité envers les cellules MOLT-4 avec une EC_{50} de 75 ng/ml. Elle a également montré une toxicité pour d'autres lignées cancéreuses telles que : les HepG2, les cellules cancéreuses d'utérus (TCS et Sawano) et des cellules cancéreuses et saines du rein de singe (Véro et COS7) dont la EC_{50} est autour de 50 ng/ml. Cette toxine est codifiée dans un opéron avec d'autres ORF qui présentent certaines similitudes avec une protéine de domaine de liaison à la chitine putative de *Bacillus cereus* **(Ekino *et al.*, 2014).** Récemment, deux nouveaux gènes Cry64 ont été clonés sous le nom Cry64Ba et Cry64Ca **(Ammons *et al.*, 2016)**. Le modèle structural de la Cry64Ba présentait de grandes similitudes structurelles avec les membres de la famille des aérolysines β-PFTs **(Liu *et al.*, 2018)**. Il a été démontré que ces deux protéines, ensemble, sont très efficaces contre les parasites hémiptères *Laodelphax striatellus* et *Sogatella furcifera* en se liant spécifiquement aux membranes de *L. striatellus* **(Liu *et al.*, 2018)**, ce qui suggère que la toxine PS5 peut également avoir une activité insecticide (Figure 26).

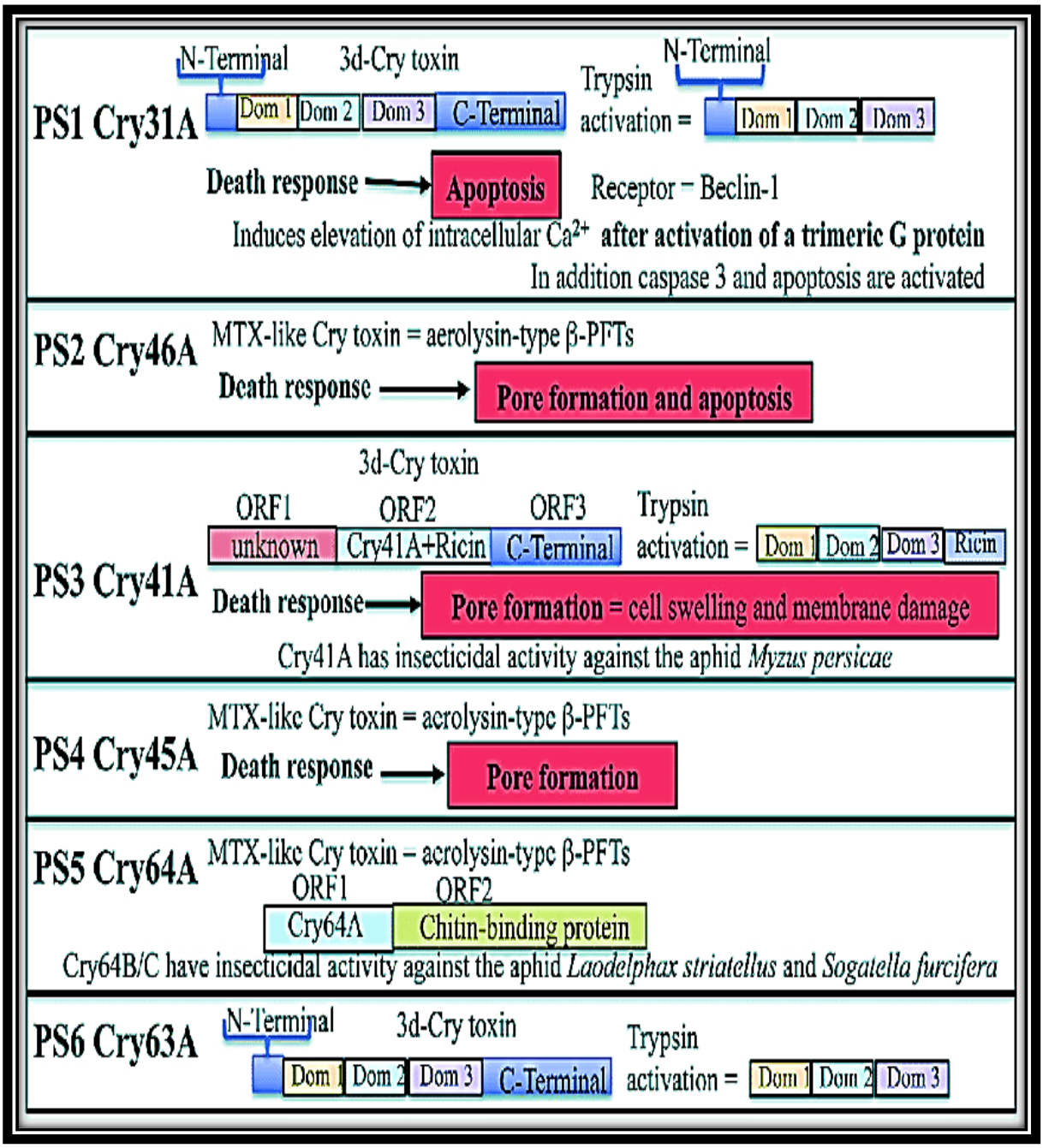


Figure 26: Caractéristiques des six différents groupes de Parasporines : PS1 (Cry31A), PS3 (Cry41A) et PS6 (Cry63A) appartenant aux ***toxines 3D-Cry***. PS2Aa1 (Cry46Aa1), PS4 (Cry45A) et PS5 (Cry64A) appartenant aux ***toxines Cry de type Mtx*** **(Soberón *et al.*, 2007)**.

4. Les rayonnements ionisants

Les effets biologiques des rayonnements ionisants ont été mis en évidence peu de temps après la découverte en 1895 des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen et celle de la radioactivité en 1896 par Antoine Henri Becquerel.

Avant la fin du 19^{ième} siècle, des cas de radiodermites ainsi que de cancers furent observés dans les rangs de la communauté scientifique. L'utilisation des rayonnements ionisants dans divers domaines connus un large essor qui devait conduire au développement de diverses sciences et à la naissance de la radiobiologie qui est la science qui étudie l'action des rayonnements ionisants sur les êtres vivants. Ce n'est pourtant que dans les années vingt que les risques liés aux radiations ionisantes ont été pris en compte et qu'un effort a été entrepris pour en limiter les conséquences grâce aux recommandations de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) qui fut fondée en 1928.

4.1. Introduction à la radiobiologie

Le but de la radiothérapie est d'utiliser des rayonnements ionisants pour induire la mort des cellules cancéreuses. Les rayonnements les plus utilisés dans la lutte contre le cancer sont les rayons X et γ. L'objectif de la radiobiologie est donc la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la sensibilité et la résistance aux radiations ionisantes des cellules tumorales afin d'optimiser les traitements et éventuellement de moduler l'action des radiations ionisantes. Les doses des rayonnements sont exprimées en grays (Gy) : 1 Gy = 1 joule absorbé dans une masse de 1 kg.

Les effets directs et indirects des rayonnements ionisants peuvent affecter toutes les molécules et tous les compartiments de la cellule. Si l'on considère particulièrement la molécule d'ADN, en raison de son importance biologique, les lésions radio-induites peuvent être de différentes natures :

- Ruptures de chaînes : cassures simple et double brin (CSB et CDB); ce sont des lésions prédominantes en importance ;
- Modifications chimiques des bases et des sucres ;
- Pontages intra ou inter-chaînes.

A titre d'exemple on peut avancer que pour une dose de 1 Gy délivrée à une cellule, on considère avoir induit :

■ 1 000 à 2 000 lésions de bases;

■ Environ 200 pontages;

■ 500 à 1 000 lésions simple brin;

■ Environ 40 lésions double brin **(Luce, 2008).**

4.2. La mort cellulaire sous irradiation

Classiquement, les cellules soumises à une dose suffisante de radiations ionisantes ne mourraient que si ces cellules rentraient en mitose (les cellules sont plus radiosensibles en phases G2 et M de leur cycle). Cette mort, dite post-mitotique ou reproductive, peut survenir, en principe sous forme d'une nécrose, après plusieurs divisions cellulaires postérieures à l'irradiation (mort cellulaire différée). Pour une cellule clonogénique (une seule cellule de ce type peut donner naissance à un clone, puis à une tumeur.), elle est définie par la perte de sa capacité à générer une descendance supérieure à 50 cellules. Cette perte de clonogénicité équivalente à une mort fonctionnelle de la cellule parait expliquer les différences de survie après irradiation pour un grand nombre de lignées cellulaires humaines, normales ou tumorales. Les facteurs les mieux corrèles à ce type de létalité cellulaire sont le taux de cassures double brin de l'ADN résiduelles, non ou mal réparées, et le taux d'aberrations chromosomiques radio- induites.

Quatre types principaux de mort cellulaire en réponse aux radiations ionisantes ont été décrits : la nécrose, la sénescence, l'apoptose, et la mort mitotique. La susceptibilité d'induction des différents types de morts cellulaires radio-induites dépend fortement de l'irradiation, du type cellulaire et du contexte: selon que la cellule soit normale ou tumorale. En effet, si on considère l'apoptose, les cellules normales sont plus sensibles à une apoptose précoce. Par contre, par définition, les cellules tumorales issues de tumeurs solides acquièrent une certaine radiorésistance et par conséquent une résistance à l'apoptose qui peut apparaître tardivement voir après plusieurs générations **(Verelle, 1998; Luce, 2008)**.

4.3. L'apoptose radio-induite

L'apoptose radio-induite peut survenir immédiatement après irradiation : c'est la mort interphasique, ou apoptose précoce; elle peut également se produire après l'arrêt radio-induit en G2; ou après une ou plusieurs divisions cellulaires (apoptose tardive, ou mort mitotique). Plusieurs études suggèrent que dans certains modèles, l'induction de l'apoptose radio-induite pourrait être influencée par le point de contrôle à la transition G2/M. Dans ces modèles, c'est au cours de l'arrêt radio-induit en G2 que la décision serait prise d'entraîner la cellule en apoptose ou non; la protéine p53 joue un rôle fondamental dans cette décision,

indépendamment de l'arrêt en G1 **(Luce, 2008)**.

Certaines expériences ont montré qu'une irradiation pouvait induire l'apoptose suite à aux cassures de brins d'ADN générées et par l'inhibition de leur réparation. Suite à cela; une activation d'endonucléases est induite ce qui entraîne la fragmentation de l'ADN et sa dégradation **(Baatout, 2002)**. Par ailleurs, l'apoptose est un mode de réponse, parmi d'autres, à une exposition aux radiations et peut-être initiée à partir de deux cibles bien identifiée: la membrane cellulaire et l'ADN nucléaire.

4.4. La radiosensibilité intrinsèque et courbe de survie des cellules irradiées

La radiosensibilité intrinsèque correspond à la mise en place de mécanismes moléculaires qui permettent à la cellule de résister aux rayonnements. Le concept de radiosensibilité intrinsèque introduit par Fertil et Malaise **(Fertil & Malaise, 1981; Fertil & Malaise, 1985)**, peut être étudié par l'établissement de courbes de survie en fonction de la dose unique délivrée. La proportion de cellules survivantes, ou taux de survie (S), diminue lorsque la dose (D) augmente. Une étude expérimentale permet d'établir la relation entre le taux de survie, la dose pour un type cellulaire et des conditions déterminées. La courbe de survie est la représentation graphique de cette relation. Les premières courbes de survie de cellules de mammifère après irradiation ont été obtenues par Puck et Marcus **(Puck & Marcus, 1956)**. Elles sont formées de deux parties linéaires séparées par une incurvation ou un épaulement de la courbe plus ou moins marqué (Figure 27).

L'aspect de cette courbe est expliqué par la théorie de la réparation cellulaire. L'hypothèse étant que toutes les lésions potentiellement réparables le sont à de faibles doses d'irradiation. L'inflexion de la courbe de survie s'explique par le dépassement des mécanismes de réparation lorsque la dose augmente. La pente initiale de la courbe de survie correspond aux doses auxquelles certaines lésions sont d'emblée irréparables **(Milia, 2005).**

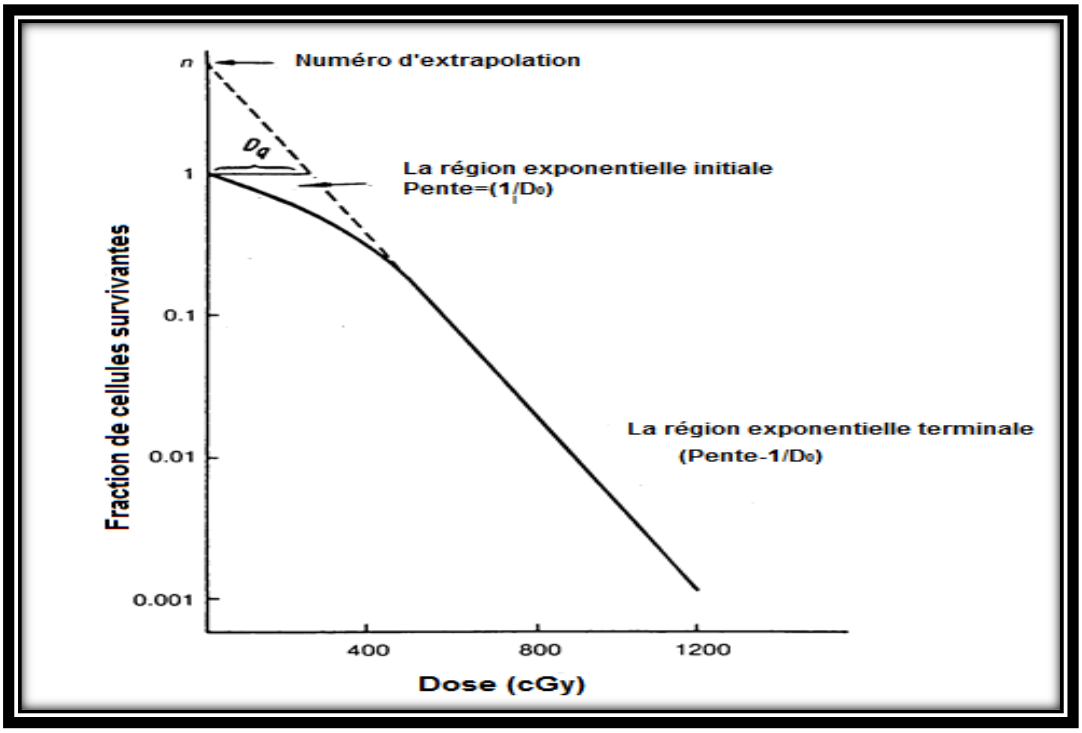


Figure 27 : Courbe de survie cellulaire de cellules de mammifères après irradiation **(Whiters *et al*., 1992).**

4.5. Les principaux types de courbes de survie et leurs modélisations mathématiques

Différents modèles mathématiques décrivant la courbe de survie, et en particulier l'épaulement, ont ensuite été développés pour décrire les mécanismes hypothétiques de cet effet **(Tubiana, 1986).**

►**Le modèle de *« une cible à un coup »* :** une seule lésion d'une cible induit la mort cellulaire.

►**Le modèle de *« n cibles sublétales à un coup »* :** n cibles doivent être atteintes une fois pour produire la mort cellulaire.

Le taux de survie correspondant est donné par : $\mathbf{S = 1 - (1 - e^{D/D0})^n}$

►**Le modèle de « une cible à deux coups » (modèle quadratique) :** la mort cellulaire résulte de l'addition de deux évènements sub-létaux indépendants produits par le passage de deux particules distinctes.

Le taux de survie correspondant est donné par :$\mathbf{S = -e^{\beta D2}}$

►**Le modèle conjuguant les deux premiers modèles « Le modèle linéaire quadratique » :** la mort cellulaire peut résulter soit de l'atteinte d'une cible létale, soit de n cibles sublétales.

Ce dernier modèle permet la coexistence de deux évènements létaux, la cellule pouvant être tuée :

- Soit par une lésion directement létale, cet événement constituant la composante linéaire de l'équation (pente à l'origine)
- soit par accumulation de lésions sub-létales qui constituent la composante quadratique. Le taux de survie correspondant est donné par :$\mathbf{S=e^{-(\alpha D+\beta D2)}}$

Parmi les différents paramètres calculés à partir de cette équation et qui servent à caractériser la radiosensibilité. Il y'en a un qui est fréquemment utilisé; la SF2: fraction de cellules survivantes à 2 Gy. Plus la SF2 est grande, moins la lignée cellulaire étudiée est radiosensible **(Tubiana *et al*., 2008)**

Les courbes de survies ainsi modélisées se dissocient en deux composantes (Figure 28). La première, représentée par la partie initiale, correspond à l'équation :$\mathbf{e^{-\alpha D}}$.Dans cette partie initiale, la létalité cellulaire est presque uniquement due à des événements létaux directs. Cependant, plus la dose augmente, plus la contribution des événements sub-létaux est importante.

La deuxième, correspond à l'équation : $\mathbf{e^{-\beta D2}}$ ou les événements sub-létaux sont représentés.

α : pente à l'origine et représente la probabilité de production d'un événement létal.

β: correspond à la deuxième composante de la courbe et représente la probabilité de production d'un événement sub-létal.

D : la dose (Gy).

Les coefficients α et β se rapportent respectivement aux lésions létales et aux lésions sub-létales. Le rapport (α/β) donne une indication sur leur importance relative dans la mortalité cellulaire. Ce rapport qui s'exprime en Gy, est très élevé lorsque la courbe de survie est quasi exponentielle et

très faible lorsque l'épaulement est important. Le rapport (α/β) est la valeur de la dose pour laquelle les effets des termes linéaires et quadratiques sont égaux, car quand $\alpha D = \beta D^2$, on obtient $D=\alpha/\beta$.

La valeur de ce rapport dépend du type cellulaire, il est important pour des cellules responsables de réactions précoces et il est faible pour celles responsables de lésions tardives. Les cellules radio-résistantes ont un rapport **α/β** petit, leur courbe de survie présente un large épaulement. Par contre, les cellules radiosensibles ont un rapport **α/β** grand et leur courbe de survie présente un faible épaulement.

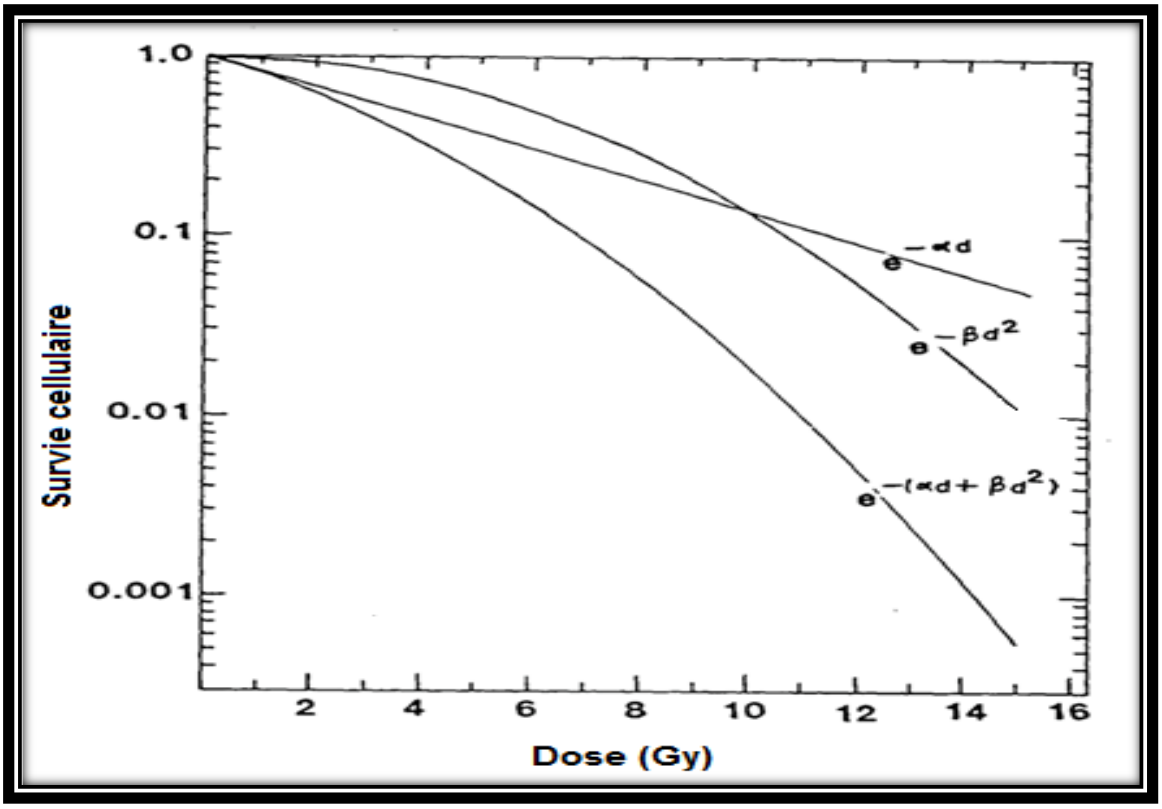


Figure 28: *Modèle linéaire quadratique.* La courbe de survie est le résultat de deux mécanismes de mort cellulaire : la mort cellulaire induite par une lésion représentée par la première partie de la courbe dont l'équation est $e^{-\alpha d}$, et une mort par des lésions cumulées expliquant l'incurvation progressive de la courbe et représentée par le coefficient **β**. Le rapport **α/β** représente la dose à laquelle les deux types de mécanismes interviennent de façon égale dans la survenue de la mort cellulaire **(Whiters *et al.*, 1992).**

CHAPITRE II: MATERIEL & METHODES

1.Isolement et identification des souches

1.1. Matériels

1.1.1. Matériels biologiques

Les échantillons de sol ont étés collectés en 2014 à partir d'une dizaine de sites de prélèvements de différentes niches écologiques (sol rhizosphérique ou non rhizosphérique) du territoire national, à savoir les wilayas: Adrar, Alger, Boumerdes, Tizi-ouzou, Bechar, Bejaia, Biskra, El-Menia, Sidi-Bel-Abbès et Tamanrasset (voir Tableau 2). Les prélèvements de sol et des sédiments ont été réalisés à la surface du sol jusqu'à 10 cm de profondeur.

Tableau2: Nature et coordonnées géographiques des différents prélèvements.

	Wilaya	Nature de prélèvement	Coordonnées géographiques
01	Adrar	Sol non rhizosphérique de Regane	Latitude: 26.7199, Longitude: 0.171146 26° 43′ 12″ Nord, 0° 10′ 16″ Est
02		Sol rhizosphérique de Timimoune	Latitude: 29.25, Longitude: 0.25 29° 15′ 0″ Nord, 0° 15′ 0″ Est
03	Alger	Sol rhizosphérique de Douéra	36° 40′ 13″ Nord, 2° 56′ 41″ Est
04	Bechar	Sol rhizosphérique de Kerzaz	Latitude: 29.4535, Longitude: -1.41788 29° 27′ 13″ Nord, 1° 25′ 4″ Ouest
05	Bejaïa	Sol rhizosphérique de sidi aich	36° 36′ 47″ Nord, 4° 41′ 18″ Est
06	Biskra	Sol rhizosphérique de Biskra	Latitude: 34, Longitude: 5 34° 0′ 0″ Nord, 5° 0′ 0″ Est
07	El-Menia	Sol rhizosphérique d'El-Goléa	30° 35′ 20″ Nord, 2° 52′ 47″ Est
08	Sidi-Bel-Abbès	Sédiment du lac de sidi mohamed benali (Ain trid)	35° 14′ 30″ Nord, 0° 38′ 50″ Ouest
09		Sol rhizosphérique	35° 11′ 38″ Nord, 0° 38′ 29″ Ouest
10	Tamanrasset	Sol non rhizosphérique de l'Iniker	22° 47′ 13″ Nord, 5° 31′ 38″ Est
11	Tiziouzou	Sol rhizosphérique de beni-yenni	Latitude: 36.5752, Longitude: 4.20764 36° 34′ 31″ Nord, 4° 12′ 28″ Est
12	Boumerdes	Sol rhizosphérique de corso	Latitude: 36.7565, Longitude: 3.43333 36° 45′ 23″ Nord, 3° 25′ 60″ Est

- **Souches *Bacillus thuringiensis* (Bt) de référence (standard)**

- *B.thuringiensis* serovar berliner 1715 (sérotype 1).
- *B.thuringiensis* serovar berliner 1915 (DSM 350).

La culture de ces deux souches a été réalisée sur milieu solide et liquide Gélose Nutritive (GN) à 30°C pendant une dizaine de jours.

- **Souches de référence (standard) utilisées pour l'activité antibactérienne**

- *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SASM).
- *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).
- *Pseudomonas aeruginosa* (Ps) (7NSK$_2$).
- *Escherichia coli* (Ec) (JM109).

La culture de ces souches a été réalisée sur milieu solide Mueller Hinton (MH) à 30°C pendant 18-24 h.

- **Champignons de référence (standard) utilisées pour l'activité antifongique**

- *Aspergilus niger (DSM 737).*
- *Aspergilus flavus.*
- *Fusarium sp.*
- *Colletotrichum sp.*
- *Monilia sp.*
- *Thielaviopsis sp.*

La culture de ces champignons a été réalisée sur milieu gélose de pomme de terre agar (PDA) à 28°C pendant 72h.

- **Souche de référence (standard) utilisée pour l'activité*anti-archaebactérie***

- *Natronococcus sp.*

Cultivée sur milieu Shigel Gibbons (SG) avec une concentration de 20% en NaCl à 40°C, pendant 7 à 15 jours.

1.1.2.Milieux de culture

Les compositions de tous les milieux de culture bactérienne utilisés dans notre travail sont données en (Annexe 1).

1.1.3. Produits biologiques, chimiques et réactifs

Tous les produits utilisés sont de haute qualité analytique. Ils ont été obtenus auprès des firmes Sigma-Aldrich (USA), Merck (Allemagne).

1.1.4. Matériels de laboratoire

La liste de tout le matériel (appareillages, équipements, verrerie, ustensiles,…) utilisé dans ce travail est donnée en (Annexe2).

1.2. Méthodologie

1.2.1. Isolement des souches bactériennes

Les différents échantillons sont reconstitués en solution mères (1g dans 09 ml d'eau physiologique stérile), puis diluées de 10^{-1} à 10^{-5}. L'ensemble est ensemencé séparément par épuisement ou par étalement sur gélose nutritive et incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures.

L'isolement sélectif des souches de *Bacilluss spp.*est basé sur l'incapacité des spores de Bt à germer et soutenir une croissance à de fortes concentrations en acétate de sodium.

Ce test a été réalisé suivant le protocole proposé par **Travers *et al.*, (1987),** qui permet de faire une bonne présélection.

En effet, un gramme de chaque échantillon est mis en suspension dans 5ml d'eau distillée stérile. Ensuite, 1ml de chaque suspension est ajouté à 9 ml de bouillon nutritif LB (Luria Bertani) 2 fois concentré tamponné par l'acétate de sodium à différentes concentrations (0.06, 0.12, 0.25 et 0.5 M) et à pH de 6.8. Les suspensions ont été incubées à 30°C sous agitation de 150 rpm pendant 4h puis chauffées à 80°C pendant 3 min (pour éliminer les cellules végétatives). Une série de dilution est effectuée (10^{-1} à 10^{-4}). 100 µl de chaque dilution sont étalés sur milieude sporulation T3 **(Travers *et al.*, 1987)**, puis incubés à 30°C pendant 48h.

Suite à l'apparition des colonies, plusieurs repiquages ont été effectués sur milieu solide T3 (T3/Agar) pour purifier d'avantage les souches de Bt. Les isolats sont considérées pures lorsque les cultures soient axéniques **(Carozzi *et al.*, 1991)**.

⇒ **Calcul de nombre de colonies (UFC/ml)**

Le nombre de colonies ou unité formatrice de colonie (UFC) a été calculé par la méthode de dilution. Le nombre de colonies est équivalent à une approximation du nombre de bactéries vivantes de l'échantillon.

Calcul : Le nombre de colonies par boite X l'inverse de la dilution (facteur de dilution).

Exemple : Nombre d'UFC/ml=57UFCX10^{6}=5.7X10^{7}UFC/ml.

Cette étape nous permet d'inoculer la même concentration de bactérie pour les différentes concentrations en acétate de Na (nous permet de faire une comparaison).

1.2.2.Identification bactériologique des souches sélectionnées

Elle permet la sélection des souches de *Bacillus spp.*sur la base d'un certain nombre de caractères phénotypiques, morphologiques, physiologiques, biochimiques, enzymatiques et biologiques.

L'étude génétique est par la suite un apport pour la confirmation de nos études.

1.2.2.1. Etude macroscopique

Elle consiste à une observation directe à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose nutritive après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C.

Les critères pris en considération sont la taille, forme, élévation de la colonie, aspect en surface, opacité, consistance et la couleur ou pigmentation.

1.2.2.2. Etude microscopique

- **Observation par microscopie photonique**

L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope photonique (Zeiss). La surveillance des cultures à différents temps permet de caractériser les cellules à l'état végétatif (phase exponentielle) ainsi qu'à l'état sporulé pendant laquelle il y'a formation du corps parasporal. La présence et la forme du cristal parasporal est par la suite, confirmée par une coloration spécifique.

- **Coloration Gram :** Cette coloration a été réalisée suivant le protocole proposé par **(Eswarapriya *et al.*, 2010)**. Elle nous permet de différencier les bactéries Gram positif ou Gram négatif.

- **Coloration de la spore au vert de Malachite:** Cette coloration permet la mise en évidence des spores. Elle a été réalisée suivant le protocole proposé par **(Ejiofor & Johnson, 2002).** Les spores apparaissent vertes et les cellules roses.
- **Coloration du corps Parasporal (cristaux) au bleu de Coomassie brillant G250:** Cette coloration permet la mise en évidence du corps parasporal **(Rahbani, 2014**). Elle facilite la distinction entre les spores et les cristaux colorés en bleu.

Après sélection d'une dizaine de souches de *Bacillus spp.*des observations au microscope électronique à balayage ont été réalisées pour confirmer la présence et la forme de toxines.

- **Observation par microscopie électronique à balayage**

L'observation du cristal et la détermination de sa forme reste le moyen le plus sure pour confirmer l'appartenance des souches de *Bacillus thuringiensis* au groupe *Bacillus cereus* (critère de sélection selon **Lecadet *et al.*, (1999)** .Pour une bonne observation, une préparation doit être entreprise selon le protocole quelque peu modifié de **Tan Zhou *et al.*, (2014**).

Les isolats de Bt ont été cultivés dans un bouillon nutritif pendant 5 jours à 30°C, jusqu'à la lyse. Les mélanges de spores/cristaux ont été mis en suspension dans 1ml de NaCl 1M et centrifugés pendant 10 min à 12000 ×g à 4°C, puis lavés 3 fois par centrifugation à l'eau distillée froide et stérile. Le culot est re-suspendu dans 500µl d'eau ultra-pure pré-refroidit. Des suspensions concentrées de 10 µl soit de mixture (cristaux/spores), soit de cristaux purifiés ont été lavés deux fois avec de l'éthanol/eau (1:1, v/v), puis placées sur une lamelle propre et séchées à 4°C sous vide. Une fois séchés, les échantillons sont fixés avec 1% d'osmium tétroxide (OsO4).

L'observation des cristaux a été réalisée à l'aide de deux microscopes électroniques à balayage, celui du Centre de recherche nucléaire d'Alger (PHILIPS ASEM XL 30 ESEM), et celui du département de Génétique à l'Université de Valence en Espagne (FEI-Inspect S50) avec lequel les cristaux ont été observés et photographiés à un grossissement de 24 000.

1.2.2.3. Tests biochimiques classiques

Après sélection, des tests biochimiques ont été réalisés à l'aide de galeries API® 20 E™ et API 50CH (Bio-Mérieux, France). La galerie API® 20 E™ est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (**Holmes *et al.*, 1978**), comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés. Tandis que la galerie API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes. Les tests ont été réalisés sur des souches jeunes qui ont été repiquées sur un milieu nutritif (GN) pendant 18 à 24 h à 37°C.

La lecture des résultats est faite suivant le catalogue analytique ou logiciel d'identification (Api Web) (Annexe 3).

- **Test catalase**

C'est une enzyme catalysant la décomposition de l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau (H_2O). Sur une lame propre on dépose une goutte d'une suspension bactérienne à laquelle on ajoute une goutte d'eau oxygénée à 10V. Si la souche possède la catalase ceci se traduira par une réaction d'effervescence, au contraire si cette souche en est dépourvue aucune réaction ne sera observée à ce moment-là.

- **Type respiratoire**

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par une culture sur milieu Viande-foie (VF). Les bactéries aérobies strictes se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu

contenu dans des tubes, alors que les bactéries aérobies-anaérobies facultatives, croient tout au long du milieu.

1.2.2.4.Biotypage de *Bacillus thuringiensis*

Après identification de *Bacillus thuringienisis*, un biotypage des souches est réalisé grâce à quatre tests biochimiques précis à savoir esculine, salicine, lecithinase et le sucrose suivant la classification donnée par **Martin & Travers, (1987)** (voir Tableau 3).

Tableau 3: Types biochimiques de *Bacillus thuringiensis* selon **(Martin & Travers, 1987).**

Type biochimiquesous-espèce décrite	***Résultats des tests biochimiques***			
	Esculine	***Salicine***	***Lécithinase***	***Sucrose***
1(thuringiensis)	+	+	+	+
2(kurstaki)	+	+	+	-
3(indiana)	+	+	-	+
4(galleriae)	+	+	-	-
5(sotto)	+	-	+	+
6(dendrolimus)	+	-	+	-
7(morrisoni)	+	-	-	+
8(darmastadiensis)	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12(ostriniae)	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14(israelensis)	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-

- **Test d'hydrolysede la lécithine**

Ce test nous permet de savoir si la souche d'intérêtpossède ou pas une lécithinase. L'action de cette enzyme sur la lécithine libère la choline soluble et un triglycéride peu soluble qui précipite dans le milieu créant une zone opaque crème jaunâtre à bord net autour de la colonie. Elle est étudiée par ensemencement par spot d'un milieu gélosé Trypticase-Soja-Agar additionné de jaune d'œuf stérile à 10% en eau physiologique et incubée à 30°C pendant 24h à 48h **(Kebdani, 2017).**

1.2.2.5.Capacité d'hémolyse

a. Capacité d'hémolyse des souches sélectionnées

L'activité hémolytique des différentes souches isolées est testée sur les érythrocytes de sang

humain de donneurs sains certifiés, gracieusement donné par le Centre Hospitalo-Universitaire d'Alger-Centre. Pour cela, 100 ml de gélose Columbia est supplémentée de 5 ml de sang humain frais stérile. Ce test permet de mettre en évidence la dégradation partielle (hémolyse α) ou totale (hémolyse β) des érythrocytes.

La lecture des boites est faite suivant l'apparition de zone :

- ✓ claire totale de diamètre 3 à 4 mm entourant les colonies **(hémolyse β).**
- ✓ floue et granuleuse, verdâtre de 1 à 2 mm de diamètre **(hémolyse α)**, le produit verdâtre est la méthémoglobine.
- ✓ aucune **(non hémolytique)**.

b. Capacité d'hémolyse des protéines parasporales

Ce test d'hémolyse a été réalisé suivant le protocole proposé par **Mizuki *et al*., (1999)** et **Ishii *et al*., (1993).** Du sang humain est mis en contact avec les protéines cristallines purifiées dans des plaques multi test à 96 multipuits, l'absorbance (DO) a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre T60UV-visible (PG instruments, Lutterworth, England) à la longueur d'onde de 540 nm.

Le test de l'activité hémolytique comprend plusieurs étapes résumées comme suit :

Les érythrocytes humains ont été lavés deux fois par centrifugation à 800xg avec un tampon salin Tris 20mM à pH 8,0. Ils ont été ensuite remis en suspension dans une solution saline tamponnée au Trisà une concentration de 2 % (v/v).

100µl de la préparation parasporale à une concentration de 100 µg/mL a été ajoutée à 100µl de la suspension d'érythrocytes à2 % (v/v). Les mélanges obtenus ont été répartis à travers une plaque multi-test à 96 multipuits à fond rond. Le tout a été incubé pendant 18 h à 27°C, ensuite centrifugée à 800xg pendant 10min. Le surnageant a été examiné pour observer l'hémoglobine libérée par une mesure de densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre T60UV-visible (PG instruments, Lutterworth, England).

1.2.2.6. Résistance aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques est évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton (MH), selon les recommandations du **CA-SFM/EUCAST (2018).**

A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont suspendues dans 5 ml d'eau physiologique stérile. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mac Farland ou à une DO de 0,08 à 0,13 à 625 nm

(correspondant à environ 10^8 UFC/ml). Une dilution de 1/10 est réalisée.

A l'aide d'un écouvillon stérile, la suspension bactérienne diluée à 1/10 (10^7 UFC/ml), est étalée sur la totalité de la surface gélosé des boites, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux à trois fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur le rayon et en le passant sur la périphérie de la gélose MH.

Les disques d'antibiotiques à tester (voir Tableau 4) sont déposés à la surface de la gélose, à l'aide d'une pince stérile à distance de 15 à 20mm.

Après incubation à 37°C pendant 24h, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés. L'interprétation en sensible (S), ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le **CA-SFM/EUCAST (2018)** (Annexe 4).

Tableau 4: Les différents disques antibiotiques utilisés **(HiMedia)** suivant leurs familles.

Antibiotiques	Abréviation	Charge (µg)/disque	Famille
Kanamycine	**K**	**30**	Aminosides
Gentamycine	**GEN**	**10**	Aminosides
Tobramycine	**TOB**	**10**	Aminosides
Streptomycine	**S**	**10**	Aminosides
Cefalexine	**CN**	**30**	β-lactamines
Penicilline G	**P**	**10**	β-lactamines
Ampicilline	**AMP**	**10**	β-lactamines
Chloramphenicol	**C**	**30**	Phénicolés
Erythromycine	**E**	**15**	Macrolides
Ceftraxone	**CTR**	**30**	Céphalosporines

1.2.2.7. Activité antibactérienne

Pour cette étude, on a utilisé la technique de diffusion en disque dans un milieu gélosé selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (NCCLS) qui permet de détecter les souches présentant une activité antibactérienne à l'encontre d'autres germes de références à savoir *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (SASM), *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps) ($7NSK_2$) et *Escherichia coli* (Ec) (JM109).

La préparation des bactéries tests a été effectuée à partir d'une culture pure âgée de 18 heures. On prépare une suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et on décharge dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9% et on homogénéise.

A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures des souches à tester à savoir *Bacillus*, on réalise des disques de gélose de 2 à 5 mm de diamètre dont chacun renferme une seule colonie.

Les boites de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton sont ensemencées par écouvillonnage avec le germe test en question. Les disques de gélose refermant une colonie de la souche de *Bacillus* à tester sont déposés aseptiquement sur la boite à raison de 4 disques correspondant à 4 différentes souches de *Bacillus* espacés de 2cm. Les boites sont incubées à 30°C pendant 24 à 48h.

Un résultat positif se traduit par une zone d'inhibition autour du disque de gélose, ce qui indique la synthèse de molécules antibactériennes. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse métallique.

1.2.2.8.Activité *anti-archaebactérie*

Pour démontrer l'activité anti-archaebactérienne, une archaebactérie halophile a été utilisée, *Natronococcus sp.* Pour favoriser sa croissance, on a utilisé le milieu Shigel Gibbons (SG) avec une concentration de 20% en NaCl ainsi que de l'eau salée à 20% de NaCl pour sa mise en suspension. Le mode opératoire et la lecture sont les mêmes que ceux décrit pour l'antagonisme vis-à-vis des germes pathogènes. L'incubation des boites se fait à 40°C, température favorable pour la croissance des archaebactéries, pendant 7 à 15 jours.

1.2.2.9. Activité antifongique

L'activité antifongique des souches sélectionnées est réalisée vis-à-vis de 6 champignons pathogènes pour l'homme et/ou pour l'animal *(Aspergilus niger (DSM 737)* et *Aspergilus flavus)* et/ou phytopathgènes (*Fusarium sp, Colletotrichum sp, Monilia sp* et *Thielaviopsis sp).* Leurs pathologies sont liées à la synthèse de mycotoxines.

Les disques du mycète test ont été préparés par ensemencement par spot sur des boites de Pétri contenant une gélose de pomme de terre agar (PDA). Ces dernières ont été incubées à 28°C pendant 72h. Des disques de gélose de 2 à 5 mm de diamètre ont été coupés à partir de la culture du champignon.

Les disques des souches de *Bacillus* sont préparés de la même manière que celle décrite dans l'antagonisme antibactérien.

Sur une boite de Pétri contenant une gélose nutritive, on dépose au centre le champignon test et à une distance de 2,5 cm on dépose le disque de gélose contenant la colonie de la bactérie à tester. L'incubation se fait à 30°C pendant 72h avec des lectures quotidiennes.

La présence d'une zone d'inhibition entre le champignon test et la souche indique la synthèse de molécules antifongiques (voir Figure 29). Un rapport montrant l'importance de cette activité (Le potentiel de l'activité antifongique) est calculé comme suit :

R = Rayon interne du champignon / Rayon externe

- R est compris entre 0-0,6 : une forte activité antifongique.
- R est compris entre 0,61-0,85 : une activité antifongique moyenne.
- R est supérieur à 0,85 : activité antifongique très faible à négligeable.

1.2.3. Conservation des souches

Les souches purifiées et sélectionnées sont conservées à une température de $+4^0$C sur un milieu solide LB (Luria-Bertani). Un repiquage est effectué à intervalle de temps régulier (chaque 2 mois). Pour un stockage de longue durée, les souches sont conservées à -20^0C sur milieu LB incliné contenant du glycérol à 40%.

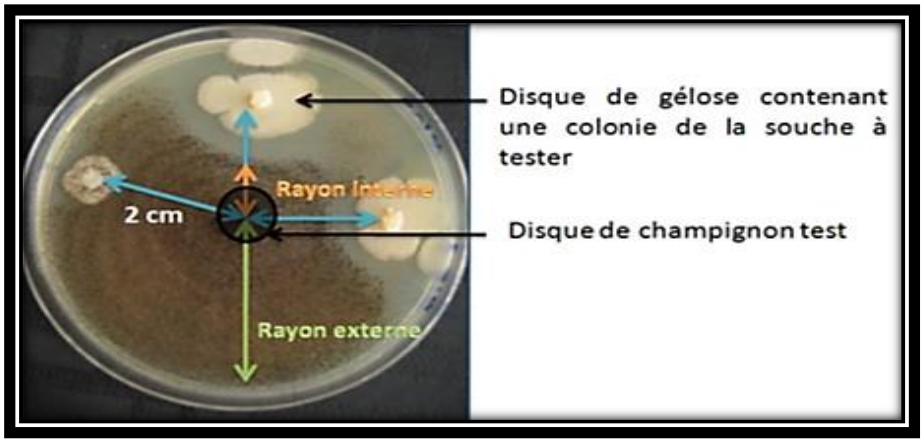


Figure 29 : Schéma représentant la technique utilisée pour la recherche de l'activité antifongique.

2. Caractérisation moléculairedes souches sélectionnées

L'identification moléculaire des bactéries repose essentiellement sur l'analyse de la séquence du gène ARNr *16S*. La séquence est comparée à l'aide de logiciels spécialisés (blast) parles banques de séquences comme "Nucleotide" du portail NCBI, ou EMBL en Europe. L'identification va reposer sur le pourcentage d'identité des séquences. Nous admettons généralement, qu'une similarité supérieure ou égale à 97% permet l'identification au niveau espèce. Une identité de 95% indique un genre commun des deux séquences. Enfin, en dessous de 95%, il y a une possibilité que l'espèce soit nouvelle car non décrite dans les banques de données. Par ailleurs, certains logiciels permettent de positionner la séquence obtenue au laboratoire parmi l'ensemble des séquences ARNr *16S* disponibles sous forme d'arbres phylogénétiques. Cette possibilité est particulièrement intéressante lorsque nous déterminons au laboratoire une séquence ARNr *16S* de similarité inférieure à 97%; cela permet alors d'avoir une idée du groupe (clade) bactérien dans lequel se situe la bactérie nouvellement identifiée.

L'identification génotypique de dix souches jugées intéressantes a été réalisée par le laboratoire BIOFIDAL à Lyon, France.

2.1. Extraction et purification de l'ADN génomique des souches sélectionnées

Cette étape est réalisée pendant la phase exponentielle de la croissance avec un kit de purification d'ADN génomique (Oméga Biotech Mag-Bind Universal Pathogen Kit), l'extraction s'est faite sur colonie d'après le protocole fourni avec le kit.

Un dosage fluorimétrique de l'ADN a été réalisé grâce à l'appareil Quantus (Kit Quantifluor DNA Proméga).

Amplification de l'ARNr *16S* avec les amorces universelles 16S-27F et 16S-1492R, dont les séquences sont représentées dans le tableau 5 (**Lane DJ *etal*., 1991).**

Tableau 5: Amorces universelles utilisées pour l'identification de l'ARNr *16S* bactérien.

Amorces utilisées	Séquences
16S-27F	**5' AGA GTT TGA TCM* TGG CTC AG 3'**
16S-1492R	**5' TAC GGY* TAC CTT GTT ACG ACT T3'**

*16S-27F :(M *étant souvent une Cytosine). C'est une amorce spécifique aux séquences moyennes dépassant les 1466 pb. Son amorce inverse est la16S-1492R : (Y* étant souvent une Cytosine).*

►Conditions des amplifications PCR

Pour la réalisation des Mix :

Extraits ADNg : 2µl (200ng).

Mix HOTBIOAmp 5X à 12.5mM $MgCl_2$: 5µl.

Amplificateur10X: 1.5µl.

Amorce 16S-27F:1µl (10mM).

Amorce 16S-1492R: 1µl (10mM).

H_2O qsp 30µl : 14.5 µl.

Cycles de PCR :

96°C pendant 12 min (activation du Mix Hot Start HOTBIO Amp).

L'amplification par PCR a été effectuée comme suit : 35 cycles, 96°C pour une dénaturation de 20s, 56°C pendant 20s pour l'hybridation de l'amorce, et 72°C pendant 90s pour une extension.

1- Contrôle de la qualité de ces produits PCRs sur QIAXCEL pour validation de la qualité et la quantité de ces produits PCRs.
2- Purification de ces produits PCRs par purification enzymatique (méthode Exosap).
3- Séquençage de ces produits PCRs avec les amorces : 16S-27F, 16S-515F, 16S-805R et 16S-1492R.
4- Analyse et alignement de l'ensemble des séquences pour créer un Contig de 1470 bases correspondant à la séquence complète du gène 16S.
5- Blast sur la base de données du NCBI et du PBIL (BiBi) de l'UCBL1 pour identification des souches analysées.

2.2.Purification des amplicons obtenus et mise en séquençage

- Tous les produits d'amplification ont été purifiés et mis en séquençage.
- Les purifications des amplicons ont été faites par le kit ExoSap-It(Thermo Fisher Scientific)**.**
- Les produits PCR ont été dilués au 1/15, avant mise en séquençage avec le kit BigDyeV3.1 DyeTerminator Kit (Thermo Fisher Scientific).
- Les produits PCR ont été analysés en utilisant le système d'électrophorèse Qiagen QIAxcelcapillaire et une bande prévue de ~ 1,5 kb est attendue.

- Les réactions de séquence ont ensuite été purifiées avec le kit BigDyeXterminator (Thermo Fisher Scientific) avant d'être analysées sur un séquenceur capillaire ABI3730XL96 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).
- Les séquences, après vérification, ont été alignées avec le logiciel CHROMAS Pro pour créer le Contig Complet du gène *16S* et ont été analysés à l'aide de l'outil Blast-N **(http://www.ncbi.nim. nih.gov).**
- Un contrôle positif (ADNg d'*E.coli*) ainsi qu'un contrôle négatif (H_2O) sont systématiquement amplifiés dans les mêmes conditions que les ADN bactériens à analyser.

2.3.Construction de l'arbre phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été assistée par le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), version 6.0 **(Tamura *et al.*, 2013)**. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de jonction de voisin avec le modèle de correction de distance de **Tamura & Nei, (2013)** avec 1000 réplications bootstrap.

2.4. Extraction et dosage de la protéine parasporale.

2.4.1. Extraction de la protéine parasporale

Plusieurs protocoles de séparation ont été testés suivants les propositions de certains auteurs :

- Séparation entre le cristal et la spore en utilisant un système bi-phasique qui est un système de deux solutions ; l'une contenant 4.68% de polyéthylène glycol 6.000 et l'autre 6.6% d'une solution de sodium dextran sulfate 500, **(Goodman *et al.*, 1967)**.
- Séparation parcentrifugation à gradient de NaBr **(Mizuki *et al.*, 2000)**.
  Séparation par centrifugation à gradient de sucrose discontinu qui consiste à préparer un gradient de sucrose discontinu de 67%, 72% et 79% (w/v) dans une solution de 50mM Tris –HCL (pH7.5) + 10mM de KCl **(Thomas *et al.*, 1983)**.

Cependant, la complexité de ces protocoles qui nécessitent plusieurs ultracentrifugations, et le coût excessif de leurs produits les rendent peu intéressants malgré leur efficacité de séparation.

Un protocole de séparation qui semblait plus facile avec des produits plus accessibles, proposé par **Rahbani *et al.*, (2014)** a été choisi et dans lequel l'extraction de la protéine est

toujours basée sur la séparation en système bi-phasique :

⇒ Mise en culture des souches sur milieu nutritif jusqu'à sporulation et lyse (dix jours).

⇒ Le milieu de culture liquide est centrifugé à 6000 rpm, 4ºC pendant 10mn à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Sigma 2-16PK).

⇒ Le culot est lavé deux fois par suspension dans une solution de NaCl 1M contenant 0,01 % triton X-100, suivi d'une centrifugation à 6000 rpm, 4ºC pendant 10mn.

⇒ Le culot est suspendu dans une solution saline (NaCl 9g/l) dans un tube Falcon de 50ml. Un solvant organique (hexane) est ajouté à un rapport de 100µl/ml de la suspension aqueuse.

⇒ La suspension est mise dans un bac à ultrason (Sonorex super RK 102H) à 20 kHz pendant 20 minutes pour casser l'agglomération des spores et des cristaux puis re-centrifugée à 6000 rpm, 4ºC pendant 10mn. Le culot obtenu est de nouveau suspendu dans la solution saline. Les étapes 3 et 4 sont répétées 3 fois.

⇒ Finalement, le culot est lavé avec de l'eau distillée à température ambiante. Une fois le culot récupéré, on lui fait subir une lyophilisation à l'abri de la lumière, le produit final est sous forme d'une poudre de couleur blanchâtre.

2.4.1.1. Rendement de récupération

Deux données peuvent nous renseigner sur le rendement de récupération des cristaux: La masse sèche des cristaux purs récupérés et la masse des protéines dans le milieu de culture après dissolution alcaline. La concentration des protéines totales est déterminée par la méthode de **Bradford, (1976).**

Le rendement de récupération est ainsi calculé grâce à l'équation suivante :

$$\text{Rendement de récupération} = \frac{Masse\ séche\ des\ critaux\ pures\ X100}{Masse\ des\ protéines\ \ dans\ le\ milieu\ de\ culture}$$ (**Rahbani, 2014**)

2.4.2. Estimation quantitative des protéines

La concentration des protéines totales est déterminée par la méthode de **Bradford, (1976)** en utilisant l'albumine du sérum bovin (BSA) comme standard.

- **Méthode de Bradford, (1976)**

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminées basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et marrons, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Préparation de la solution du bleu de Coomassie (test de Bradford)

La composition de la solution du bleu de Coomassie G-250 est donnée en (Annexe 1).

Courbe d'étalonnage de la Sérum albumine bovine (BSA)

Cette courbe peut être élaborée par la préparation d'une solution mère de BSA à 1 mg/ml, à partir de cette solution on prépare des dilutions de concentrations croissante (20, 40, 60, 80, 100 µg/µl) représentées dans le Tableau 6.

Les six tubes sont agités sur vortex, puis incubés à température ambiante pendant 5 min à l'abri de la lumière. Lecture des DO à 595nm des cinq tubes contre le blanc. Une courbe d'étalonnage de la D0 en fonction de la concentration en BSA (µg/µl) est alors tracée.

Tableau 6 : Préparation de la courbe d'étalonnage de la B.S.A

N° tube	1	2	3	4	5	6
B.S.A (µl)	0	20	40	60	80	100
Tampon (µl)	100	80	60	40	20	0
R.B** (ml)	5	5	5	5	5	5
Concentration BSA (µg/µl)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

****R.B:**Réactif de Bradford.

2.4.3.Solubilisation de la protéine cristalline et activation

Les solutions protéiques contenant les cristaux sont lavées deux fois avec une solution de (NaCl 0,14M contenant 0,01% triton X-100) et deux fois avec de l'eau froide stérile pour éliminer au maximum les protéines solubles et les protéases qui peuvent affecter l'intégrité des protéines cristallines et fausser nos résultats **(Rahbani, 2014)**.

Les protéines cristallines sont dissoutes dans un tampon de solubilisation alcalin composé comme suit: 50mMtampon carbonate Na_2CO_3 (pH10.5) + 10mM LD-DTT (LD-Dithiothréitol) + 1mM EDTA (Éthylène diamine tétra acétique), le mélange est incubé à 37°C pendant 1h avec une agitation de 140 rpm, puis centrifugé à 15 871x g pendant 20min à 4°C (**Mizuki *et al.*, 2000; Nadarajah *et al.*, 2008**).

Le surnagent riche en protéines est ainsi récupéré, puis on ajuste le pH à 8 (pH d'activité de la trypsine et de la protéinase K) en ajoutant quelques gouttes de HCl 1 M (protéine native).

La concentration de la protéine cristalline native solubilisée est déterminée par la méthode de **(Bradford, 1976)**. Le reste du surnagent est soigneusement conservé à 4°C pour d'autres analyses.

L'activation des protéines solubilisées est réalisée par ajout d'une des enzymes protéolytiques la trypsine à un rapport de 1:250 et la protéinase K à une concentration finale de 200µl/ml, pendant 30 min **(Brasseur *et al.*, 2015)**. La protéolyse est stoppé par le phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) à 1 mM, et enfin afin d'éliminer au maximum les traces des produits utilisés on a centrifugé les solutions à une vitesse de 14,650×g à 37 °C **(Mizuki *et al.*, 2000; Nadarajah *et al.*, 2008).**

2.4.4.Séparation électro-phorétique des protéines sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel suivie d'une détection quantitative des protéines est la technique la plus résolutive, elle permet de séparer des molécules chargées en solution par application d'un champ électrique. Le gel de polyacrylamide, introduit en 1959, est la matrice la plus utilisée en électrophorèse pour séparer les protéines d'un organisme. C'est un gel inerte de porosité variable, légèrement hydrophobe, produit de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes réticulées par du NN'-méthylènebis- acrylamide **(Ballihaut, 2007)**.

a. Préparation des différents tampons

La composition et la préparation des différents tampons utilisés en électrophorèse sont

données en (Annexe 5) et Tableau 7.

Tableau7: Compositions des gels de concentration (5%) et de séparation (10%) **(Laemmli, 1970; Johnstone *et al.*, 1987).**

	Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide 50 %	**500µl**	**2ml**
APS 1.5 %	**250µl**	**225µl**
Eau distillée	**3.575ml**	**3.925 ml**
SDS 10 % (m/v)	**50µl**	**400µl**
TEMED	**100µl**	**200µl**
Tris HCl1 M pH 6.8	**625µl**	**-**
Tris HCl 1 M pH 8.8	**-**	**3.750 ml**

Une fois le gel de séparation coulé entre les deux plaques en verre, une réaction de polymérisation est aussitôt mise en route et il y'a formation d'un gel. On coule ensuite le gel de concentration et on place immédiatement le peigne qui va former les puits. Les plaques sont mises dans une cuve (Cleaver.Scientific.Ltd) contenant le tampon d'électrophorèse conducteur.

Chaque échantillon est mélangé au tampon de charge (tampon d'échantillon) dans un rapport (2V/V) dans un tube Eppendorf (en général 40µl/20µl).

Une fois la plaque chargée, on la branche au générateur de courant (Electrophoresis power supply, Consort EV215) que l'on règle à 80V en premier temps, jusqu'à ce que toutes les bandes s'alignent, puis on augmente le voltage à 120V et ce pendant 2h ½ à peu prés.

b. Révélation des protéines

Après migration, les protéines sont fixées dans les mailles du gel. Le gel est démoulé puis mis dans une solution de coloration pendant 24h. Les protéines sont révélées par une coloration au bleu de Coomassie. Le lendemain, ce dernier est transféré dans une autre solution de décoloration pendant 24h. Seules les protéines sous forme de bandes bleues apparaîtront.

c. Détermination de la masse molaire des protéines

On obtient différentes bandes pour chaque piste ou "colonne" correspondant aux protéines de différents poids moléculaires. La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues. Deux types de marqueurs ont été utilisés: Amersham LMW protein marker (GE Health care Europe GmbH, Freiburg, Germany) (14.4-116 kDa) et BenchMark™ Unstained Protein Ladder (novex® life technologies**,** USA) (10-220 kDa).

2.5. Purificationdes protéines parchromatographie d'exclusion moléculaire

La chromatographie d'exclusion moléculaire dite aussi par filtration sur gel, est une technique de purification qui permet une séparation simple et rapide des molécules solubles dans l'eau ou certains solvants organiques, en fonction de leur masse molaire. La forme de la molécule intervient également, c'est pourquoi on parle de masse molaire apparente. Cette technique est particulièrement utilisée pour le fractionnement des mélanges biologiques qui sont souvent très sensibles à la dénaturation.

Il s'agit de séparer un pool de protéines en de nombreux petits pools, dont certains sont enrichis avec la protéine d'intérêt. L'empilement des grains agit comme un "tamis", aux grosseurs de mailles variées, pour les molécules à séparer pendant l'élution d'un mélange donné, toutes les molécules de dimensions supérieures aux dimensions des plus gros pores des grains de gel le traversent en passant autour des grains et quittent la colonne après un trajet relativement court. Leur masse molaire apparente est supérieure à la limite d'exclusion, elles sont "exclues". Les molécules plus petites diffusent à l'extérieur et à l'intérieur des pores des grains et d'autant mieux qu'elles sont plus petites. Le trajet à parcourir est plus long et ces molécules sortent de la colonne dans l'ordre des masses molaires apparentes décroissantes.

Le gel utilisé est constitué par un empilement de grains poreux de type dextran : le sephadex G-100 (Merck) et ce pour sa vaste gamme de capacité de fractionnement (4000-150 000 Da). Dans notre étude le chromatographe utilisé est de marque Pharmacia LKB-UVicord SII (100cm x 2cm) (ALT, Connecticut, USA) (Figure 30).

a. Conditions opératoires

Phase stationnaire : Une matrice inerte, souvent avec un groupe fonctionnel attaché pour faciliter l'interaction de la protéine, qui sert à séparer les protéines. Le choix de la phase stationnaire et le groupe fonctionnel dépend à la fois du type de chromatographie qui est en

cours d'exécution et le procédé par lequel elle sera réalisée. Dans nos expériences, on a choisi comme gel inerte (phase stationnaire), le séphadex G-100. On pèse 12 g de billes séphadex G-100 (Merck) que l'on met dans 250 ml de tampon d'élution (voir composition ci-dessous) pendant 48 h afin de gonfler, puis on a dégazé la solution par barbotage afin d'éliminer l'air susceptible de fausser les résultats.

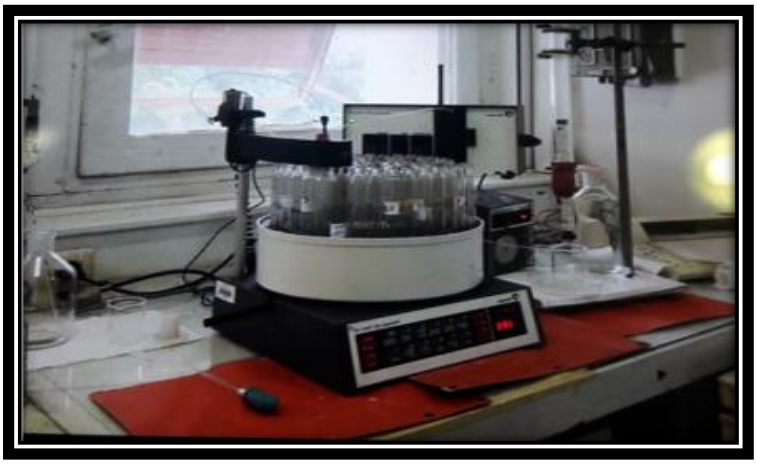


Figure 30: Chromatographe Pharmacia LKB-UVicord SII (100cm x 2cm)(ALT, Connecticut, USA).

- **Colonne:** est un réservoir cylindrique en verre vide (100 cm x 2cm).
- **Tampon d'élution:**contient des additifs utilisés pour l'équilibrage, le lavage, et l'élution de protéines de la phase stationnaire.C'est un tampon carbonate*:* 50mM Na_2CO_3-HCl pH.10.5.
- **Purification et repérage des fractions protéiques:** les fractions susceptibles de contenir la ou les protéines d'intérêt doivent être repérées au cours de cette étape et ce par spectrophotométrie et lecture de DO à une longueur d'onde de 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (T60UV-Visible, Lutterworth, England). Les fractions les plus intéressantes ont été concentrées à l'aide d'une cellule Amicon 8200, dotée d'une membrane millipore (Filter code : YM1 dia 63.5mm). Les concentrations des fractions protéiques ont été déterminées par le test de Bradford.
- **Volume de l'échantillon injecté:** 3ml de la solution protéique a été injecté en haut de la colonne à un débit ou" flow rate" de 80ml/h.

b.Détermination des masses moléculaires des fractions protéiques

Cette détermination a été possible à la suite du traçage de la courbe étalon. Plusieurs protéines standards ont été éluées dans les mêmes conditions opératoires que nos protéines.

Les protéines ont été choisies selon leurs poids moléculaires (PM) connus (Tableau8). Le bleu dextran (Pharmacia) a été utilisé pour la détermination du volume mort V_0.

Tableau 8: Poids moléculaires des protéines standards utilisées pour l'étalonnage de la chromatographie d'exclusion moléculaire.

Protéine standard	PM (kDa)
ß-lactoglobuline	**18.36**
Trypsine	**27**
protéase de Rhizopus	**41**
BSA	**66**
Bleu Dextran	**200**

2.6. Purification des fractions protéiques par électrophorèse séparative

Cette étape permet de contrôler la pureté des fractions protéiques de notre intérêt et de déterminer avec précision leurs poids moléculaires.

Méthodologie

- Une fois purifiées par chromatographie d'exclusion moléculaire, le poids moléculaire des différentes fractions obtenues après activation de la protéine cytotoxique ont été estimés.
- Les différentes fractions ont été testées une à une envers les lignées cellulaires HEp2, A549 et Véro, seules les fractions dont le taux de viabilité est inférieur à 50% ont été retenues.

Remarque : Seules les fractions les plus actives subissent une purification supplémentaire par électrophorèse séparative.

2.7.Recherche des gènes codant pour la parasporine 1, 2, 3 et 4

Les gènes codant pour la parasporine (PS) 1, 2, 3 et 4 ont été identifiés par la technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant les amorces citées en (Annexe6) (**Mizuki *et al.*, 2000).**

Le processus d'amplification a été réalisé dans un mélange réactionnel de 25µl contenant: 5µl Mix HOTSTART 5×, 1,5µl Amplificateur 10×, 1µl de chaque amorce, et 5µl de matrice d'ADN (200 ng) et H_2O qsp 30µl : 14.5µl.

L'amplification par PCR a été réalisée comme suit: 35 cycles avec un programme de température: 94°C dénaturation initiale pendant 5min, 96°C pour une dénaturation pendant 20s, 56-60°C pour l'hybridation (*annealing*) pendant 60s, 72°C extension de l'amorce pendant 60s; 72◦C extension finale pendant 10 min.

Les produits de la PCR ont été analysés en utilisant un gel d'agarose à 1% contenant 0,5g/ml de bromure d'éthidium dans une unité d'électrophorèse sur gel horizontale (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en utilisant l'unité d'électrophorèse sous-marine Tarsons Midi. La migration électrophorétique a été effectuée pendant 40mn à 90volts (Electrophoresis Power SupplyFoto-Force 250, Consort E143) et le gel a été visualisé sous un système d'imagerie UVP Biodoc-IT UV Transilluminator.

La taille attendue est d'environ 2,7 kb (2694 pb) pour la PS1, 700 pb pour la PS2, 912 pb pour la PS3 et 828 pb pour la PS4 a été estimée à l'aide de marqueurs moléculaires (1 kb plus échelle d'ADN d'Invitrogen, France), ce qui suggère la présence des gènes PS1, PS2, PS3 et PS4 respectivement.

Le produit de la PCR (~2,7 kb) a ensuite été cloné dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA), ce qui a donné le plasmide pPS1-G (Cette étude). L' *E.coli* DH5α a été utilisé comme souche hôte. Tous les clones recombinants d' *E.coli* ont été cultivés en milieu LB avec l'ajout d'ampicilline (100µg/mL), d'isopropyl-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) (0,67mM), et de X-gal (360µg/mL) pour le dépistage.

L'électrophorèse, la purification, la restriction, la ligature et la transformation de l'ADN ont toutes été réalisées selon la méthode décrite précédemment par **Sambrook *et al.*, (1989)**.

2.8. Séquençage NH2 terminal de la parasporine1

Les bandes de la protéine d'intérêt purifiée de la parasporine1 (*BDzG*) sont coupées sur SDS-Gel et transférées sur membrane ProBlott (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analyse de la séquence NH_2-terminale a été déterminée par la dégradation d'Edman automatisée utilisant le séquenceur de protéine (Applied Biosystems Protein sequencer ABI Procise 492/610A).

3. Activité cytotoxique des fractions protéiques et de la protéine cristalline

3.1. Matériels

3.1.1. Matériels biologiques

- Fractions protéiques purifiées.
- Protéine cristalline : Parasporine (PS1-*BDzG*).
- **Les lignées cellulaires :**
  - Cellules saines Véro (American Type Culture Collection (ATCC) ® CCL-81™), ce sont des cellules normales épithéliales de rein de singe vert africain. Gracieusement fournies par le laboratoire des substances bioactives, Centre de Biotechnologie, Université El Manar, Tunis (Figure 31 A).
  - Cellules cancéreuses adhérentes HEp2 (ATCC® CCL23™), ce sont des cellules épithéliales humaines de type 2, dérivé d'un carcinome épidermoïde du larynx humain. Gracieusement fournies par l'Institut Pasteur de Sidi-Fredj (Figure 31 B).
  - Cellules cancéreuses adhérentes A549 (ATCC ® CCL-185™), ce sont des cellules de l'épithélium basal alvéolaire humain adénocarcinome pulmonaire. Gracieusement fournies par l'Institut Pasteur de Sidi-Fredj (Figure 31 C).

3.1.2. Milieux de culture

Les détails de la composition et la préparation de tous les milieux nécessaires pour la culture cellulaire sont données en (Annexe 1).

3.1.3. Produits biologiques, chimiques et réactifs

Tous les produits utilisés sont de haute qualité analytique. Ils ont été obtenus auprès des firmes Sigma-Aldrich (USA), Merck (Allemagne), Invitrogen (USA) et Panreac (Espagne), Gibco® (USA).

3.1.4. Matériels de laboratoire

La culture cellulaire nécessitant des conditions de stérilité absolues, est réalisée dans le laboratoire de radiobiologie type L2 du CRNA, doté d'un saset d'une centrale de traitement d'air.

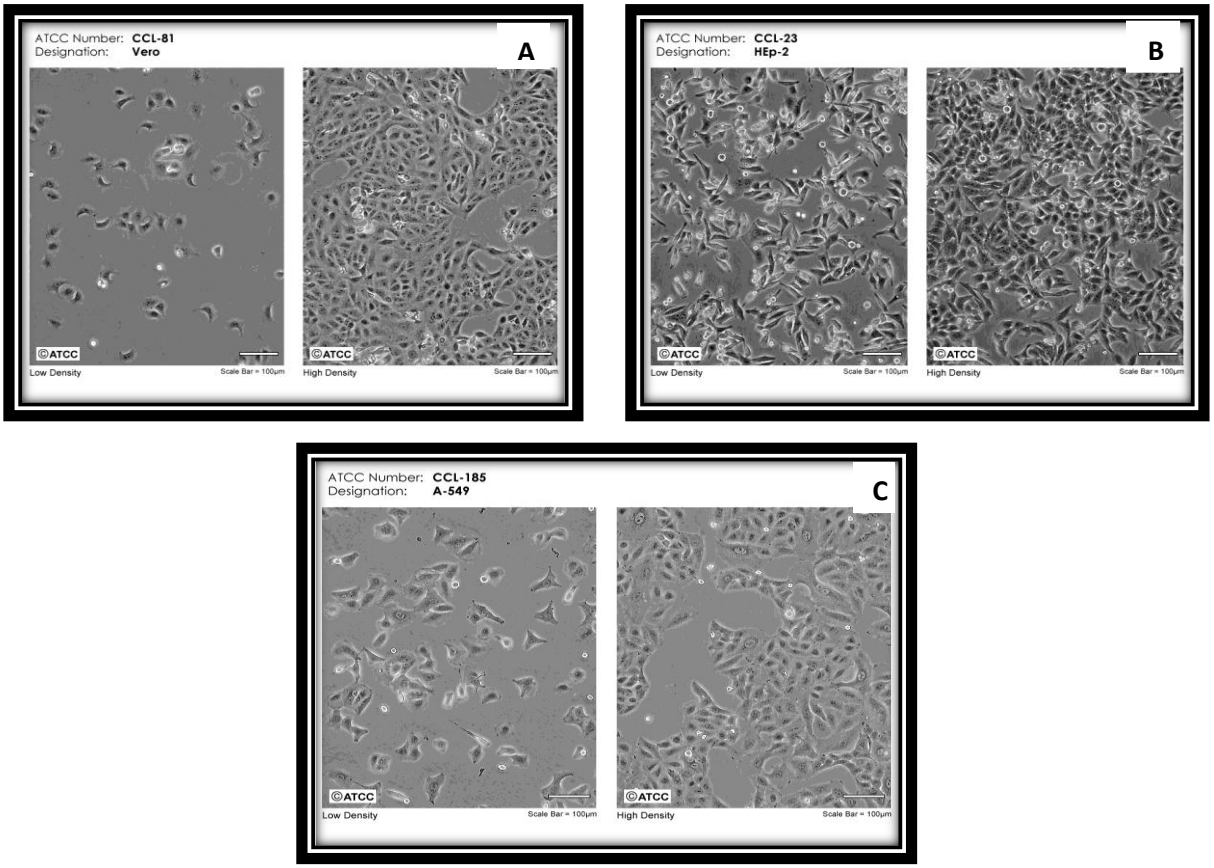


Figure 31: Photographies représentant les cellules adhérentes en **A**: Véro (ATCC ® CCL-81™), en **B**: HEp2 (ATCC ® CCL23™) et en **C**: A549 (ATCC ® CCL-185™).

3.2. Méthodologie

3.2.1. Mise en culture des lignées cellulaires

3.2.1.1. Décongélation des cellules

La décongélation des cellules cryo-conservées à -196°C se fait au bain-marie à 37°C sous agitation. Le microtube devrait contenir environ 4.10^6 cellules/ml. On dilue le contenu de l'ampoule immédiatement dans environ 5 à10 ml de milieu DMEM approprié dans un tube Falcon stérile de 15 ml, on centrifuge à 1000 rpm l'équivalent de 200-300 x g pendant 7 min à 4°C. Le culot est ensuite récupéré et re-suspendu dans 4ml de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) frais à 20% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) pour stimuler la croissance. Les cellules sont ensemencées dans une boite T-25 et misent dans l'incubateur à 37°C et à 5% de CO_2. Les cellules sont observées au microscope quotidiennement pour surveiller leur prolifération.

3.2.1.2. Entretienet suivi de la culture des cellules

Lorsque les cellules arrivent à confluence (en général après 48h), la boite est vidée de son milieu et lavée 2 fois avec 5 ml de PBS pour les boites de culture T25, 10 ml pour les T75 et 20 ml pour les T175. Le détachement des cellules se fait par ajout d'une enzyme: la trypsine à 0.5 ml pour T25, 1,5 ml pour T75 et 3ml pour T175 ensuite; les boites sont ainsi incubées pendant 3 mn à 37°C. Le temps écoulé, les boites sont observées sous microscope inversé pour s'assurer du décollement cellulaire. L'action de la trypsine est alors immédiatement arrêtée par simple ajout de milieu DMEM.

La suspension cellulaire est alors estimée par comptage sur cellule de Malassez **(Borderie, 2014)** (Figure 32) et suivant la formule suivante:

$$N(cellules) = \frac{NC}{5} X 10^5 X \left(\frac{1}{D}\right) X\, V$$

Où **N** : Nombre de cellules ;**NC** : Nombre total de cellules observées sur 5 carreaux,
D: Dilution et **V** : Le volume total du milieu contenant les cellules.

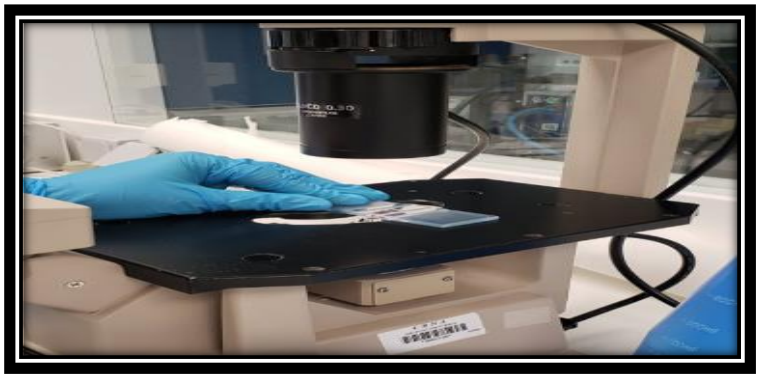


Figure 32 : Photographies représentant l'étape de comptage du nombre de cellules dans la suspension grâce à la cellule de Malassez sous microscope photonique à inversion GX40.

Le maintien des cellules en vie se fait par un entretien continu de la culture, le nombre des cellules est amplifié selon le besoin. Lorsque les cellules arrivent à confluence elles arrêtent de se diviser par inhibition de contact. On procède alors à un repiquage ou passage, c'est à dire, redistribuer les cellules dans plusieurs flacons ou bien en jeter une partie et rajouter du milieu neuf.

Les passages se font généralement toutes les 48 heures en respectant scrupuleusement les conditions de stérilité, si la moindre contamination est suspectée la boite est jetée.

3.2.2. Caractérisation des lignées cellulaires

3.2.2.1. Détermination du temps de dédoublement

La croissance cellulaire est caractérisée par l'intervalle de temps que met la cellule à se dédoubler. La détermination du temps de dédoublement est effectuée après ensemencement de 30 boites T25 à raison de 25000 cellules puis comptage quotidien de 3 boites prises au hasard pendant 10 jours.

3.2.2.2. Détection des mycoplasmes

La contamination des cultures cellulaires par les mycoplasmes est un des problèmes principaux en culture cellulaire car ils modifient le métabolisme des cellules. Leur détection est mise en évidence par microscopie à fluorescence selon le protocole suivant :

- Mise en culture de chaque lignée cellulaire à une concentration cellulaire de $15X10^4$ cellule/boite, étalées sur une lamelle de verre disposée dans la boite.
- Après 48h d'incubation à une température de 37°C, le milieu DMEM est ensuite éliminé et on rince deux fois avec du tampon Phosphate salin (PBS). Les cellules sont fixées deux fois pendant 5mn par un mélange méthanol/acide acétique (2 à 3 gouttes jusqu'à remplir toute la lamelle), on laisse sécher les boites.
- Sous obscurité, on met sur une lame 60 µl d'une solution au fluorochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (10µl DAPI dans 40ml PBS) et on dépose la lamelle inversée sur la lame avec le coté qui contient les cellules.

La présence ou absence des mycoplasmes est alors révélée par observation des cellules au microscope à fluorescence (LEICA DM 6000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne).

3.2.3. Etude de l'activité cytotoxique et anti-proliférative des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) purifiées par chromatographie

3.2.3.1.Mise en contact des différentes fractions protéiques (PS1-*BDzG*) solubilisées et activées avec les différentes lignées cellulaires

100 µl de suspension cellulaire contenant 4×10^4 cellules [Véro (ATCC® CCL-81 ™), HEp2 (ATCC® CCL23 ™) et A549 (ATCC® CCL-185 ™)] cultivées dans du DMEM ont été

ensemencées dans chaque puit de la plaque multi-tests à 96 puits et incubée à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 pendant 24h.

Les différentes fractions protéiques purifiées ont été préalablement stérilisées par filtration grâce à des filtres seringues (Fisher brand Syringe Filter ; PES 0.22µm) sous hotte, pour palier à toute éventuelle contamination. 100µl de chaque fraction est ajoutée (en triplicata). Trois temps de contact ont été effectués avec les différentes lignées cellulaires. Les plaques ont été ainsi incubées pendant 24h, 48h et 72h à 37°C et à 5% CO_2.

3.2.3.2. Evaluationde l'activité cytotoxique des fractions protéiques sur la viabilité cellulaire

L'activité cytotoxique des différentes fractions protéiques purifiées par chromatographie d'exclusion moléculaire évaluée sur les cellules sainesVéroet cancéreusesHEp2 et A549 est révélée par la méthode colorimétrique du bromure de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) basée sur l'activité mitochondriale. La quantité des cristaux, violets non hydrosolubles à l'intérieur de la cellule, est déterminée par spectrophotométrie et sert d'estimation du nombre de cellules vivantes dans l'échantillon **(Carmichael *et al*., 1987).**

Protocole opératoire

- Après la mise en contact et incubation, on élimine le surnagent que l'on remplace par du milieu DMEM neuf (100µl/puit). On dépose ensuite soigneusement 10 µl de la solution au bromure MTT (Invitrogen, *Life Technologies*) stérile (5mg/ml) dans du PBS dans chaque puit. Les plaques sont incubées dans les mêmes conditions pendant 4 h.
- On retire le surnageant et on dissous l'excès de colorant en déposant 100 µl de diméthyl sulfoxide (DMSO) stérile dans chaque puits. Le tout est encore ré- incubé pendant 10 mn.
- Après 2mn d'agitation, les densités optiques de chaque puits sont mesurés à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (SYNERGY™ HT, BioTek Instruments, Vermont, USA).

  Les taux de survie cellulaire ont été calculés en % de viabilité des cellules à l'aide de la formule suivante:

$$\textbf{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\textbf{Abs de l'échantillon} - \textbf{Abs du blanc}}{\textbf{Abs controle} - \textbf{Abs du blanc}} X100 \textbf{ (Barnabe, 2017)}$$

Où, le **blanc** : (cellules +milieu DMEM), le **contrôle** : (cellules + milieu DMEM+Milieu de solubilisation).

3.2.3.3. Détermination et observation de l'effet cytotoxique des fractions actives de la protéine cristalline (PS1-*BDzG*)envers les lignées cellulaires

La détermination de l'effet des fractions protéiques sur la viabilité cellulaire avait révélé un effet cytotoxique d'une dizaine de fractions protéiques supérieur à 50% (**Section 3.2.3.1.**de ce chapitre).

Ces fractions sélectionnées dont celles possédant les protéines actives ont été concentrées grâce à une cellule (Amicon 8200) contenant une membrane millipore (Filter code : YM1 dia 63.5mm) et utilisées pour une détermination plus précise de l'effet cytotoxique.

Les suspensions cellulaires contenant 4×10^4 cellules des souches de référence Véro, HEp2 et A549 ont été ensemencées sur des plaques de multi-tests à 96 puits et incubée à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 pendant 24 h.

La protéine cristalline active a été testée à différentes concentrations, chaque test est refait trois fois sur deux expériences différentes (n=6).

L'activité cytotoxique a de même été déterminée par le test de viabilité cellulaire au tetrazolium (MTT). L'absorbance a été mesurée à l'aide du lecteur de microplaques à 540 nm. Les taux de survie des cellules ont été calculés.

L'effet cytopathique (ECP) a été observé au microscope à contraste de phase (Bresser, Brignoles, France) pendant 24h post-inoculation. Des changements morphologiques ont été observés à différents temps.

3.2.4. Caractérisation de la mort cellulaire

L'effet cytotoxique est confirmé par la caractérisation du type de mort cellulaire. A cet effet, la coloration à l'orange acridine (AO) a était utilisé pour visualiser les changements nucléaires et la formation de corps apoptotiques.

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles rondes placées dans des plaques multi tests

à 6 puits à raison de 10^5cellules/ml. Chaque puits est rempli de milieu DMEM complété par 10% de SVF. Après incubation à 37°C pendant 24h, la protéine cytotoxique est ajoutée à une concentration connue (IC_{50}=2.33µg/ml). Les cellules ont ensuite été colorées à 0.12ml/puits d'acridine orange (Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) à raison de 100µg/ml selon les protocoles proposés par **Cho *et al.*, (1999)** et **Attari *et al.*, (2009)**. Après une incubation de 5min dans l'obscurité à température ambiante, les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (LEICA DM 6000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne).

4.Activité cytotoxique du rayonnement ionisant

4.1. Matériels

4.1.1. Matériels biologiques

Les lignées cellulaires :

- Cellules saines Véro (American Type Culture Collection (ATCC) ® CCL-81™).
- Cellules cancéreuses adhérentes HEp2 (ATCC ® CCL23™).
- Cellules cancéreuses adhérentes A549 (ATCC ® CCL-185™).

4.1.2. Milieux de culture

-Milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*).

Les détails de la composition et la préparation de tous les milieux nécessaires pour la culture cellulaire sont données en (Annexe 1).

4.1.3. Produits biologiques, chimiques et réactifs

Tous les produits utilisés sont de haute qualité analytique. Ils ont été obtenus auprès des firmes Sigma-Aldrich (USA), Merck (Allemagne), Invitrogen (USA) et Panreac (Espagne), Gibco® (USA).

4.1.4. Equipement

Irradiateur (type ELDORADO-78AECL) du laboratoire SSDL du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) contenant une source de cobalt 60 qui émet un rayonnement ionisant gamma (Figure33).

4.2. Méthodes

L'activité cytotoxique des rayonnements ionisants peut être traduite par une survie cellulaire ou son contraire une mort cellulaire. L'étude quantitative de cette mortalité cellulaire est effectuée par établissement de courbes de survie cellulaire comme la représentation graphique de la relation entre le taux de survie des cellules clonogènes et la dose délivrée.

Pour cette étude la caractérisation des cellules utilisées est nécessaire et permettra de prendre en compte leur comportement vis à vis du rayonnement.

Figure33: Photographie représentant l'Irradiateur (ELDORADO-78AECL) du laboratoire SSDL du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA).

4.2.1. Caractérisation des lignées cellulaires

Cette évaluation est effectuée par deux paramètres :

- **Détermination du coefficient de collage (*plating efficiency*)**

Le terme de coefficient de collage ou d'adhérence ou *plating efficiency* (PE) indique le pourcentage de cellules qui ont adhéré au support et qui sont capables de donner des colonies. Il correspond au pourcentage de cellules viables après 6 dédoublements. Il est égal au rapport entre le nombre de clones formés et le nombre de cellules ensemencées.

PE= Nombre de colonies comptées / Nombre de cellules ensemencées à 0 Gy

Protocole opératoire

- On ensemence 12 boites T25 à différentes concentrations cellulaires (3 boites contenant 500 cellules, 3 boites contenant 1000 cellules, 3 boites contenant 2000 cellules et enfin 3 boites pour 4000 cellules) (voir Tableau 9).

-Les boites sont laissées dans l'incubateur pendant 7-8 jours jusqu'à apparition de clones cellulaires.

-Au bout de 6 divisions (7-8 jours) il y'a apparition de clones ; les clones cellulaires sont fixés à l'éthanol 95% (Sigma-aldrich) et colorés au bleu de Giemsa (Merck) qui est dilué à 1/20 dans de l'eau distillée. Les clones formés de 50 cellules et plus sont comptés.

- **Détermination de la clonogénicité des cellules (survie cellulaire)**

La radiosensibilité intrinsèque des cellules est quantifiée par le test clonogénique: Il est possible d'établir *in-vitro* une courbe dose-effet qui permet de quantifier la létalité. Ces courbes sont obtenues par le test de clonogénicité. Elles représentent une réponse globale des cellules à l'irradiation.

Après ensemencement d'un nombre connu de cellules irradiées, la mesure du nombre de colonies formées par les cellules que l'irradiation n'avait pas stérilisées devient la méthode de référence pour évaluer la fraction survivante des cellules **(Foray *et al.*, 2013).**

Protocole opératoire

- Mise en culture des lignées cellulaires comme expliqué précédemment (**Section 3.2.1** de ce chapitre).

-Préparer différents pools à partir de la solution cellulaire mère : 100 000 cellules/ml ; 10 000 cellules/ml (Tableau 9).

-On ensemence six plaques multi-tests à 6 puits, correspondant à 6 doses d'irradiations (0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy et 5 Gy) (voir conditions d'irradiation en Tableau 10) à différentes concentrations cellulaires et en 3 réplicas pour le test de survie (S) (Tableau 9).

- On laisse incuber les plaques multi-tests à 6 puits une dizaine de jours* (correspondant à 6 divisions cellulaires) à une température de 37°C et à 5% CO_2.

(*)Ce temps est fonction du temps de dédoublement de la lignée cellulaire. Pour effectuer la coloration il faut que la majorité (80%) des colonies dans les boites de 0 Gy ait plus de 50 cellules.

Tableau 9: Représentant les concentrations cellulaires utilisées pour le test de clonogénicité.

Nombre de cellules	V2 (ml)	Test de survie (S) *Plating efficiency*(PE)	Application numérique	V1 (ml)	Volume de DMEM 10%
500	**15**	**PE**	**(500x15) / 10^4**	**0.75**	**14.25**
600	**30**	**S x 2**	**(600x30) / 10^4**	**1.8**	**28.2**
1000	**30**	**PE + S**	**(1000x30) / 10^4**	**3**	**27**
1500	**15**	**S**	**(1500x5) / 10^4**	**2.25**	**12.75**
1800	**30**	**S x 2**	**(1800x30) / 10^4**	**5.4**	**24.6**
2000	**30**	**PE + S**	**(2000x30) / 10^4**	**6**	**24**
2500	**15**	**S**	**(2500x15) / 10^4**	**3.75**	**11.25**
3000	**15**	**S**	**(3000x15) / 10^4**	**4.5**	**10.5**
4000	**15**	**PE**	**(4000x15) / 10^4**	**6**	**9**
4500	**15**	**S**	**(4500x15) / 10^4**	**6.75**	**8.25**
6000	**15**	**S**	**(6000x15) / 10^4**	**9**	**6**
7500	**15**	**S**	**(7500x15) / 10^4**	**11.25**	**3.75**

- **Conditions d'irradiation des cellules**

Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été exposées au rayonnement ionisant gamma émis par une source de cobalt-60 de l'irradiateur (ELDORADO-78AECL) du laboratoire SSDL du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA).

L'irradiation a été effectuée à un débit de dose de 21,658cGy/min aux doses de 1, 2, 3, 4 et 5 Gy, à température ambiante moyenne de 20°C (Tableau 10). Les plaques ont été irradiées en position horizontale à une distance (source-cible) de 60 cm. La taille du champ d'irradiation est de 30cm x 30cm (Figure 34). Les temps d'irradiation en fonction de la dose d'irradiation

sont donnés en Tableau 10.

Tableau 10 : Temps d'irradiation en fonction de la dose d'irradiation (Gy).

Dose d'irradiation (Gy)	Concentration cellulaire (nombre de cellules)	Temps d'irradiation (min)
0	**600 - 1800**	**-**
1	**600 - 1800**	**4.63**
2	**1000 - 3000**	**9.25**
3	**1500 - 4500**	**13.87**
4	**2000 - 6000**	**18.48**
5	**2500 - 7500**	**23.10**

►Calcul de la survie cellulaire

Après comptage du nombre de colonies. Les valeurs obtenues seront rectifiées en utilisant le coefficient de collage ou *plating efficiency* (PE), qui varie selon la lignée cellulaire étudiée. La fraction de cellules survivantes (S) pour une dose donnée est exprimée :

$$\textbf{La survie cellulaire(S)}=\frac{Nombredecoloniescomptées}{PEXNombredecellulesensemmencées}$$

Figure 34 : Photographie représentant l'irradiation des cellules au rayonnement gamma du Co^{60} (Irradiateur ELDORADO-78 AECL du CRNA).

4.2.2. Modélisation mathématique de la courbe de survie

Ces valeurs expérimentales (les fractions de cellules survivantes à différentes doses) permettent d'établir la courbe de radio-survie suivant un modèle mathématique.

Le modèle linéaire-quadratique (le plus couramment utilisé pour ajuster les données de survie) a été décrit par **Tubiana, (1986)**.

Il définit la survie de la façon suivante :

$$S(D) = \exp^{-\alpha D - \beta D2}$$

Le paramètre **α** détermine la pente de la courbe de survie aux faibles doses (pente initiale), c'est à dire l'amplitude de l'épaulement. Le paramètre **β** détermine l'augmentation de la pente de la courbe aux fortes doses (**Granzotto *etal.*,2011)**.

La valeur du rapport α /β correspond à la dose (Gy) pour laquelle les mortalités sont dues en parts égales à des dommages directement létaux et à l'accumulation de dommages sub-létaux.

La valeur de ce rapport dépend du type de cellules, il est important pour des cellules responsables de réactions précoces et il est faible pour celles responsables de lésions tardives.

Les cellules radiorésistantes ont un rapport α /β petit, leur courbe de survie présente un large épaulement. Par contre, les cellules radiosensibles ont un rapport α /β grand et leur courbe de survie présente un faible épaulement **(Bodez, 2000).**

- **Détermination de la fraction de survie (SF2)**

La fraction de survie à 2 Gy (SF2) est déduite de la courbe expérimentale$\mathbf{S\ (D) = exp^{-\alpha D - \beta D2}}$ Cette valeur nous renseigne sur la radiosensibilité intrinsèque de la cellule **(Fertil & Malaise ,1981)**.

SF2>0.5 lignée radio- résistante.

SF2<0.5 lignée radio- sensible.

4.2.3. Evaluation de la survie cellulaire aux rayonnements

L'évaluation de l'effet cytotoxique du rayonnement ionisant sur les cellules a été réalisée par le test au tetrazolium (MTT) qui permet d'évaluer les différences de viabilité entre les cellules témoins non traitées et les cellules exposées aux rayonnements ionisants.

Protocole opératoire

-Chaque lignée cellulaire est mise en culture.

-3ml de la suspension cellulaire (cellules en phase exponentielle de croissance) contenant 4.10^4 cellules ont été ensemencées dans chaque puits d'une plaque multi-testsde 6 puits et incubée à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 95% et 5% CO_2, pendant 24 h.

-Six plaques pour chacune des lignées cellulaires ont été exposées au rayonnement ionisant gamma aux doses de 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy,3 Gy,4 Gy et 5 Gy dans les mêmes conditions citées plus haut (conditions d'irradiation).

- Après irradiation, les plaques multi-tests de 6 puits sont immédiatement replacées dans l'incubateur à température 37°C, 5% CO_2 et 95% d'humidité pendant 24 h.

- Après le temps d'incubation, on ajoute 300 µl de la solution MTT à une concentration de 5mg/ml dans du PBS dans chaque puits. Les plaques sont ensuite ré-incubées dans les mêmes conditions pendant 4 h.

- Le surnageant est retiré et le reste est dissous en déposant 3ml de diméthyl sulfoxide (DMSO) dans chaque puits. Les plaques sont encore replacées dans l'incubateur pendant 10mn.

- Les mesures de densités optiques sont effectuées à une longueur d'onde de 540nm à l'aide

d'un lecteur de microplaques (SYNERGY™ HT, BioTek Instruments, Vermont, USA).

- Les taux de survie cellulaire ont été calculés en % de viabilité des cellules à l'aide de la formule citée dans la (**Section 3.2.3.2** de ce chapitre).

5. Activité cytotoxique concomitante (PS1-*BDzG*+rayonnement ionisant)

Les associations concomitantes chimio-radiothérapique sont devenues actuellement la principale modalité d'association en thérapie anticancéreuse. Ce type d'association vise à mettre à profit la synergie "molécule cytotoxique-rayonnement" afin d'obtenir un meilleur contrôle local ainsi qu'une limitation des métastases. La supra-additivité d'un des traitements par l'autre qui correspond à une synergie des effets cytotoxiques, notamment par l'utilisation de médicaments dits « radiosensibilisants ». Cette propriété est basée sur le concept d'une interaction moléculaire, cellulaire ou tissulaire entre la chimiothérapie et l'irradiation et ce en créant de nouvelles lésions de l'ADN des cellules tumorales, transformant les lésions radio-induites réparables en lésions létales. La radio-chimiothérapie peut, aussi, bloquer la réparation des lésions potentiellement létales ou sub-létales, permettant l'élimination des cellules tumorales. **(https://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/traitements-locoregionaux/radiotherapie/les-applications-therapeutiques.html/).**

5.1. Matériels

5.1.1. Matériels biologiques

- Protéine PS1-*BDzG*.
- Les lignées cellulaires adhérentes: saine Véro (ATCC)®CCL-81™), cancéreuses HEp2 (ATCC®CCL23™) et A549 (ATCC®CCL-185™).

5.1.2. Milieux de culture, Produits biologiques, chimiques et réactifs

Tous les produits utilisés sont de haute qualité analytique. Ils ont été obtenus auprès des firmes Sigma-Aldrich (USA), Merck (Allemagne), Invitrogen (USA) et Panreac (Espagne), Gibco® (USA).

5.1.3. Equipement

- Irradiateur (type ELDORADO-78AECL) du laboratoire SSDL du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) contenant une source de cobalt 60 qui émet un rayonnement ionisant gamma (Figure 33).

5.2. Méthodologie

Protocole opératoire

-Les suspensions cellulaires contenant 4×10^4 cellules des souches Véro, HEp2 et A549 ont été

ensemencées sur des plaques multi-tests à 96 puits et incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 pendant 24 h (6 plaques pour chaque lignée cellulaire).

-La protéine PS1-*BDzG* a été testée à différentes concentrations allant de (0-50µg/ml), chaque test est refait trois fois (n=3).

-Après 24h de contact, les plaques sont irradiées aux doses de 1, 2, 3, 4 et 5 Gy à un débit de dose de 21,658 cGy/s et à température ambiante (3 plaques par dose donc, une pour chaque lignée cellulaire).

- Après irradiation les cellules sont immédiatement incubées et l'effet cytotoxique du traitement concomitant a été évalué via le test de viabilité cellulaire au tetrazolium (MTT).

- L'absorbance a été mesurée à l'aide du lecteur de microplaques à 540nm. Les taux de survie des cellules ont été calculés.

6.Analyse statistique

Les données ont été représentées sous forme de valeurs moyennes et d'écarts types à partir des moyennes (moyenne ± SD) des échantillons et sont analysées à l'aide de Logiciel d'analyse de données Biotek Gen5. L'analyse statistique a été effectuée par la méthode ANOVA *one-way* en utilisant le programme de comparaison des moyennes de *Tukey* ($P \leq 0,05$ est considéré comme différence significative). La concentration inhibitrice causant 50 % de mort cellulaire (IC_{50}) a été déduite des valeurs de courbes dose-réponse en utilisant le logiciel Origin 2016 et Origin 2019b.

CHAPITRE III: RESULTATS & DISCUSSIONS

1. Isolement et identification des souches

1.1. Echantillonnage

L'échantillonnage effectué en 2014 à travers les différents sites a permis la sélection de 12 échantillons de sols (rhizophérique et non rhizophérique) et de sédiments de différentes localités et de différents climats (méditerranéen, semi-aride et aride) du territoire Algérien. Ces derniers ont été stockés aseptiquement pour l'isolement de souches bactériennes et analyse.

1.2. Isolement des souches bactériennes

1.2.1. Etude macroscopique

Après isolement sur gélose nutritive à pH.7 et incubation à 30°C pendant 24h, l'aspect des différentes colonies isolées apparait extrêmement variable. On a pu observer des colonies rondes, ondulées, opaques, visqueuses parfois sèches ou produisant le mucus, volumineuses, rugueuses, d'autres lisses de couleur crème ou pigmentées. La caractérisation macroscopique des souches basée sur l'aspect des colonies de *Bacillus spp* sur milieu sélectif, colonies rondes à bord régulier, légèrement surélevées ou aplatie, opaques d'une couleur crème-blanchâtre, non brillantes, nous a permis d'isoler 48 souches de *Bacillus spp* (voir Figure 35) **(Baumann *et al.*,1984; Mohammedi et *al.*, 2006; Muniady *et al.*, 2011)**.

La sélection a été effectuée sur la base des observations de **Travers *et al.*, (1987)** remarquant que les spores de *B. thuringiensis* ne germaient pas en présence d'une forte concentration (≥0,25 M) d'acétate de sodium. Un milieu de sporulation chimiquement défini a été mis au point qui a permis d'isoler *B. thuringiensis* à partir des échantillons environnementaux.

Dans notre étude, 20 souches parmi les 48 *Bacillus spp* sélectionnées remplissaient ce critère (Tableau 11) et ce en constatant qu'il n'y avait pas formation de troubles; révélant une absence de germination de spores (voir Figure 36).

⇒ *Calcul de nombre de colonies (UFC/ml) à inoculer pour le test*

Une moyenne de 1.7 X 10^5 UFC /ml a été calculée pour les différentes colonies.

1.2.2. Etude microscopique

a) Observation par microscopie photonique à contraste de phase

Les observations au microscope photonique ont montré que pratiquement toutes les souches sélectionnées sont sous forme de bâtonnets droits de tailles très diverses (fins, moyens et gros) aux extrémités arrondies, arrangées soit en cellules isolées ou en streptobacilles.

Elle nous permet aussi de mettre en évidence la mobilité, la présence de la spore et du corps parasporal (Figure 37). Ce dernier est un critère primordial pour la présélection des souches de *Bacillus thuringiensis*. Pour se faire, nous avions opté pour une coloration spécifique au Bleu de Coomassie Brillant G-250. Le cristal coloré en bleu est visible au microscope (Figure 38). Une dizaine de souches parmi les 20 isolées révèlent très clairement un ou plusieurs corps parasporaux de formes et de tailles variables.

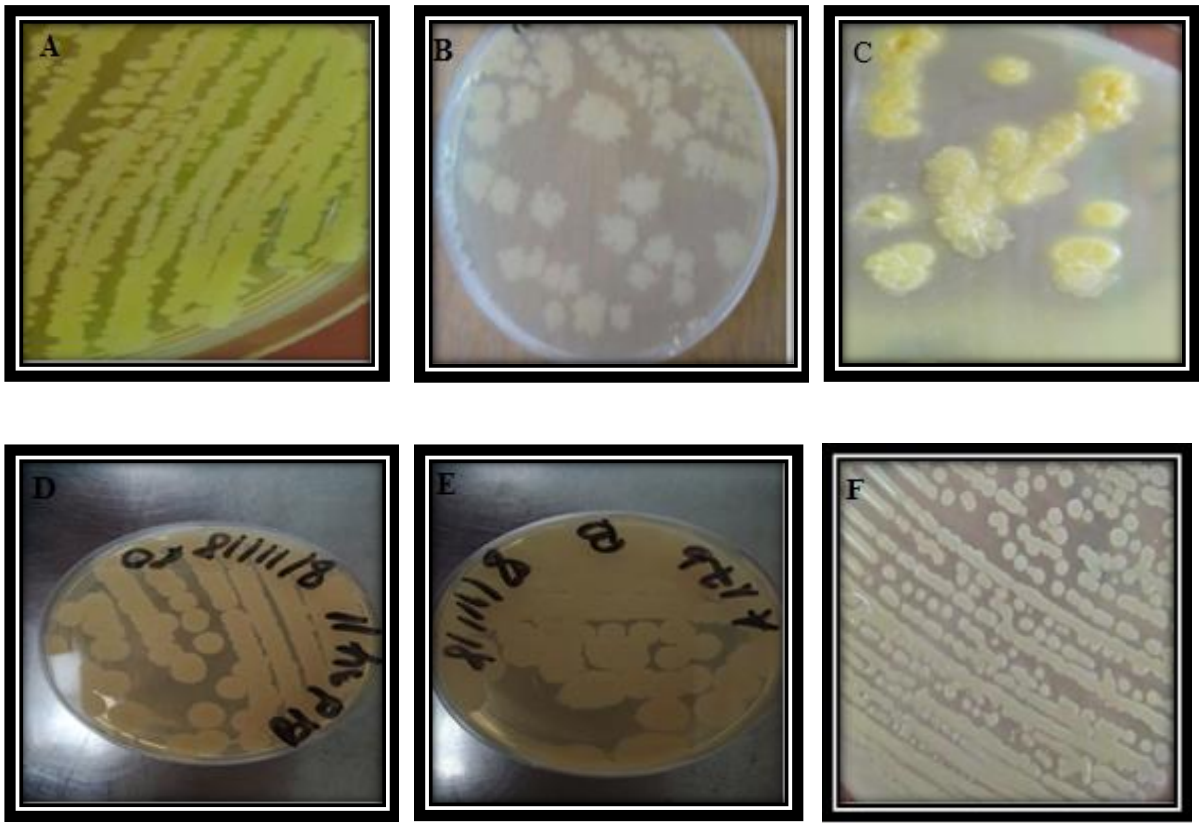


Figure 35 : Aspect macroscopique des colonies de quelques souches isolées. **A** : colonie pigmentée, **B**: colonie ronde à contour irrégulier de couleur crème; **C** : colonie sèche rugueuse de contour irrégulier ; **D&E** : colonies de couleur crème à contour régulier non muqueuses; **F** : colonie muqueuse de couleur crème blanchâtre. *(Les souches ont été cultivées sur milieu GN à 30°C pendant 24-48h).*

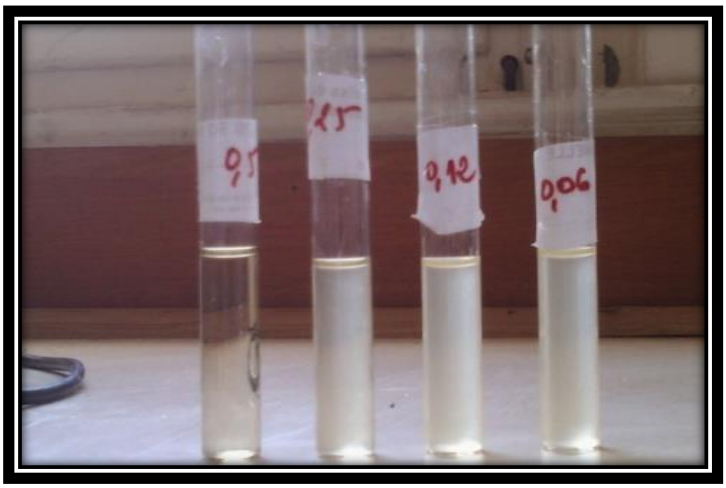


Figure 36: Photographie montrant la germination des spores des différents isolats d'aspect *Bacillus spp.*,révélée par le test d'acétate de Na.

Tableau 11 : Résultats du test d'acétate de Na (milieu d'isolement de *Bacillus thuringiensis*).

Concentration finale des milieux de culture en Acétate de Na (M)				**Nombre de colonies (Nt=48)**
0,06	**0,12**	**0,25**	**0,5**	
+	**+**	**+**	**+**	**18**
+	**+**	**+**	**-**	**20**
+	**+**	**-**	**-**	**10**
+	**-**	**-**	**-**	**0**
-	**-**	**-**	**-**	**0**

Croissance (+), absence de croissance (-) après incubation pendant 24h à 30°C.

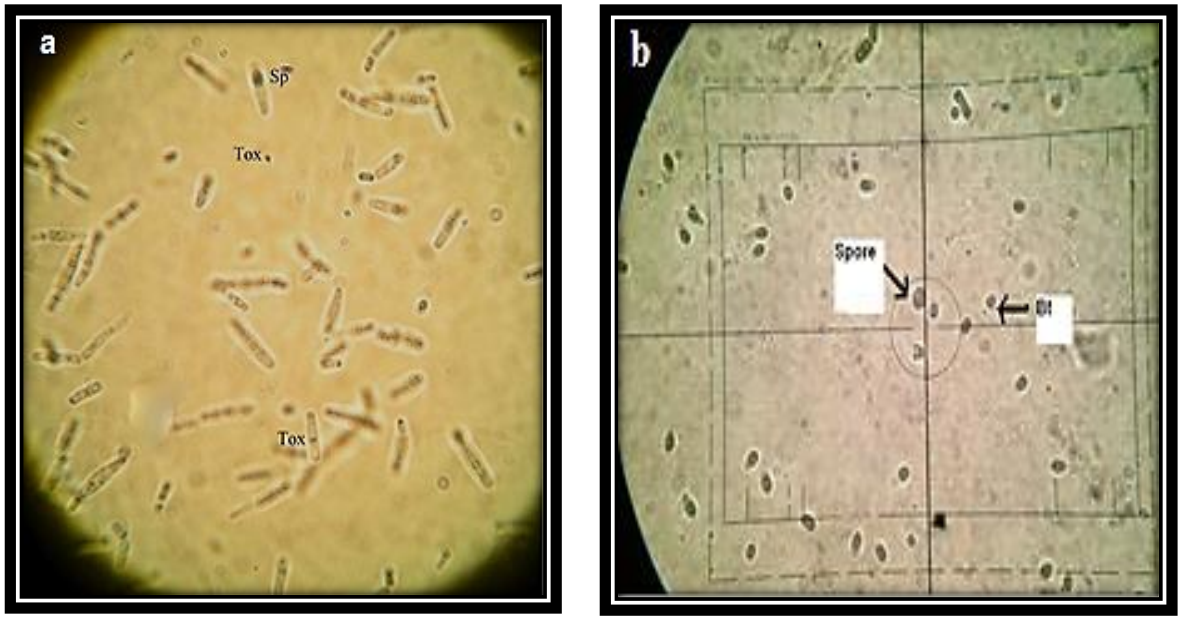


Figure 37: Observation d'une souche de *Bacillus thuringiensis (***Bt)** au microscope photonique simple **(a)** et à contraste de phase **(b)** GX100 à l'état frais et sans coloration. **Sp**: Spore, **Tox**: Toxine ou cristal.

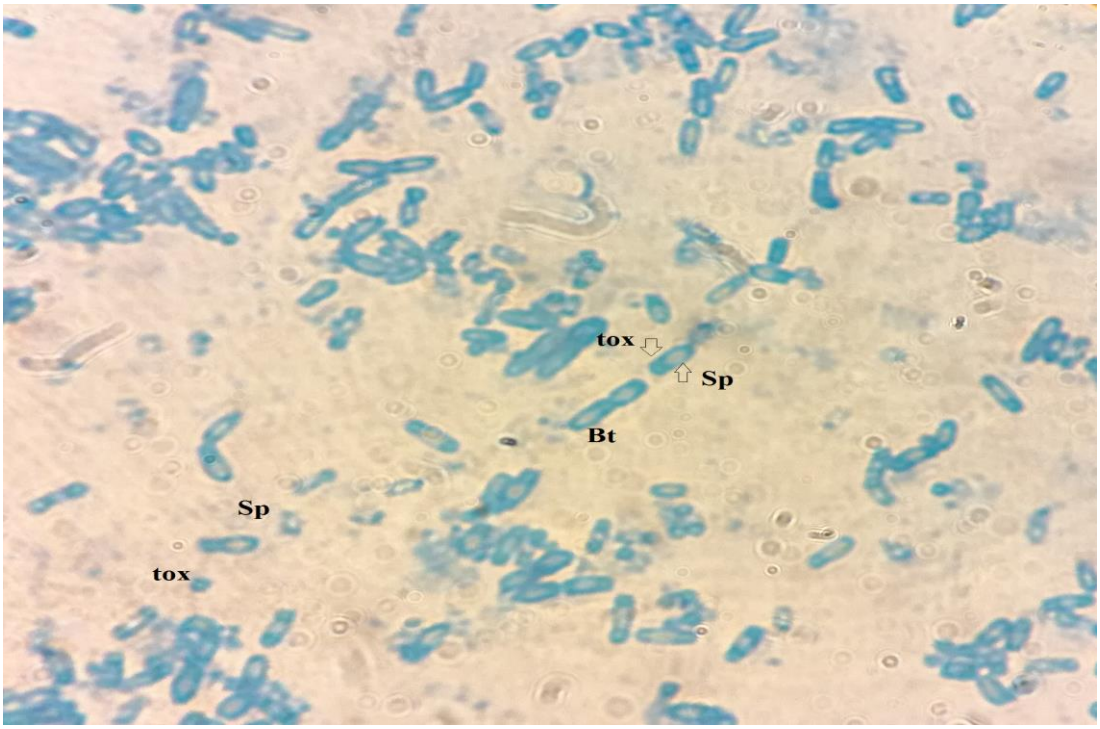


Figure 38: Observation d'une souche de *Bacillus thuringiensis* (**Bt),** en forme caractéristique en chainette colorée au bleu brillant de Coomassie, au microscope photonique à contraste de phase. **Sp**: Spore réfringente en blanc, **Tox**: Toxine ou cristal colorée en bleu.

- **Coloration Gram**

Toutes les souches testées sont Gram positive (voir Figure 39) les résultats sont représentés dans le tableau 15.

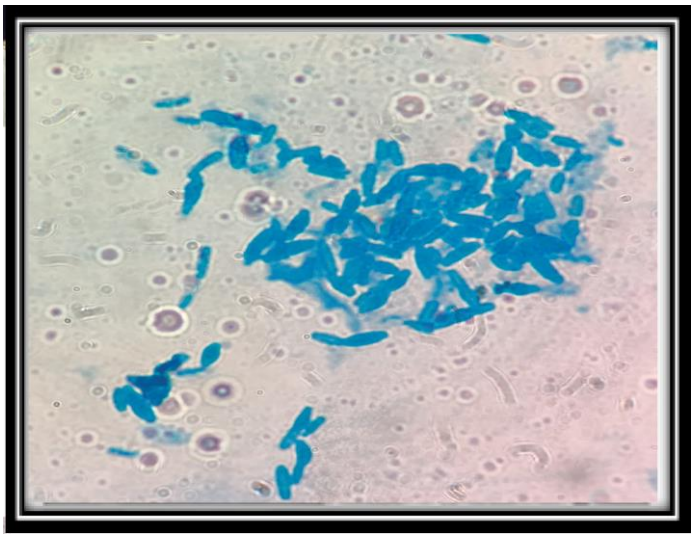


Figure 39: Observation de la forme végétative de *Bacillus spp.* après coloration de Gram; (Gram + : couleur bleue) au microscope photonique (GX100).

- **Coloration de la spore au vert Malachite**

Dans la figure 40, on voit bien la présence de la spore colorée en vert. La cellule végétative colorée en rose.

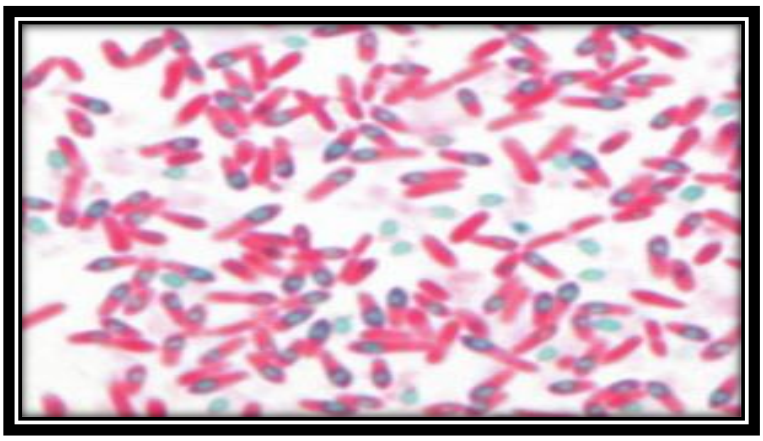


Figure 40 : Observation de la spore colorée en vert et les cellules végétatives en rose au microscope photonique (GX100).

b) Observation par microscopie électronique

La détermination exacte de la forme de la toxine n'a été possible que sous observation au microscope électronique à balayage (MEB). En effet, les dix souches de *Bacillus spp* possédant une inclusion parasporale révèlent un ou plusieurs toxines bien visibles (Figure 41). Les souches avec inclusions parasporales sont reconnues *B. thuringiensis* et désignées par 'S' dans une série commençant par le numéro 1.

Description de la protéine cristalline ou cristal:

- Bipyramidale chez 4 souches (S1, S4, S7, S8).
- Sphérique chez 4 souches (S2, S3, S5, S9).
- Cubique chez 2 souches (S6, S10).

Les formes de la protéine cristalline les plus répondues retrouvées dans notre étude sont la forme bipyramidale et sphérique. A noter que les formes des protéines cristallines des souches de référence *B.thuringiensis var berliner* 1715 et *B.thuringiensis var berliner* 1915, sont cubique et sphérique respectivement.

1.3. Répartition géographique des souches de *Bacillus spp.*et de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol Algérien et calcul du Bt index

Après l'isolement, la présélection macroscopique des colonies et l'observation microscopique ont permis d'isoler 48 souches différentes de type *Bacillus spp.* L'observation au microscope photonique à contraste de phase (GX100) après coloration au Bleu de Coomassie Brillant nous a permis de sélectionner une dizaine de souches de type *Bacillus spp* où le cristal parasporal apparait très clairement. Leur répartition géographique est représentée sur les tableaux 12 et 13.

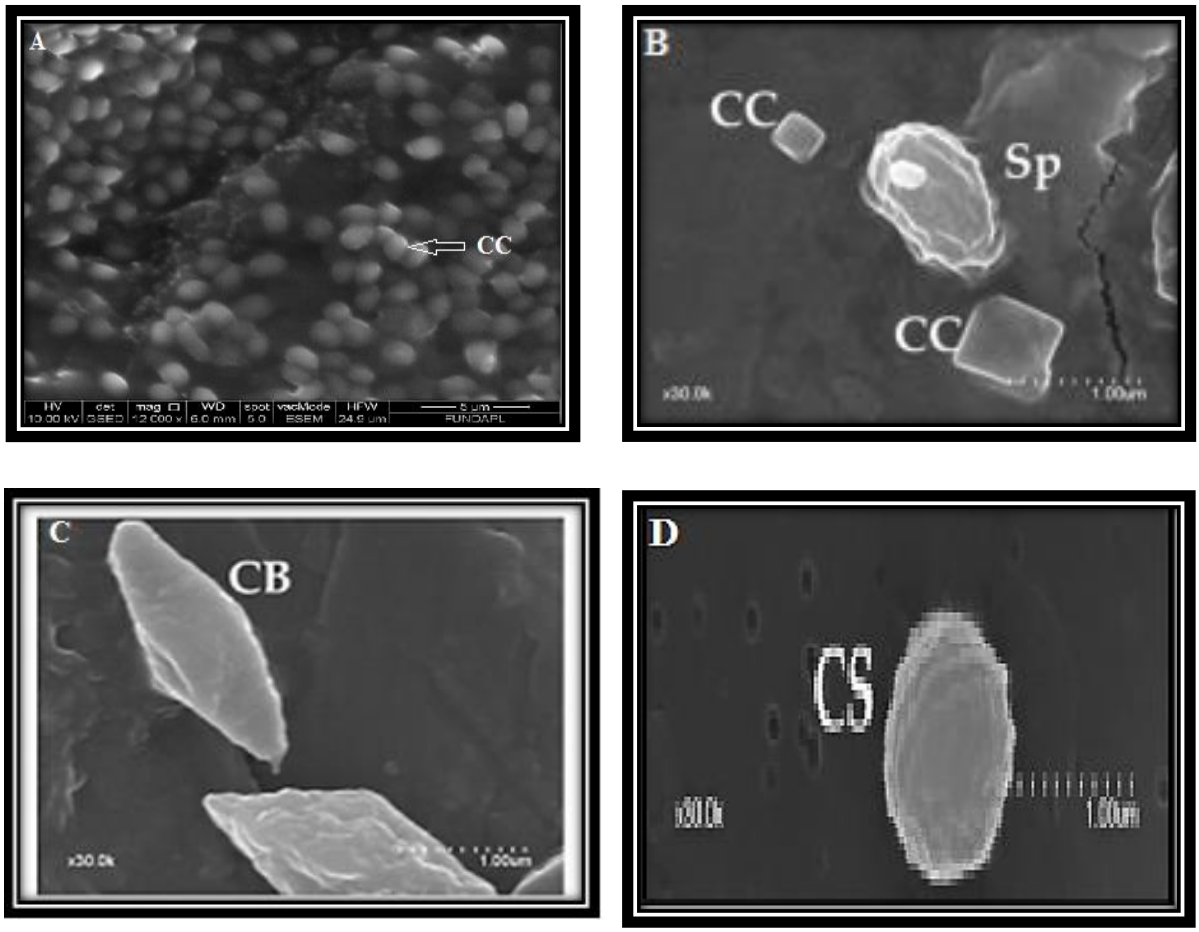


Figure 41 : Photographies d'isolats de *B.thuringiensis* montrant certaines formes d'inclusion parasporales observées au MEB (GX12000), en **A:** cristaux cubiques attachés caractéristiques d'un isolat *Bt, en* **B, C et D** (**CC** : cubique, **CB**: bipyramidal, **CS**: sphérique**), Sp**: spore, **C**: cristal.

Tableau 12: Répartition géographique des souches de *B.spp.* et de *B.thuringiensis* isolées du sol Algérien.

N°	Situation géographique	Wilaya	Sol de prélèvement	Bacillus spp.	Nombre de Bt*
01	Sud	Adrar	Sol non rhizosphérique de Regane	04	00
02			Sol rhizosphérique de Timimoune	05	00
03	Nord	Alger	Sol rhizosphérique de Douéra	04	03
04	Sud	Bechar	Sol rhizosphérique de Kerzaz	03	01
05	Nord	Bejaïa	Sol rhizosphérique de sidi aich	02	01
06	Nord	Biskra	Sol rhizosphérique de Biskra	10	01
07	Sud	El-Menia	Sol rhizosphérique d'El-Goléa	5	00
08	Nord	Sidi-Bel-Abbès	Sédiment du lac de sidi mohamedbenali (Ain trid)	01	01
09	Nord		Sol rhizosphérique	5	01
10	Sud	Tamanrasset	Sol non rhizosphérique de l'Iniker	1	00
11	Nord	Tiziouzou	Sol rhizosphérique de Beniyenni	6	01
12	Nord	Boumerdes	Sol rhizosphérique de Corso	02	01
				N=48	**N=10**

*Bt : *Bacillus thuringiensis* Sud Nord

Tableau 13: Répartition géographique (Nord/Sud) des souches de *Bacillus spp*. isolées du sol Algérien.

	Nord (X=7)	Sud (X=5)	Total(X=12)
Bt	**09**	**01**	**10**
Autres	**20**	**18**	**38**
Total	**29**	**19**	**48**

On peut conclure que sur les 48 souches de *Bacillus spp.* isolées:

- 29 souches ont été isolées du Nord dont 9 sont des souches de type Bt.
- 19 souches ont été isolées du Sud dont une souche seulement est une souche de type Bt.

Un total de 10 souches de *Bacillus thuringiensis* sur 48 de *Bacillus spp.* ont été isolées des sols rhizosphériques Algérien, nous donnant ainsi un *Bt* index global de 0.20. A noter que le

Bt index global represente un rapport entre le nombre de souches de *Bacillus* ayant un corps parasporal /*Bacillus spp.*

Le Bt index global trouvé dans notre étude est beaucoup plus faible en comparaison avec celui trouvé par **Djenane *et al.*, (2017)**, qui ont trouvé un Bt index global dans les sols rhizopheriques du territoire Algérien de 0.48. Cette difference est surement due au nombre très important d'échantillons traités (54 échantillons) avec 157 isolats de Bt. Par ailleurs, un Bt index < 0.18 a été trouvé dans d'autres travaux anterieurs pour d'autres pays tels qu'en Espagne **(Bel *et al.*, 1997)**; aux USA (**De Lucca *et al.*, 1981)** ; en Chine **(Wang *et al.*, 2003)** et en Iran **(Seifinejad *et al.*, 2008)**.

En ce qui concerne le Bt index calculé en fonction de la répartition géographique (Nord /Sud) (voir Tableau 14), il est de 0.31 dans la partie nord de l'algérie qui regroupe aussi bien la zone méditéranéene que semi-aride, alors qu'il est très faible dans la zone sud ou saharienne (aride). Ceci est due surement à la difference de la composition du sol qui est plus riche en nutriments et sels minéraux rendant le milieu plus propice à la présence d'une flore bactérienne plus diversifiée.

Tableau 14: Bt index en fonction de la zone géographique

	Nord	Sud	Global
Bt index	**0.31**	**0.05**	**0.208**

On peut conclure, d'après nos présents résultats et ceux trouvés par **Djenane *et al.*, (2017)** que le sol Algérien est un bon reservoir de *Bacillus thuringiensis*.

1.4. Identification bactériologique des souches sélectionnées

1.4.1. Caractérisation biochimique

L'analyse des résultats a montré que toutes les souches étaient aérobie-anaérobie facultatives, mobile et catalase positive (voir Tableau 15).

Les résultats des tests biochimiques des dix souches sélectionnées confirment bien les caractéristiques générales des souches *Bt* mentionnés par certains auteurs **(Logan *et al.*, 1984; Logan *et al.*, 1985; Logan, 2005)**. Toutes les souches étaient **négatives** pour l-arabinose, d-xylose, galactose, sorbitol, rhamnose, dulcitol, inositol, lactose, inuline, raffinose, β-

galactosidase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, thiosulfate de sodium, urée, et l'indole et **positive**s pour le D-ribose, le D-glucose, le D-fructose, D-maltose, tréhalose, ésculine, amidon, arginine dihydrolase, gélatine, citrate, et la production d'acétone (voir résultats en détail en (Annexe 3).

Les profils biochimiques (métaboliques) ainsi obtenus ont été comparés à l'aide de logiciel API WEB ce qui a permis de confirmer l'appartenance de nos souches au groupe de *B. cereus*.

1.4.2. Biotypage de *Bacillus thuringiensis*

Le résultat du biotypage biochimique confirme l'appartenance des 10 souches à seulement quatre biotypes différents: *thuringiensis*, *sotto*, *kurstaki* et *dendrolimus* (Tableau 16), parmi les seize déterminés par **(Martin & Travers, 1989)**. Le plus abondant étant *dendrolimus (S2, S6, S8, S9)* suivi *par le biotype thuringiensis (S1, S3, S7), Sotto (S4*) et enfin *Kurstaki :(S5, S10).*

Ces résultats sont en accord avec ceux proposés par les mêmes auteurs qui trouvèrent que *dendrolimus* était le biotype le plus abondant en Afrique, alors que *thuringiensis* était par contre le plus abondant dans le sol Iranien **(Moazamian *et al.*, 2018).**

- **Test d'hydrolyse de la lécithine**

Sur les 10 souches de *Bacillus* testées, 10 présentent une lécithinase positive avec apparition d'un halo blanc bien visible (Figure 42).

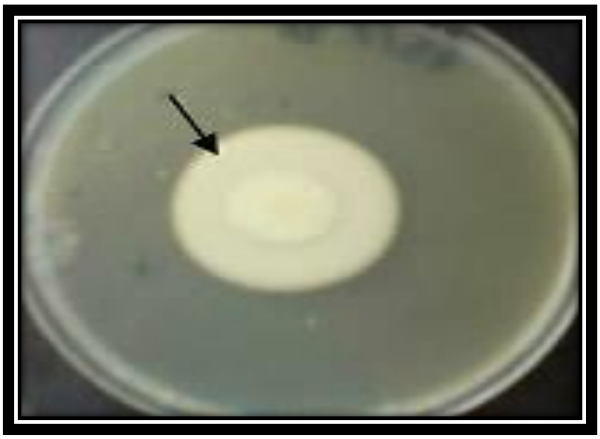


Figure 42: Activité positive de la lécithinase sur gélose au jaune d'œuf (halo opaque).

Tableau 15: Caractères phénotypiques et biochimiques des souches isolées et de références.

Nom	Forme	Gram	Endospore	position	déformante	Forme du cristal	Mobilité	Catalase	Type respiratoire
S1	Bacille	+	+	ST	ND	Bip	+	+	AAF
S2	Bacille	+	+	ST	ND	Sp	+	+	AAF
S3	Bacille	+	+	ST	ND	Sp	+	+	AAF
S4	Bacille	+	+	ST	ND	Bip	+	+	AAF
S5	Bacille	+	+	ST	ND	Sp	+	+	AAF
S6	Bacille	+	+	ST	ND	C	+	+	AAF
S7	Bacille	+	+	ST	ND	Bip	+	+	AAF
S8	Bacille	+	+	ST	ND	Bip	+	+	AAF
S9	Bacille	+	+	ST	ND	Sp	+	+	AAF
S10	Bacille	+	+	ST	ND	C	+	+	AAF
B.thuringiensis var berliner 1715	Bacille	+	+	ST	ND	C	+	+	AAF
B.thuringiensis var berliner 1915	Bacille	+	+	ST	ND	Sp	+	+	AAF

ST: Sub-terminale, **ND**: Non déformante, **Sp**: Sphérique**, Bip**: Bipyramidale, **C**: Cubique, **AAF**: aerobie-anaerobie facultatif, **+** : caractère positif, - : caractère négatif ; souches de référence :

Tableau 16 : Résultats du biotypage de *Bacillus thuringiensis.*

Souche	Esculine	Salicine	Lécithines	Sucrose	Biotype
S1	+	+	+	+	***Thuringiensis***
S2	+	-	+	-	***Dendrolimus***
S3	+	+	+	+	***Thuringiensis***
S4	+	-	+	+	***Sotto***
S5	+	+	+	-	***Kurstaki***
S6	+	-	+	-	***Dendrolimus***
S7	+	+	+	+	***Thuringiensis***
S8	+	-	+	-	***Dendrolimus***
S9	+	-	+	-	***Dendrolimus***
S10	+	+	+	-	***Kurstaki***

(+):positif, (-):négatif

1.4.3. Capacité d'hémolyse

1.4.3.1. Capacité d'hémolyse des souches sélectionnées

Bien qu'il fasse partie des caractères biochimiques permettant d'identification les souches de *Bacillus*. Le pouvoir hémolytique est d'un grand apport pour l'investigation de l'activité anti-cellulaire en particulier pour les souches de *Bt*. Les résultats de l'activité hémolytiques des 10 souches de *Bt* isolées sont rapportés dans le tableau 17 et figure 43.

En effet :

- 8/10 souches de *Bt* testées sont soit α ou β-hémolytiques (S1/ S3/ S4/ S5/ S6/ S8/ S9/ S10).
- 2/10 souches de *Bt* testées ne sont pas hémolytiques soit S2 et S7.

Il a été prouvé que dans la nature, les souches non insecticides de *Bt* sont plus largement répandues que les souches insecticides qui sont en général hémolytiques **(Mizuki *et al.*, 2000).**

En **2009, Ohba *et al.*,** ont été les premiers à s'intéresser à ces souches de *Bt* ne présentant pas un pouvoir hémolytique et hébergeant un cristal parasporal sans action entomopathogène. Ils ont pu établir par leurs études que ces souches de *Bt* non hémolytiques et non entomopathogène trouvent finalement leur application dans l'activité anti-tumorale avec un

haut pouvoir cytotoxique envers des cellules cancéreuses. Ils ont démontré que ce pouvoir est à l'origine d'une nouvelle catégorie de protéines dites Parasporines.

Figure 43: Activités hémolytiques des souches isolées sur les érythrocytes humains : **(a)** Hémolyse β, **(b)** Hémolyse α, **(c)** Non hémolytique.

Tableau 17: Résultats de l'activité hémolytique des souches.

Isolat de sol	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	*Bt* serovar berliner 1715	*Bt* serovar berliner 1915 (DSM 350)
Hemolyse sur les erythrocytes hu ains	+++	-	+	++	++	+++	-	+++	+	++	+++	+++

+++ (Hémolyse β); ++ (hémolyse β moderée) ; +(hémolyse α); - (non hemolytique)

1.4.3.2. Activité hémolytique des protéines purifiées et activées

Dans notre travail, on constate que parmi les protéines solubilisées et activées qui ont été testées, deux d'entre elles seulement produites par les souches S2 et S7 n'ont pas montrées une activité hémolytique (absorption ≥ 0,2), alors que les autres ont présenté une hémolyse plus ou moins importante (1>Absorption ≥0.2) (voir Tableau 18).

Ce résultat est très important dans notre étude puisque l'absence d'activité hémolytique est un critère primordial pour le choix de la souche d'intérêt recherché.

Dans cette étude, seules deux souches S2 et S7 remplissent ce critère.

Tableau 18: Résultats du test de l'activité hémolytiques des protéines parasporales purifiées.

Isolat de sol	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**	**S6**	**S7**	**S8**	**S9**	**S10**	***Bt* serovar berliner 1715**	***Bt* serovar berliner 1915 (DSM 350)**
DO (540nm)	**1.08**	**0.23**	**0.30**	**0.89**	**0.87**	**0.92**	**0.20**	**0.85**	**0.41**	**0.55**	**0.87**	**0.76**

(+++>DO=1.00 (hemolytique); ++ moderée (0.5-1.00); +faible (0.2-0.5);- (non hemolytique) ≥0.2) **(Mizuki & Ohba, 1999).**

D'après le travail de **Moazamian *et al.*, (2018),** les isolats non hémolytiques testés étaient généralement de biotypes : *thuringiensis, kurstaki, dendrolimus et sotto.* Ce travail est en accord avec nos résultats (**Section 1.4.2** de ce chapitre) puisque nos souches d'intérêts S2 et S7 sont de biotypes d*endrolimus et thuringiensis* respectivement (voir Tableau 16).

1.4.4. Résistance aux antibiotiques

Afin d'étudier la capacité des souches sélectionnées à résister à différentes familles d'antibiotiques, les rayons des halos d'inhibition ont été mesurés et les résultats sont donnés dans le tableau 19. Suivant les recommandations données par l'**EUCAST (2018)** (Annexe 4), on remarque que les 10 souches sont pratiquement toutes sensibles à presque tous les antibiotiques à part l'ampicilline et la pénicilline G (famille des bêta-lactamines) et à la ceftriaxone (famille des céphalosporines).

D'après les travaux antérieurs **(Logan *et al.*, 1984; Logan *et al.*, 1985)**, *Bacillus thuringiensis* est sensible à presque tous les antibiotiques à part l'ampicilline. Ce test vient confirmer encore une fois l'identification de nos souches isolées.

1.4.5. Activité antibactérienne

L'antagonisme antibactérien vis-à-vis de cinq germes pathogènes est évalué par les mesures des rayons d'inhibition illustrées dans le tableau 20. En effet, l'intensité de l'activité est proportionnelle à la valeur du rayon d'inhibition mesuré. Dans notre étude les 10 souches présentent une activité antibactérienne plus ou moins variable vis-à-vis des 5 souches testées. En effet, on remarque que *Micrococcus sp* est le germe le plus sensible vis-à-vis de ces souches, contrairement à *E.coli* qui est la plus résistante par rapport aux autres germes testés

(Figure 44). L'antagonisme vis-à-vis des autres germes pathogènes testés est plus ou moins moyen et variable. Ceci vient encore confirmer l'appartenance de ces dernières à l'espèce *Bt*, car ce résultat est en accord avec ceux de **(Mora *et al.*, 2015; Djenane *et al.*, 2017)**. Leur travaux ont révélés que l'activité antibactérienne est importante chez *B. amyloliquefasiens* et *B. subtilis* et non chez *B. thuringiensis.*

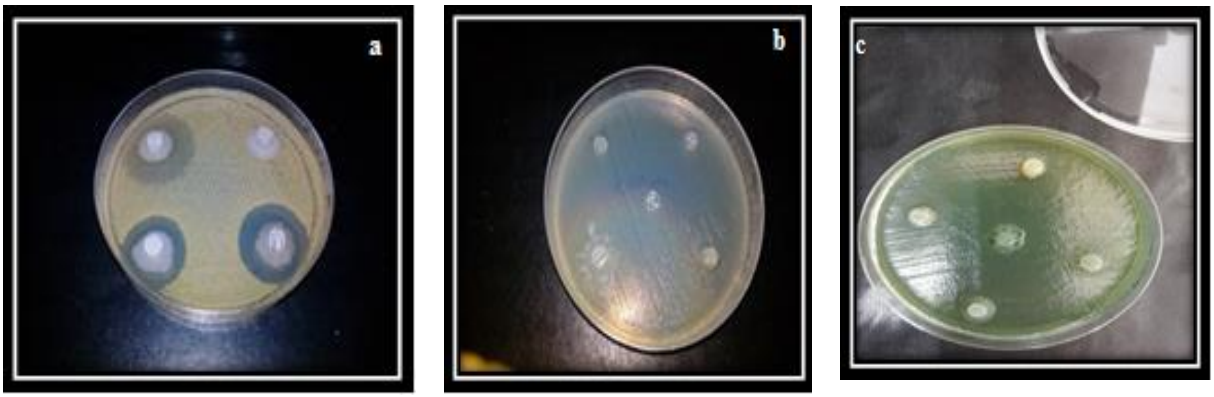


Figure 44 : Photographies montrant l'activité anti- bactériennes des souches sélectionnées vis-à-vis de germes pathogènes **(a) *Micrococcusluteus* ATCC, (b) *Escherichia coli* ATCC, (c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.**

Tableau 19: Sensibilité aux antibiotiques des 10 souches de *Bacillus spp.* selon les diamètres des zones d'inhibition d'après les recommandations de l'**EUCAST, 2018**.

Famille des Antibiotiques	Aminosides				Béta-Lactamines			Phénicolés	Macrolides	Céphalosporine
⌀ (mm) (S)/(R)	Kanamycine	Gentamycine	Tobramycine	Streptomycine	Cefalexine	Penicilline G	Ampicilline	Chloramphenicole	Erythromycine	Ceftriaxone
S1	29 (S)	36 (S)	27 (S)	23 (S)	26 (S)	8 (R)	0 (R)	24 (S)	22 (S)	12 (R)
S2	28 (S)	28 (S)	24 (S)	24 (S)	9 (R)	10 (R)	0 (R)	23 (S)	26 (S)	0 (R)
S3	22.5 (S)	28 (S)	22 (S)	21.8 (S)	14 (S)	10 (R)	0 (R)	21.9 (S)	18 (R)	0 (R)
S4	22 (S)	27 (S)	20 (S)	21 (S)	9 (R)	0 (R)	0 (R)	26 (S)	26.5 (S)	0 (R)
S5	25 (S)	27 (S)	22 (S)	23 (S)	24 (S)	0 (R)	0 (R)	28 (S)	25 (S)	0 (R)
S6	22 (S)	27 (S)	21 (S)	22 (S)	27 (S)	9 (R)	0 (R)	14 (R)	20 (R)	0 (R)
S7	32 (S)	31 (S)	27 (S)	27 (S)	23 (S)	0 (R)	0 (R)	34 (S)	30 (S)	0 (R)
S8	22 (S)	25 (S)	18 (S)	22 (S)	21 (S)	11 (R)	0 (R)	20 (S)	18 (R)	0 (R)
S9	24 (S)	30 (S)	23 (S)	21 (S)	14 (S)	10 (R)	0 (R)	22 (S)	19 (R)	0 (R)
S10	28 (S)	29 (S)	26 (S)	27 (S)	11 (R)	0 (R)	0 (R)	24 (S)	26 (S)	0 (R)

(R) résistante à l'antibiotique (Zone de résistance) ; (S) Sensible à l'antibiotique (formation d'une zone d'inhibition).

Tableau 20 : Activités anti- bactériennes des dix souches sélectionnées

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE SUR MILIEU MH*					
	Gram+			*Gram-*	
Souches	***SARM***	***SASM***	***M. luteus***	***E. coli***	***P. aeruginosa***
S1	+	+	+	-	-
S2	+/-	-	+	-	+/-
S3	+	+	-	-	++
S4	-	-	-	-	-
S5	+	-	+++	-	+
S6	-	-	+	-	+/-
S7	+	+	++	-	+
S8	-	-	++	+	++
S9	+	+	-	-	-
S10	+/-	-	+	-	-

(*)**Zone d'inhibition**: (-) absence d'inhibition ; (+/-) < 3 mm; (+) 3-5 mm; (++) 5-10 mm, (+++) > 10 mm.

1.4.6. Activité antifongique

L'analyse des résultats montre une grande variabilité dans le spectre d'activité des souches. Parmi les 10 souches testées, deux (S4 et S8) ne montrent aucune activité vis à vis des champignons testés. Les autres souches présentent une activité antagoniste contre au moins un champignon.

En effet, les souches S1 et S2 sont actives sur 3 champignons, la S6 sur deux champignons, les S3, S5, S7, S9 et S10 sur un seul champignon.

Les activités les plus importantes ont été observées avec la souche S1 qui inhibe significativement la croissance du mycélium de 3 champignons (*Aspergilus niger DSM 737, Monilia sp et Colletotricum sp)* (voir Tableau 21 et Figure 45).

Comme pour l'activité antibactérienne, des études antérieures ont montré que les isolats de *B. thuringiensis* étaient moins puissants, en terme d'activité antifongique, que les autres isolats de *Bacillus* des espèces telles que *B.amyloliquefaciens* et *B.subtilis* **(Djenane, 2012; Mora *et al*., 2015).**

Tableau 21 : Activité antifongique des dix souches sélectionnées.

ACTIVITE ANTI-FONGIQUE SUR MILIEU PDA (**)						
Souches	***Thielaviopsis sp***	***Aspergilusniger DSM 737***	***Moniliasp***	***Colletotricum sp***	***Aspergilus flavus***	***Fusarium oxysporum DSM62297T***
S1	-	+	++	++	-	-
S2	-	++	+	-	+	-
S3	-	+	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-
S5	-	-	-	-	-	+
S6	-	++	-	++	-	-
S7	-	+	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	-	-
S9	-	-	-	-	-	+
S10	-	-	-	++	-	-

(**)Le potentiel de l'activité antifongique (R) : (++) 0<**R**<0.6 ; (+) 0.61<**R**<0.85 ; (-) **R**>0.85.

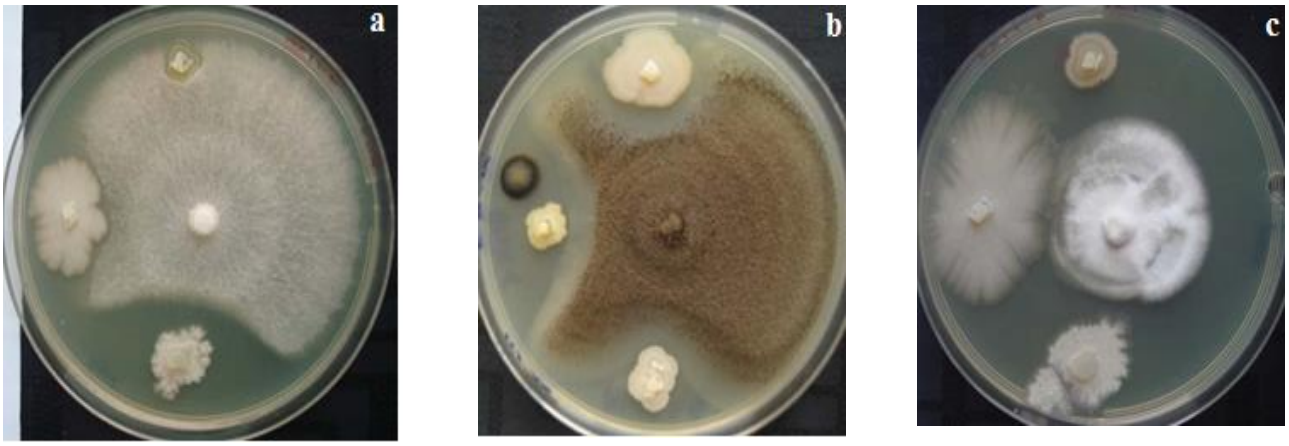


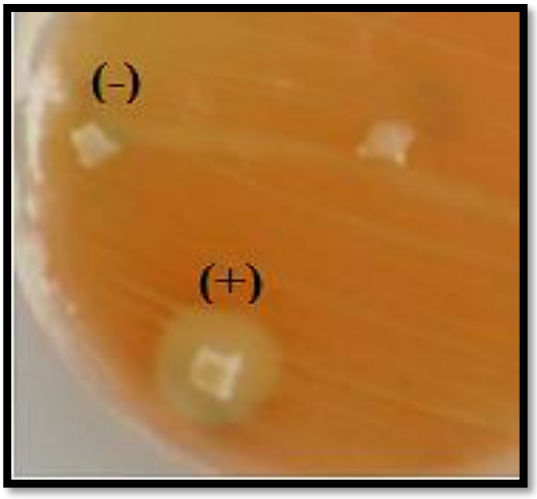
Figure 45 : Photographies montrant l'activité antifongique de quelques souches sélectionnées, en (**a**) *Fusarium sp*, en (**b**) *Aspergilus niger* et en (**c**) *Colletotricum sp*.

1.4.7. Activité anti-archaebactérie

De nombreuses protéines des archaebactéries impliquées dans les procédés de transfert de l'information cellulaire, la réplication de l'ADN, la transcription de l'ARN ou la traduction des protéines sont étroitement reliées à des homologues eucaryotes **(Ishino *et al.*, 2012).** Dans ce contexte vient l'idée d'évaluer l'antagonisme des souches de *Bacillus* vis-à-vis d'une archaebactérie. En effet, l'enjeu est de cribler des molécules pouvant constituer une ébauche à l'activité anti-tumorale. Dans cette directive, nous avons essayé d'ébaucher une éventualité anti-tumorale par l'étude de l'antagonisme chez 10 souches de *Bacillus thuringiensis* séléctionnées vis-à-vis de *Natronococcus sp* (Tableau 22 & Figure 46). Nous remarquons que la plupart de nos souches sont dotées d'une activité anti-archaeactérie. Ce qui est très prometteur pour notre recherche.

Tableau 22 : Activité anti-archaebactérie

Souche	Anti-Arch*
S1	+2
S2	+1
S3	+
S4	+
S5	+
S6	+3
S7	+
S8	-
S9	+
S10	+2



(*) (-) activité absente ;(+) faible activité ; (+2) forte activité ; (+3) très forte activité

Figure 46 : Photographie montrant l'activité anti-archaebactérie des souches S8 (-) et S9(+).

Le chiffre avant le plus (+) indique l'intensité de l'activité en question : (+) : Faible activité, (2+) : Activité moyenne, (3+) : activité importante.

2. Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées

2.1. Identification génétique par la *16S* rRNA des souches sélectionnées

L'analyse PCR nous montre bien l'apparition d'une seule bande bien spécifique de taille identique à la taille attendue d'environ ~ 1470pb (Figure 47). Ces analyses moléculaires à l'aide d'amorces universelles pour Eubactéries, S1-F/S2-R, qui permettent d'amplifier des fragments de tailles d'environ ~1.5 kpb appliquées sur les dix souches ont permis de compléter l'identification. Les résultats sont dits positifs lorsque les fragments-bandes obtenues par PCR sont similaires en taille et en intensité à celles attendues (~1.5 kpb).

Les 10 souches testées ont répondu positivement par l'amplification d'une bande d'un fragment d'environ 1.47 kbp ce qui permet de confirmer leur rattachement au groupe *Cereus*. Les dix fragments ont été purifiés, clonés et séquencés puis introduites dans la Genbank NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour une analyse par Blast (Basic local Alignement SearchTool) (voir Annexe 7)

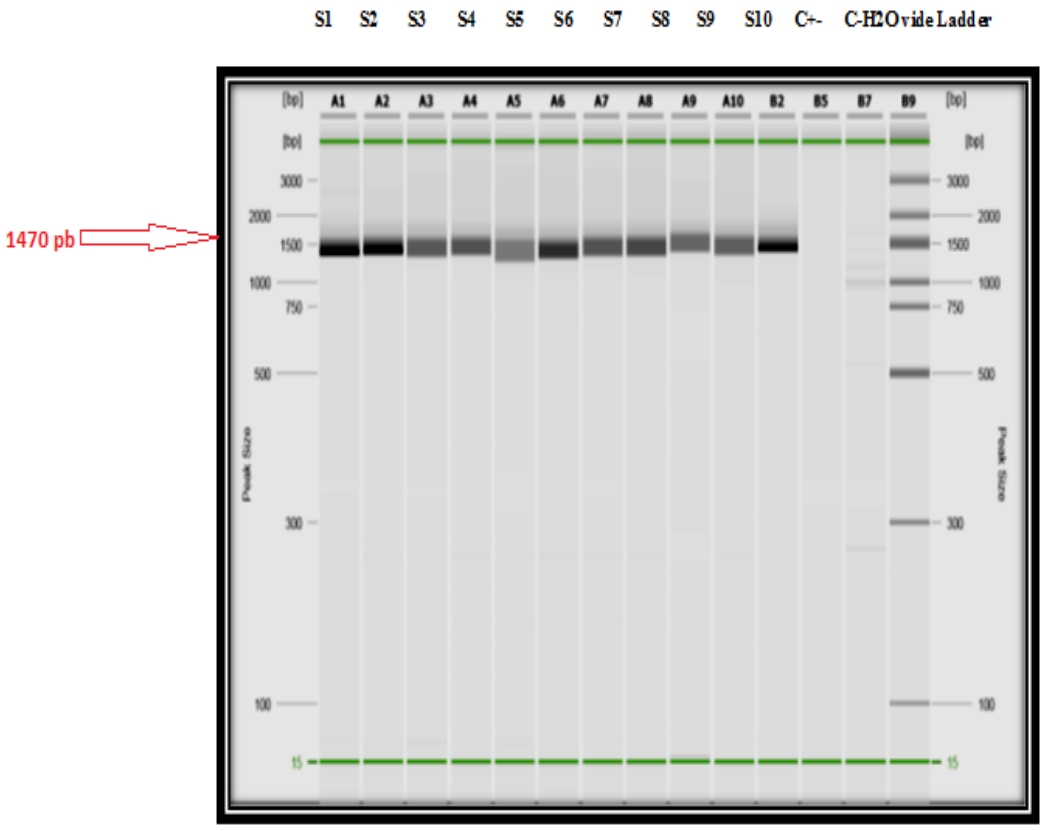


Figure 47 : Analyse PCR des dix souches sélectionnées.

2.1.1. Résultats des analyses Blast

Les contigs obtenus pour les 10 PCRs 16S-Complet des 10 souches ont été blastés sur les banques de données 16S-Archea et bactéries BlastN de NCBI et les résultats sont donnés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Identification *16 S* rRNA des dix souches sélectionnées.

Nom de la souche	Taille du fragment (pb)	% d'identité	Groupe de la souche	E-value
S1(BDzA)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S2 (*BDzB*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S3 (*BDzC*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S4 (*BDzD*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S5 (*BDzE*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S6 (*BDzF*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S7(*BDzG*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S8 (*BDzH*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S9 (*BDzI*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00
S10 (*BDzJ*)	1470	99%	*Bacillus cereus*	0.00

2. 2. Construction de l'arbre phylogénétique

Phylogénétiquement, *B.thuringiensis* est très proche de *B.cereus, B.anthracis, B.mycoides, B.pseudomycoides et B.weihenstephanensis*, desquels il ne se distingue que par la production, lors de la sporulation, d'un corps parasporal protéique à activité insecticide **(Helgason *et al.*, 2000; Chen & Tsen, 2002)**. Ce groupe d'organismes est aussi connu comme le complexe *Bacillus cereus*.

L'arbre phylogénétique a été construit par comparaison des alignements des séquences des 10 souches avec les séquences des 15 souches de références (9 souches de *B.thuringiensis*, 1 de *B.proteolyticus*, 1 de *B.albus*, 1 de *B.subtilis*, 1 de *B.licheniformis*, 1 de *B.paramycoides*, 1 de *Paenibacillus macerans*).

L'analyse phylogénétique a été assistée par l'étude de l'évolution moléculaire en utilisant le logiciel Genetics Analysis (MEGA 6) **(Tamura *et al.*, 2013)**. L'arbre phylogénétique a été construit grâce à la méthode neighbor- joining **(Lane *et al.*, 1991)** avec le modèle de

correction de distance de Tamura and Nei avec 1000 réplications bootstrap **(Tamura *et al.*, 1993).** Ce qui nous a permis de confirmer l'appartenance des souches isolées au groupe *Bt* (voir dendrogramme en Figure 48).

Les souches *BDzG* et *BDzB* sont très proches de *B.thuringiensis serovar thuringiensis strain* SEP-7(KF 228911) alors que la souche *BDzE* est proche de *B.thuringiensis serovar dendrolimus*, les souches *BDzD, BDzJ, BDzC, BDzF et BDzA* sont proches quant à elles de *B.thuringiensis str Al Hakam*, et enfin la souche *BDz I* est proche de *B.paramycoides.*

Les souches ont été enregistrées dans GenBank **(http://www.ncbi.nim.nih.gov)** et le numéro d'accession est donné dans le tableau 24. Les séquences nucléotidiques des 10 souches ont été présentées en (Annexe 7).

Tableau 24: Noms d'enregistrement et le numéro d'accession des souches sélectionnées dans GenBanK.

La souche	Souche enregistrées dans GenBank	Numéro d'accession (GenBank)
S1	*BDzA*	**MN203612**
S2	*BDzB*	**MN203613**
S3	*BDzC*	**MN203614**
S4	*BDzD*	**MN203615**
S5	*BDzE*	**MN203616**
S6	*BDzF*	**MN203617**
S7	*BDzG*	**MN203618**
S8	*BDzH*	**MN203619**
S9	*BDzI*	**MN203620**
S10	*BDzJ*	**MN203621**

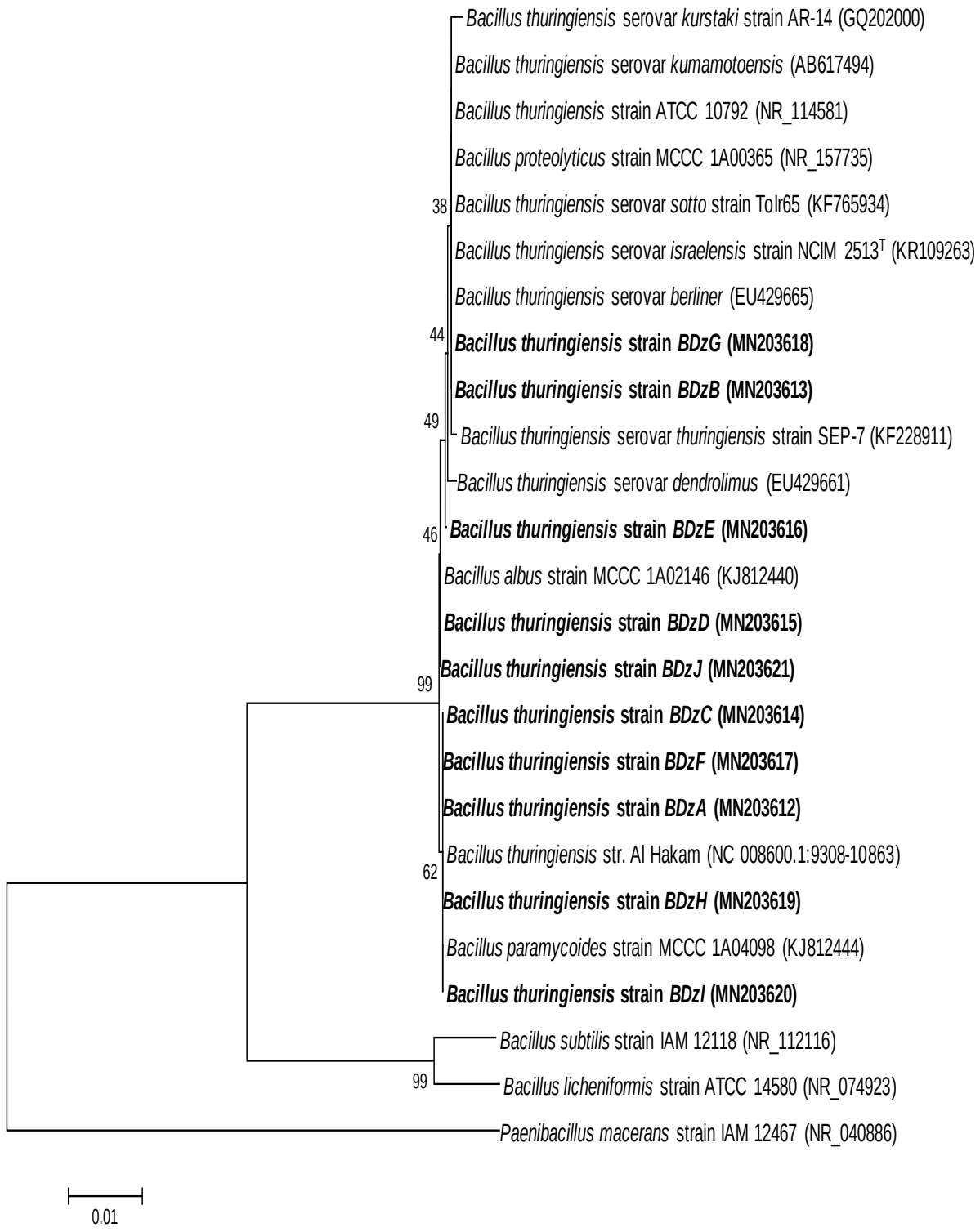


Figure 48: Arbre phylogénétique des dix souches de *Bacillus thuringiensis* sélectionnées **(Aberkane *et al.*, 2020).**

3. Extraction, solubilisation et purification de la protéine

3.1. Extraction et dosage de la protéine parasporale

La séparation en système bi-phasique proposé par **Rahbani *et al.*, (2014)** a permis de retrouver les spores hydrophobes, qui ont été piégées par l'hexane dans la couche supérieure. Les débris cellulaires sont restés dans la phase aqueuse alors que les cristaux se sont accumulés pour former le culot (Figure 49-A). Après récupération du culot (riche en protéine), on procède à plusieurs lavages à l'eau distillée stérile et froide (4°C) pour éliminer l'excès d'hexane qui pourrait altérer la protéine.

La pureté de l'extrait protéique est constatée par observation au microscope à phase inversé (GX100) après colorations au bleu de Coomassie G-250. Il a été observé la présence de seulement 2 % de spores. Des cristaux morphologiquement purs à 98 % ont ainsi été obtenus comme le montre la figure 49-B où ni débris cellulaires, ni spores ne sont observés. Seuls les cristaux colorés au bleu apparaissent. Ce procédé a été réalisé pour les dix souches.

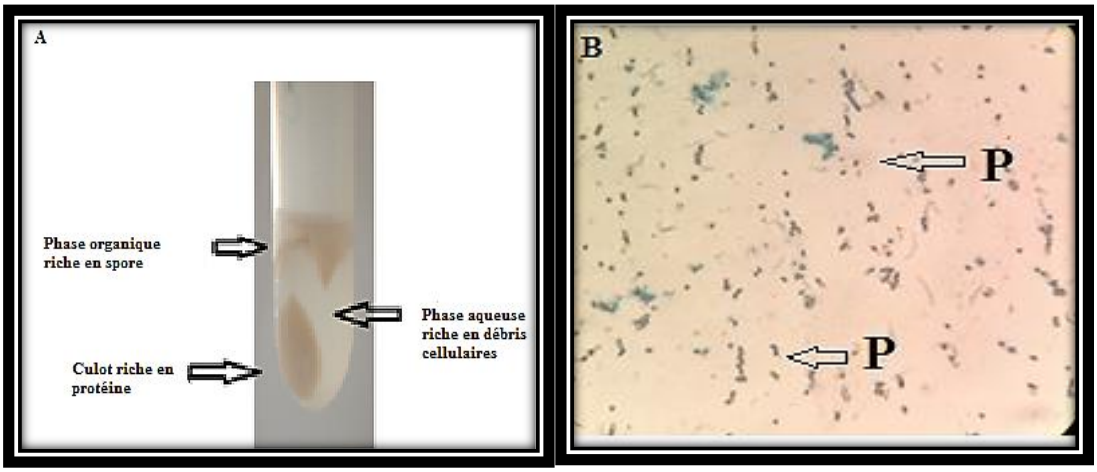


Figure 49 : Purification bi-phasique de la protéine parasporale (**A**), observation microscopique de la pureté de la protéine cristalline après séparation biphasique (**B**).**P** : protéine cristalline colorée au bleu brillant de Coomassie.

3.1.1. Rendement de récupération et estimation quantitative des protéines

Après séparation bi-phasique et séchage du culot de chaque souche, on obtient des cristaux purs sous forme de poudre blanche (Figure 50).

Une masse sèche de cristaux purs a été pesée et estimée pour chaque souche (Tableau 25), elle varie entre 18-48 mg pour 100 ml de milieu de culture.

La concentration des protéines cristallines obtenues après solubilisation du culot (dissolution dans une solution alcaline) est déterminée par la méthode de **Bradford, (1976)** en utilisant l'albumine du sérum bovin (BSA) comme standard (Figure 51).
Ces deux données nous ont permis de calculer le rendement de récupération (%) (Tableau 25) grâce à l'équation donnée dans la (**Section 2.4.1.1** du chapitre matériel & méthodes).

Figure 50: Photographie montrant les cristaux séchés.

D'après le tableau (25) on obtient avec les souches *BDzA, BDZF, BDzG et BDzH* un rendement de récupération >50%, qui est presque le double de ce que l'on obtient avec les souches *BDzB, BDzC et BDzE*. Ceci pourrait être dû à la forme du cristal, car les cristaux des souches *BDzA, BDzG et BDzH* sont de formes bipyramidales beaucoup plus volumineuses que celles des souches *BDzB, BDzC* et *BDzE* qui sont-elles de petites formes sphériques.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Rahbani, (2014),** dans lesquels la concentration en protéines de la toxine extraite de la souche "*Lip*" a été trois fois supérieure à celle obtenue par la souche "*H3*". Il a été suggéré que cette différence est dû au fait que les cristaux de "*Lip*" sont plus grands et ont une teneur plus élevée en protéines que les cristaux de "*H3*", ce qui pourrait expliquer le taux de récupération plus élevé de ces cristaux.

Tableau 25: Rendement de récupération des cristaux (%).

Souche	Forme du cristal	Vm (ml)	Masse sèche des cristaux (mg)	Masse des protéines dans le milieu de culture (g/l)	Rendement de récupération (%)
BDzA	Bip	100	44	0.70	**62.85**
BDzB	Sp	100	23	0.64	**40.62**
BDzC	Sp	100	22	0.58	**38**
BDzD	Bip	100	ND	ND	**ND**
BDzE	Sp	100	18	0.42	**42.85**
BDzF	C	100	20	0.33	**60.60**
BDzG	Bip	100	48	0.62	**77.41**
BDzH	Bip	100	40	0.56	**71.42**
BDzI	Sp	100	ND	ND	**ND**
BDzH	C	100	ND	ND	**ND**

ND : non déterminé, Forme du cristal : **Bip** : Bipyramidal, **Sp** : Sphérique, **C** : Cubique

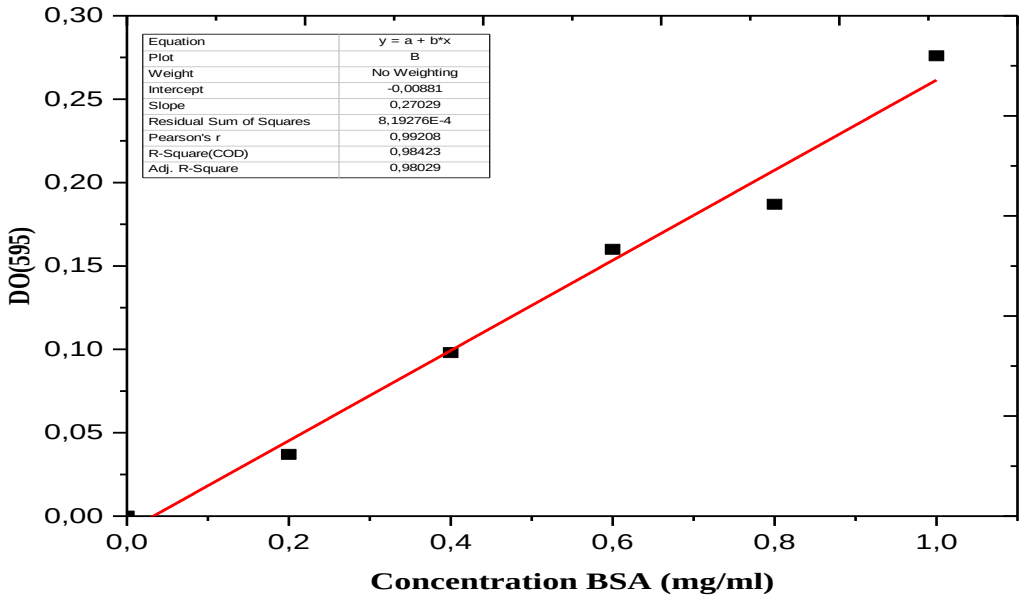


Figure 51: Courbe d'étalonnage des protéines déterminée par la méthode de **Bradford, (1976)**.

3.2. Estimation du poids moléculaire des protéines cristallines

La diversité des poids moléculaires des protéines (δ-endotoxines) observées lors de l'analyse SDS-PAGE, suggère que plusieurs de nos dix souches expriment les deux types de protéines. En effet, 3 souches (*BDzC* (S3), *BDzF* (S6) et *BDzH* (S8)) possèdent les deux types de protéines (Cry et Cyt), 5 souches (*BDzA* (S1), *BDzD* (S4), *BDzE* (S5), *BDzG* (S7) et *BDzJ* (S10)) possèdent seulement une protéine de type "Cry" et enfin, 2 souches (*BDzB* (S2) et *BDzI* (S9)) possèdent une protéine de type "Cyt".

D'après les travaux de**Muniady *et al*., (2011)** et **Mendoza-Almanza *et al*., (2020)** la présence de la "Cyt" protéine seule ou avec la "Cry" protéine confère à la souche dont elle est extraite un pouvoir porogéne et hémolytique**.**

Puisque le caractère non hémolytique est une condition *sin qua non* pour une éventuelle activité cytotoxique, nous avions choisi et sélectionné pour la suite de notre travail les souches *"*(*BDzB*) et (*BDzG*)" dont le poids moléculaire de leurs pro-protéines solubilisées est d'environ 37 kDa et 81 kDa respectivement (Figure 52).

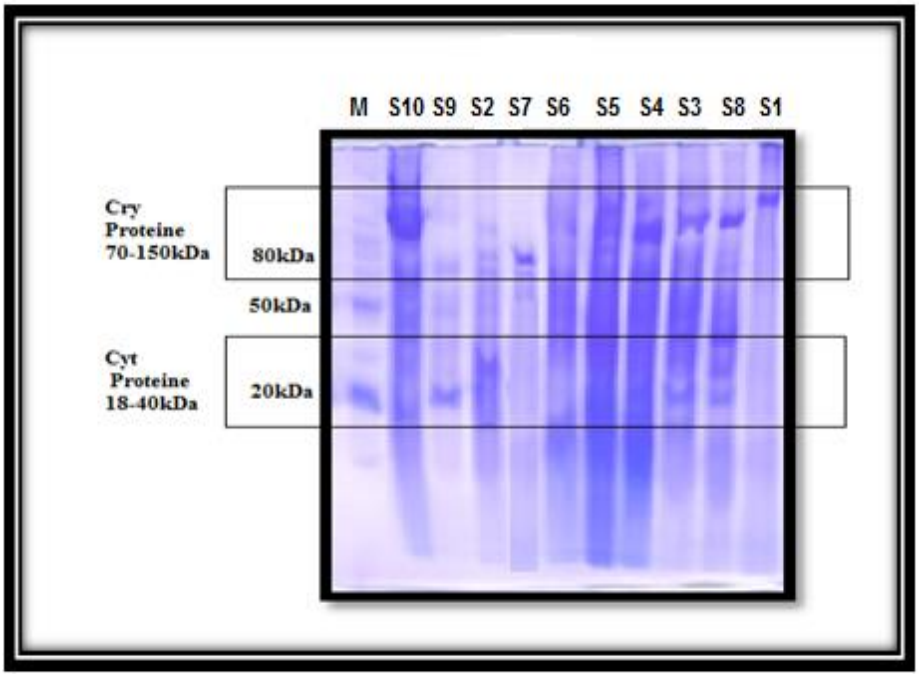


Figure 52 : Photographie de gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10% des protéines natives (50µg) des 10 isolats bactériens (S10-S1). **M**: Marqueur de protéines BenchMark™ Unstained Protein Ladder novex *life* technologies.

Constatant la similitude des poids moléculaires des deux pro-protéines avec des travaux antérieurs, on pourrait suggérer que :

►D'après les travaux de **Ito *et al*., (2004)** et **Brasseur *et al*., (2015),** la protéine d'environ 37 kDa pourrait être une pro-protéine de la parasporine2. Ce résultat pourrait suggérer que la *BDzB* pourrait être une souche productrice de parasporine2.

►D'après les travaux de **Mizuki *et al*., (2000); Katayama *et al*., (2005)** et **Aboul-Soud *et al*., (2019),** la protéine d'environ 81 kDa pourrait être une pro-protéine de la parasporine 1. Ce résultat pourrait suggérer que la *BDzG* pourrait être une souche productrice de PS1.

Afin de confirmer ces suggestions nous avions procédé à une activation des deux pro-protéines de 37 kDa et 81 kDa par la protéinase K et la trypsine respectivement. Une purification par chromatographie d'exclusion moléculaire a été ensuite réalisée.

3.3. Purification des protéines activées

81 fractions protéiques différentes pour chacune des deux souches sélectionnées ont été obtenues puis évaluées par dosage colorimétrique à l'aide du spectrophotomètre UV–visible à une longueur d'onde de 280 nm. Les poids moléculaires ont été calculés par extrapolation, grâce à la courbe étalon pré-établie V_e/V_0=f (Log PM) (Figure 53).

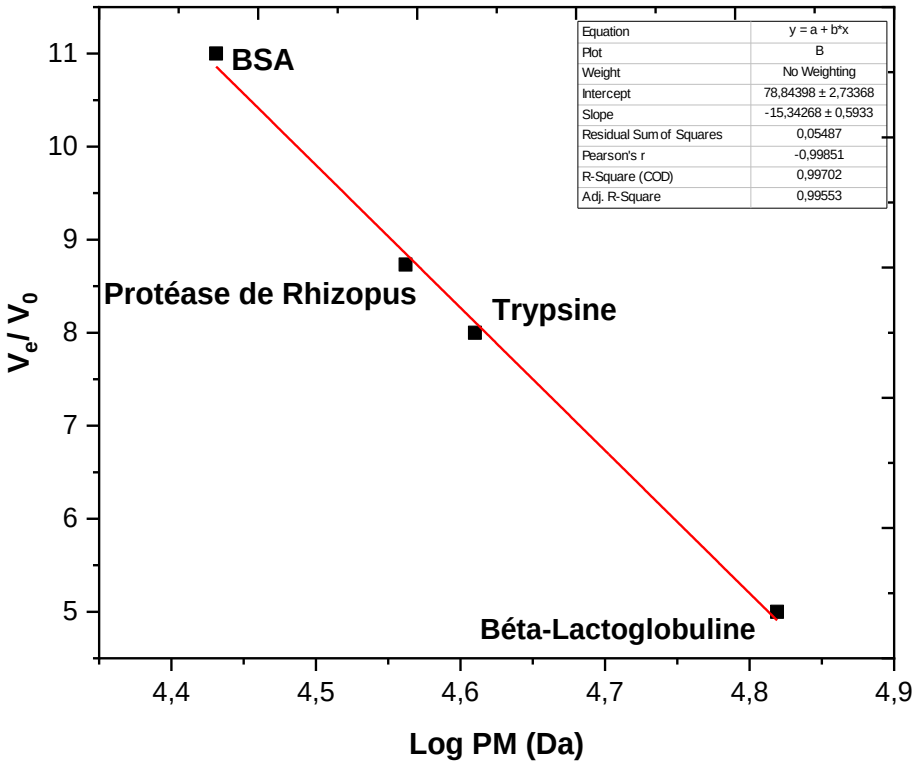


Figure 53: Droite de calibration de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephadex G-100 utilisant un mélange de plusieurs protéines standards éluées avec les mêmes conditions opératoires (BSA 66 kDa, protéase de *Rhizopus* 41 kDa, trypsine 27 kDa et β-lactoblobuline 18.36 kDa.

En ce qui concerne la souche *Bt* non hémolytique (*BDzB*), trois pics de poids moléculaires d'environ 20 kDa, 28.58 kDa et 37 kDa ont été obtenus (Figure 54).

Le peptide d'environ 20 kDa obtenu après activation ne correspond absolument pas à la taille de la toxine activée de la PS2 attendue qui est de 30 kDa **(Ito *et al.*, 2004; Brasseur *et al.*, 2015; Aboul-Soud *et al.*, 2019).**

Dans ce cas, il a été judicieux de confirmer ce résultat par une analyse PCR en recherchant la présence du gène codant pour cette protéine.

Le pic de 28.58 kDa est celui de la protéinase K pure utilisée lors de la protéolyse.

Après trypsination de la pro-protéine d'environ 81 kDa (souche *BDzG*); nous avions obtenus plusieurs pics correspondant à des peptides de divers poids moléculaires allant de 18 à 58 kDa

(Figure 55). Le pic correspondant au poids moléculaire de 27 kDa est celui de la trypsine utilisée lors de l'activation.

Suite à ces résultats nous pouvant émettre l'hypothèse qu'il pourrait bien s'agir d'une parasporine 1 vue la grande similitude des poids moléculaires obtenus après activation protéolytique de la proprotéine –*BDzG* de 81 kDa. En effet, on retrouve bien la protéine active de 58 kDa et une autre de 18 kDa très proches du poids moléculaire des protéines actives (56 kDa+15 kDa) de la parasporine1 des travaux antérieurs de **Mizuki *et al*., (2000).**

En ce qui concerne le peptide de 18 kDa, on peut émettre deux hypothèses, soit :

►Le dernier petit pic qui apparait dans le cas de la protéine-*BDzG* activée semblerai être celui du peptide de 18 kDa, qui a pu être suite aux traitements subis lors des différentes étapes de purification se dissocier de la protéine de 58 kDa.

►Le peptide de 18 kDa est toujours fixé à la protéine de 58 kDa ce qui expliquerait la forme un peu déformée du pic de 58 kDa, et que le petit pic n'est qu'un résidu de la trypsination; c'est l'hypothèse la plus probable. Car d'après les travaux de **Katayama *et al*., (2005),** le dimère actif composé de (56+15kDa) est très difficile à séparer dans des conditions ordinaires par la chromatographie, même en présence d'un détergent ou d'un agent dénaturant [1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) CHAPS, 0,1% (v/v) CHAPSO, 1% (p/v) octyl glucoside ou 8 M urée]. Seul un traitement SDS à 0,1 % (p/v) par la chaleur a permis de dissocier les fragments même sous conditions dénaturantes (c'est le cas de l'analyse par électrophorèse où le peptide de 18 kDa (notre étude) apparait très clairement (Figure 57).

Ces résultats suggèrent que les fragments de 18 et 58 kDa forment un complexe serré et sont en accord avec les résultats de **Kuroda *et al*., (2013)** où ils démontrèrent que la cytotoxicité des deux polypeptides de 15 et 60 kDa (PS1Ac2-*B0462)* envers les cellules Héla n'est obtenue que s'ils étaient administrés ensemble donc sous forme de dimère. Ils s'ajoutèrent que le polypeptide de 15 kDa de la protéine cristalline PS1Ac2 activée de la souche B0462 n'était pas apparent lors de la séparation par chromatographie et suggérèrent que la plupart des polypeptides de 15 kDa peuvent être dégradés, et/ou peuvent devenir des fragments plus courts sous l'action des protéases.

Il est à noter que récemment les travaux d'**Akiba *et al*., (2017)**, ont démontrés que la structure tridimensionnelle de la parasporine1 recombinante analysée par diffraction des cristaux aux rayons X, est composée de protéines de 15 et 56 kDa à un rapport moléculaire de 1:1 dans

l'hétéro- dimère**.**

On peut alors affirmer que l'activation de la pro-protéine de la souche *BDzG* donne un dimère de poids moléculaire de (58+18) kDa.

Ce résultat, très proche de celui trouvé par **Katayama *et al*., (2005)** et **Mizuki *et al.*, (2000)** dont le dimère est de (56+15) kDa, confirme qu'il s'agit bien de la parasporine1.

Cependant, une analyse par PCR du gène codant pour la PS1 et un séquençage de cette protéine doivent être impérativement réalisé.

3.4. Poids moléculaires des fractions protéiques

Comme le montre la figure 56, l'analyse éléctrophorètique SDS-PAGE des protéines d'inclusion parasporale de la souche *BDzB* montre bien un poids moléculaire de 37 kDa correspondant à la pro-protéine **(Colonne2)** et un peptide de 20 kDa **(Colonne3)** résultat de la protéolyse de la pro-protéine par la protéinase K.

En ce qui concerne l'analyse électrophorètique SDS-PAGE des protéines d'inclusion parasporale de la souche *BDzG* (Figure 57), une pro-protéine de 81k Da est bien visible **(Colonne2)**; tandis que les fractions activées (protéolyse par la trypsine) sont apparues en **(Colonne3)**.

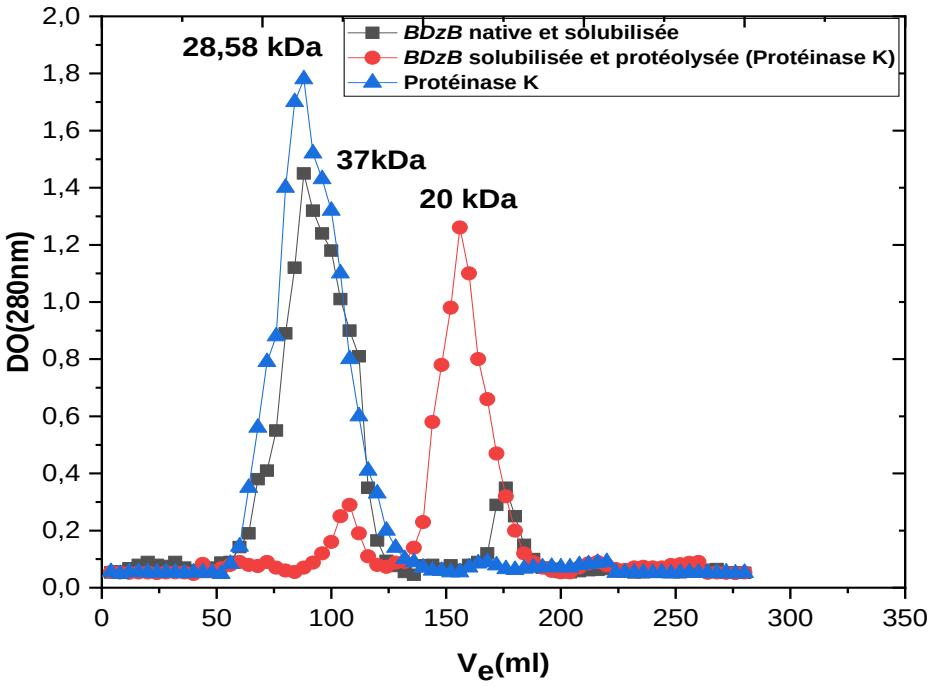


Figure 54 : Chromatogramme de la Pro-protéine (*BDzB)* ■ solubilisée; Protéolysée ● et de la Protéinase K (2 mg/ml) ▲.

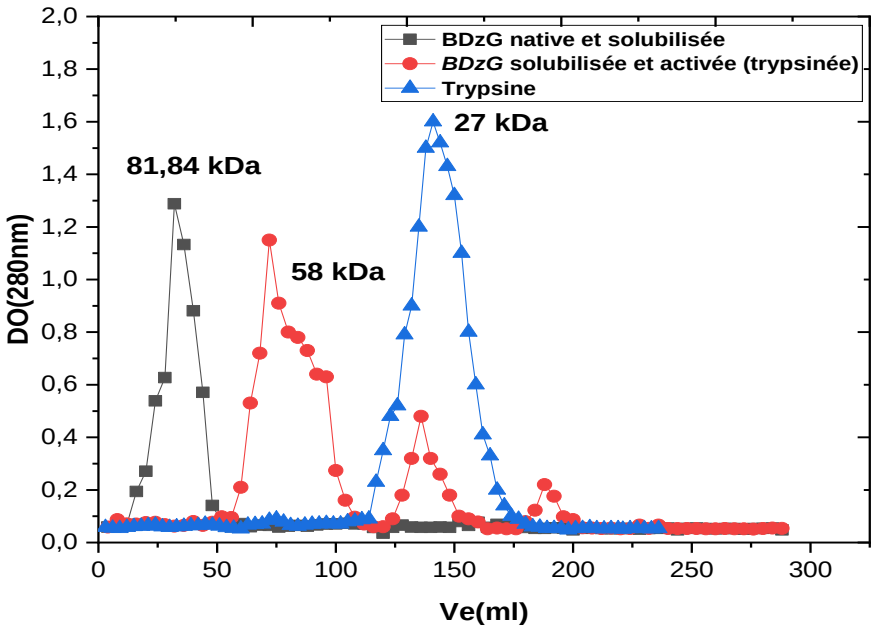


Figure 55: Chromatogramme de la Pro-protéine (*BDzG)* ■ solubilisée; Activée ● et de la trypsine pure (1 mg/ml) ▲.

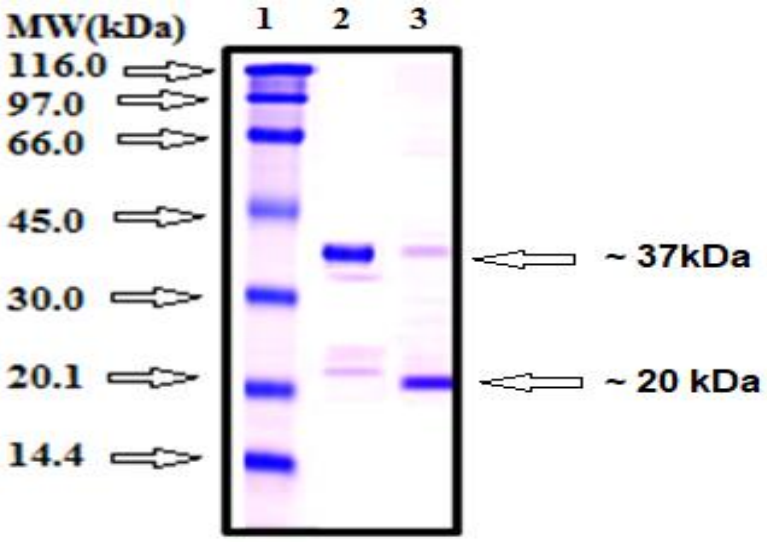


Figure 56 : Analyse électrophorèse SDS-PAGE des protéines d'inclusion parasporale (50µg) de *BDzB*: **Colonne1**: marqueur de protéine Amersham LMW (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany), **Colonne 2**: pro-protéine*BDzB* solubilisée et purifiée, **Colonne 3**: pro-protéine *BDzB* solubilisée purifiée et activée par la protéinase K.

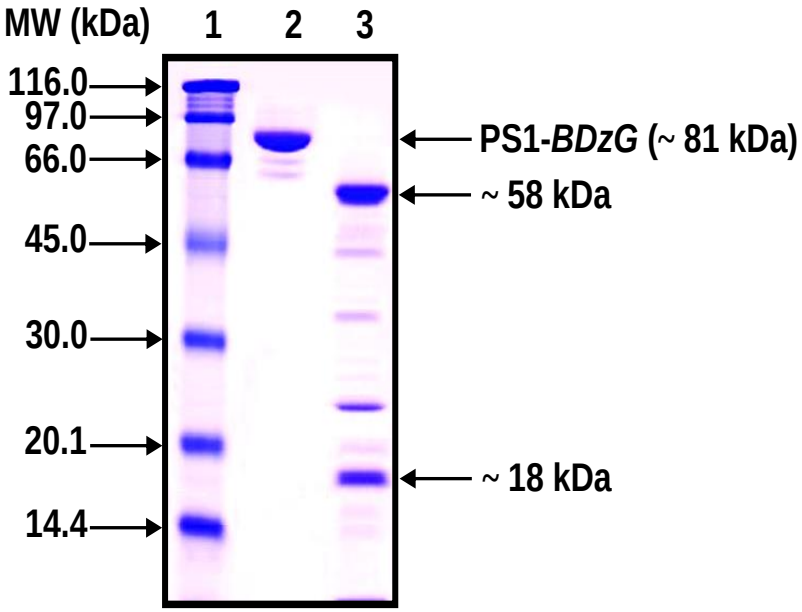


Figure 57 : Analyse électrophorèse SDS-PAGE des protéines d'inclusion parasporale (50µg) de *BDzG*: **Colonne1**: marqueur de protéine Amersham LMW (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany), **Colonne 2**: pro-protéine *BDzG* solubilisée et purifiée, **Colonne3**: pro-protéine *BDzG* solubilisée purifiée et activée par la trypsine.

4. Caractérisation moléculaire

4.1. Recherche des gènes codant pour la parasporine

La recherche de gènes codant pour les PS1, PS2, PS3 et PS4 pour les dix souches a été réalisée par analyse PCR de leur ADN génomique amplifié avec les amorces correspondantes. Le résultat était positif uniquement pour la souche *BDzG* pour la PS1 donnant une bande de la taille attendue (2694bp), tandis que les autres souches sont négatives (Figure 58).

En ce qui concerne les gènes codant pour les PS2, PS3 et PS4 aucune bande n'est apparue pour aucune de nos souches (Annexe 8), ce qui confirme que les 9 autres souches ne sont pas des *Bacillus thuringiensis* productrices de parasporines y compris la souche *BDzB* non hémolytique dont le poids moléculaire de sa pro-protéine de 37 kD laissait suggérer qu'il s'agissait d'une parasporine 2.

Ces résultats confirment qu'une seule souche, la *BDzG*, est une *Bacillus thuringiensis* productrice de parasporine 1.

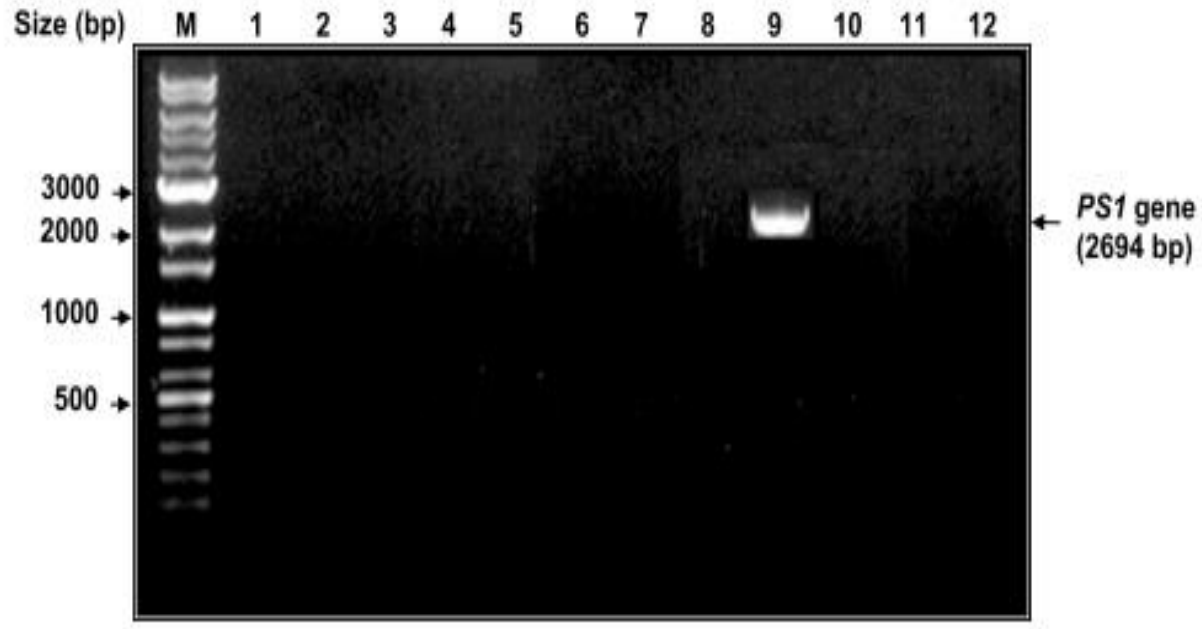
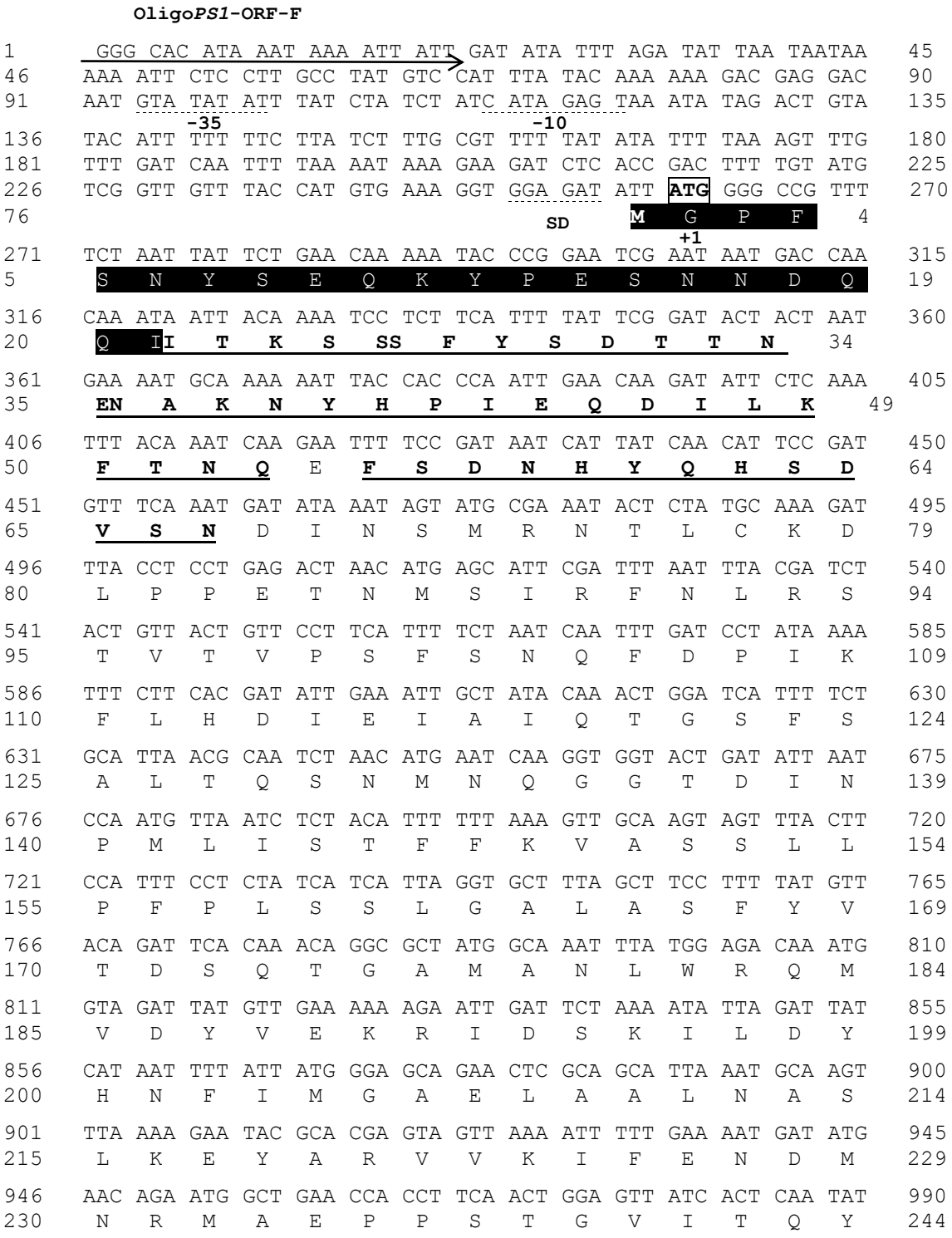


Figure 58 : Recherche par analyse PCR du gène codant pour la PS1 (**M:** Marker 1kb Plus DNA Ladder from Invitrogen, France), **Colonne 1**: H_2O, **Colonne 2**: Souche de référence (*B.thuringiensis* serovar *berliner*1915), **Colonne 3**: *BDzA*, **Colonne 4**: *BDzB*, **Colonne 5**: *BDzC*, **Colonne 6**: *BDzD*, **Colonne 7**: *BDzE*, **Colonne 8**: *BDzF*, **Colonne 9:***BDzG*, **Colonne 10**: *BDzH*, **Colonne 11**: *BDzI*, et **Colonne 12**: *BDzJ*.

4.2. Séquençage du gène de la parasporine 1 (*PS1*) de la souche BDzG

Le séquençage des nucléotides et acides aminés déduits du gène de la *PS1* de *BDzG* obtenus ont été enregistrés dans la base de données internationale GenBank sous le numéro (accession number: MN637834). La PS1 a été clonée dans *E.coli* DH5α et séquencée. Elle a révélé un cadre de lecture ouverte (open reading frame ou ORF) de 2169 pb codant pour 723 acides aminés. Cet ORF a été vérifié comme étant le gène codant pour la protéine PS1 (*BDzG*) (Figure 59).



```
991   AGA ATT CTT AAT GAT AAT TTC ATT AAA TAC ATT GCA AAA TTA CAA   1035
245    R   I   L   N   D   N   F   I   K   Y   I   A   K   L   Q    259

1036  TTC TCA ACA AAT CAA TCA GAT TTA CAA TAT CCT GTC CTA ACT TTA   1080
260    F   S   T   N   Q   S   D   L   Q   Y   P   V   L   T   L    274

1081  CCA TTA CGT GCA CAA GCA TGT GTA ATG CAT TTA ATG TTA TTA AAA   1125
275    P   L   R   A   Q   A   C   V   M   H   L   M   L   L   K    289

1126  GAT GCA ACG ACT TCT GTG TGG GGA CAA CAA ATA GAC TCG CAA CAA   1170
290    D   A   T   T   S   V   W   G   Q   Q   I   D   S   Q   Q    304

1171  TTA AAT GGG TAT AAA GCA GAA TTA ATA CGT TTA ATA AAA GTA TAT   1215
305    L   N   G   Y   K   A   E   L   I   R   L   I   K   V   Y    319

1216  ACT AAT GAT GTA AAC ACA ACG TAT AAT CAA GGG CTA GAG CTA GAA   1260

320    T   N   D   V   N   T   T   Y   N   Q   G   L   E   L   E    334

1261  AAA GCT AAA CCA CTA AAT TAT TCT GAT CCT GAA GAA TAT TTA CAA   1305
335   K   A   K   P   L   N   Y   S   D   P   E   E   Y   L   Q    349

1306  GCA GGG CGT CCA GGA ATA TCT GTA TTA CGC AGT AAC TTT AAA GAG   1350
350   A   G   R   P   G   I   S   V   L   R   S   N   F   K   E    364

1351  GTT ATG AAG TGG AAT AGA GTA GCG AAA TAT AAA CGT GGA ATG GCT   1395
365    V   M   K   W   N   R   V   A   K   Y   K   R   G   M   A    379

1396  ATG AGT GCT TTA TCA TTA GCT GCA TTA TTT CCA ACT TTC GGA CCA   1440
380    M   S   A   L   S   L   A   A   L   F   P   T   F   G   P    394

1441  AAT TAT CCA AAA CAA GCA TTA AAA GTT GTG CAA TTT AGA CAA ATT   1485
395    N   Y   P   K   Q   A   L   K   V   V   Q   F   R   Q   I    409

1486  TTT GCA CCT GTA ATT GGA ATA CCA GGC GGT ATA ACA AGT CAA GAT   1530
410    F   A   P   V   I   G   I   P   G   G   I   T   S   Q   D    424

1531  CAT TCT GGC ACT TTT GGT AGT ATG AGA TTT GAT GTA AAA ACT TAT   1575
425    H   S   G   T   F   G   S   M   R   F   D   V   K   T   Y    439

1576  GAT CAA ATT GAT GCG TTA CGA CGA CTA ATG GAA TTA TAT ATT CAA   1620
440    D   Q   I   D   A   L   R   R   L   M   E   L   Y   I   Q    454

1621  CCT TTA AAA TCT GCC TAC TTC TAT ATA TAT GAA TCG GAT TGG AAA   1665
455    P   L   K   S   A   Y   F   Y   I   Y   E   S   D   W   K    469

1666  GTT CGT GCA ACT TAT GTC AAT GAC TAT ATT GGT AAA AGA GGG TCT   1710
470    V   R   A   T   Y   V   N   D   Y   I   G   K   R   G   S    484

1711  AAT ACA GGT CTT GCC TGG GCT ATG TGG TCA AGT GAT CCT TCA GTC   1755
485    N   T   G   L   A   W   A   M   W   S   S   D   P   S   V    499

1756  ATA TAC ACT TCT GCA CTA GGA GCA GCA GGA TAC GCT CCT AAC GTT   1800
500    I   Y   T   S   A   L   G   A   A   G   Y   A   P   N   V    514

1801  GTT GGT GTA AGA TAT TCA CAT GGG GGT AGT TAC ACA AAA GGT ATG   1845
515    V   G   V   R   Y   S   H   G   G   S   Y   T   K   G   M    529

1846  GCA CCC CCA AAT ACT AAT GCG TAT GCT CCA TTT GAA TTT AAA TAT   1890
530    A   P   P   N   T   N   A   Y   A   P   F   E   F   K   Y    544

1891  CCT GGT TAT AAA CTA CAC AGT GTT AGT GCT TAT GGA TTA AGT AAA   1935
545    P   G   Y   K   L   H   S   V   S   A   Y   G   L   S   K    559

1936  GCA CCT GAT ACA GCT GAT TCT GTT ATG TTT GGA TTT AGA CCT GTA   1980
560    A   P   D   T   A   D   S   V   M   F   G   F   R   P   V    574

1981  TTG TTA GAA AAT GAA GCA AAT CAA TTA TTA ACA GAT ACA GCA TTG   2025
575    L   L   E   N   E   A   N   Q   L   L   T   D   T   A   L    589

2026  CAA ATT CCA GCA GAA ATA GGA ATA AGT GAT GTC GTA CCT GCA TTT   2070
590   Q   I   P   A   E   I   G   I   S   D   V   V   P   A   F    604
```

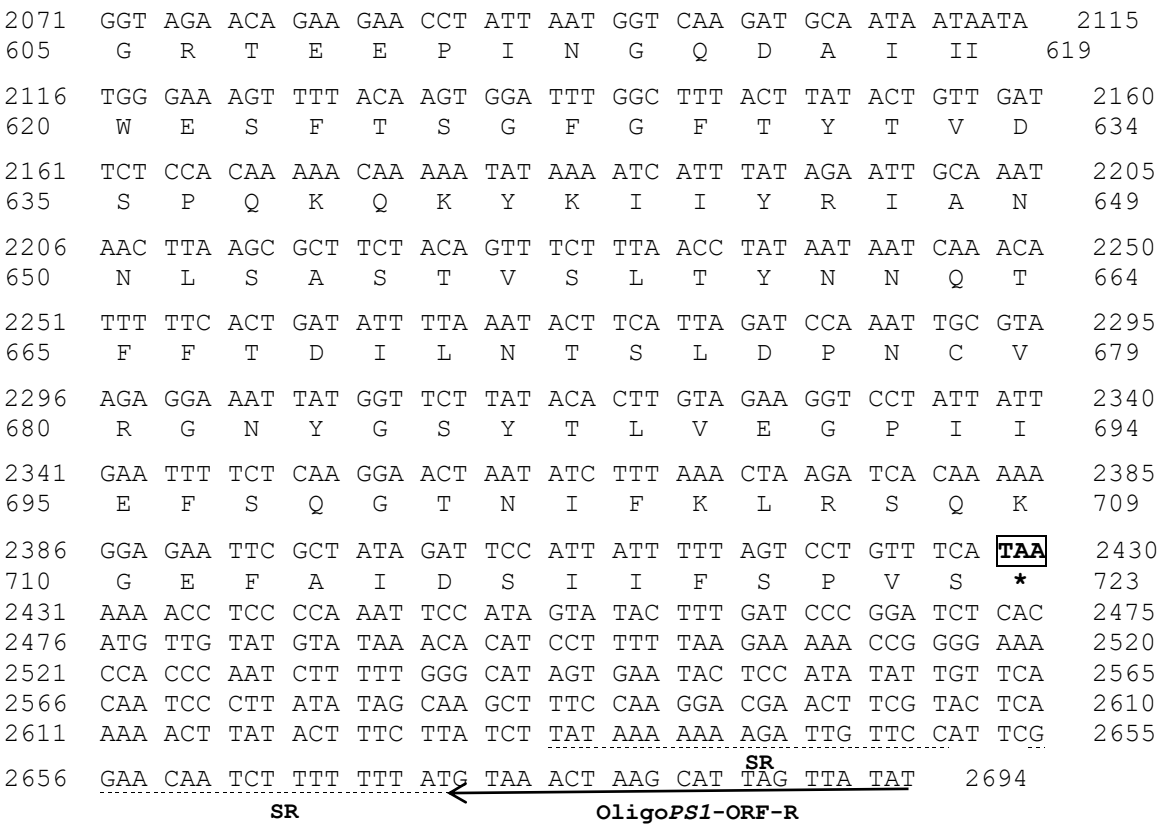


Figure 59: Séquences de nucléotides et d'acides-aminés déduits du gène de paraporine1 (PS1) de la souche Bt *BDzG* (**MN637834**). Le gène PS1 est constitué de 2169 bp codant pour un polypeptide de 723 résidus d'acides aminés. Le début de la translation au niveau du nucléotide en position 1. Le premier acide aminé de la protéine PS1, Met, est compté comme +1. Les chiffres arabes écrits des deux côtés des lignes indiquent les positions des nucléotides (en bas) et des acides aminés (en haut). Les séquences de nucléotide ATG et TAA (tous deux encadrés) représentent le codon de translation, d'initiation et terminal respectivement. Les positions des forward et reverse amorces externe (***PS1-BDzG20*-F** et ***PS1-BDzG21*-R**) et interne (***PS1-BDzG22*-F** et ***PS1-BDzG23*-R**) utilisés sont soulignés. La boite noire est réservée pour la séquence NH_2-terminal d'acide aminé de la PS1(*BDzG*) purifiée. Les cinq séquences d'acides aminés internes de la wild-type 81-kDa PS1 *BDzG* protéine déterminées dans cette étude est soulignée. SD: Shine-Dalgarno-like sequence. La région du promoteur putatif (-10 et -35) et la séquence terminale (SR (stackingregion) : région d'empilement sont soulignées par une ligne pointillée.

4.3. Séquençage de la protéine de la parasporine-1 (*PS1*) de la souche *BDzG*

L'analyse des 21 NH_2 acide aminés terminaux de la protéine de *BDzG*-81 kDa purifiée a été séquencée comme suit : **MGPFSNYSEQKYPESNNDQQI** confirmant la pureté de cette dernière. La séquence de la parasporine 1 contenait les cinq blocs conservés que l'on trouve communément dans les protéines *Bt* Cry (Annexe 9). Cette séquence a été soumise à des

comparaisons avec la séquence de différentes protéines PS1 (GenBank et la base de données Swiss-Prot, en utilisant la base de données BLASTP et les programmes de recherche tBlastn, respectivement).

Comme l'illustre le tableau 26, le NH_2-Terminal de *BDzG* a été comparée à d'autres séquences de PS et on a remarqué qu'il y'avait une grande homologie avec d'autres Bt-PS1, en particulier avec ceux de la souche **Bt 64-1-94** (83% d'identité avec PS1-**BDzG**).

La séquence a également montré une homologie avec celles signalées pour les autres Bt-PS1, atteignant **80.00, 77.78,** et **70.00**% d'identité avec PS1-Aa1, PS1-Aa6 et Cry31- comme la protéine 81-kDa des souches ***Bt* 84-HS-1-11**, **M019**, et **B0195**, respectivement.

Tableau 26 : Alignement de la séquence d'acides aminés NH_2-terminale de la protéine parasporine1 (*BDzG*) purifiée de la souche *Bt -BDzG* avec les séquences d'autres familles *Bt*-PS.

Parasporine-1 (PS1)	Source *soucheBt*	NH_2-acide aminéterminal[a]	Identité (%)[b]	Reference
PS1 (*BDzG*) (ce travail)	*BDzG*	MGPFSNYSEQKYPESNNDQQI	-	**Aberkane *et al.*, 2020**
PS1 (AGO57767)	64-1-94	--PFSNYSEQKYPDSNNNQE-	83.00	**Gonzalez *et al.*, 2011**
PS1-Aa1 (BAB11757)	84-HS-1-11	MDPFSNYSEQKYPDSNNNQEL	80.00	**Mizuki *et al.*, 1999**
PS1-Aa2 83-kDa crystal protein (AAL87458)	M15	MDPFSNYSEQKYPDSNNNQEL	80.00	**Jung *et al.*, 2007**
PS1-AC2 (BAM25048)	B0462	MDPFSNYSEQKYPDSNNNQEL	80.00	**Kuroda *et al.*, 2013**
PS1-Aa6 (BAI44026)	M019	VDPFSNYSAQKYPDSNNNQEL	77.78	**Nagamatsu *et al.*, 2010**
PS1 78A-like protein (ADZ45239)	AKS-7	---FSNYSAQKYPDSNNNQEL	76.00	**Numérod'accession: PRJNA206044**
Cry31-like 81-kDa protein (BAE79809)	B0195	MEKFSNFSEQKYPDSNNNQEL	70.00	**Uemori *et al.*, 2008**

Par tous ces résultats nous confirmons que la souche *BDzG* isolée du sol Algérien est bel et bien un *Bacillus thuringiensis* producteur de la parasporine 1.

Cette souche pourrait avoir une activité cytotoxique qu'on s'attèle à rechercher antérieurement.

5. Activité cytotoxique de la protéine cristalline et ses fractions

L'activité cytotoxique de la protéine et de ses fractions a été investiguée envers deux lignées cellulaires cancéreuses HEp2 (ATCC® CCL23™), A549 (ATCC® CCL-185™) et une lignée saine Véro (ATCC® CCL-81 ™).

5.1. Caractérisation des lignées cellulaires

5.1.1. Morphologie des lignées cellulaires

Les différentes lignées cellulaires ont été observées après 24h d'incubation sous microscope photonique à contraste de phase. Les différences morphologiques entre les trois lignées cellulaires (HEp2, A549 et Véro) ont été distinguées (Figure 60) :

La lignée HEp2 (ATCC® CCL23™) provenant d'un carcinome laryngé humain est une lignée polyploïde. Ce sont des cellules adhérentes qui possèdent de gros noyaux et de gros nucléoles.

La lignée A549 (ATCC® CCL-185™) est une lignée continue, initiée à partir d'un carcinome alvéolaire humain ayant des propriétés de cellules épithéliales alvéolaires de type II. Ce sont des cellules adhérentes, contiennent des corps d'inclusion cytoplasmiques multi laminaires typiques de ceux trouvés dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II du poumon. Elles sont beaucoup plus volumineuses et moins allongées que les HEp2.

La lignée Véro (ATCC® CCL-81 ™) est une lignée continue et aneuploïde, isolée à partir de cellules épithéliales rénales extraites d'un singe vert africain. Ce sont des cellules adhérentes caractérisées par une forme fibroblastique (fusiforme) avec un large cytoplasme.

Les HEp2 sont facilement identifiables par leurs formes allongées, alors que les cellules A549 sont beaucoup plus volumineuses et moins allongées. Les cellules Véro sont à elles de petites tailles.

5.1.2. Détermination du temps de dédoublement

Le temps de dédoublement a été déterminé après ensemencement de 30 boites de T25 à raison de 25 000 ou 50 000 cellules (ça dépend de la lignée cellulaire), puis comptage quotidien de 3 boites prises au hasard pendant 10 jours. Les résultats sont représentés sous forme de courbes(Nombre de cellules = f (Temps)) (Figure 61).

D'après les équations : y_1=14940.73 $e^{0.0291x}{}_1$; y_2= 49823 $e^{0.0300x}{}_2$ et y_3 = 59375.14$e^{0,0259x}{}_3$;un temps de dédoublement de y_1=23.81 h a été trouvé pour les HEp 2 ; de y_2=22.50 h pour les A549 et y_3= 26.76h pour les Véro respectivement.

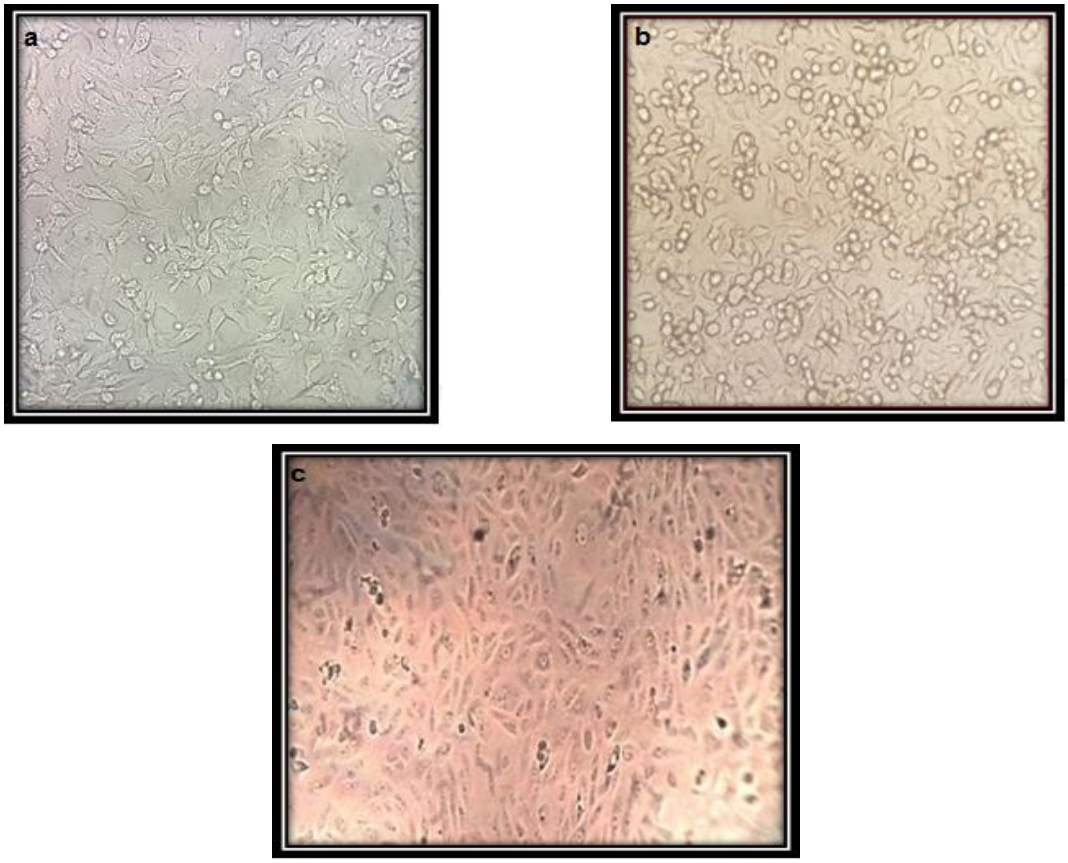


Figure 60 : Photographies morphologiques des lignées cellulaires : **(a)** HEp2, **(b)** A549 et **(c)** Véro après 24h d'incubation, observées au microscope photonique à contraste de phase (BRESSER-MikroLabCam) (GX40).

Le temps de dédoublement est soit extrapolé des équations exponentielles obtenues, soit en utilisant l'équation suivante :

$$Dt = \frac{Duration\ X\ Ln\ 2}{Ln\ Cf - Ln\ C0}$$

Où Dt: Doubling time ; Duration : est le temps nécessaire au passage de C_0 à C_f ; C_0 : concentration cellulaire à t_0 et C_f : Concentration cellulaire finale. **(Roth V, 2006),** *Doubling*

Time Calculator. **(http://www.doubling-time.com/compute.php).**

Nos résultats sont très proches de ceux trouvés dans la littérature, car le temps de dédoublement trouvé par **Draganov *et al.*, (2009**) pour les HEp2 est d'environ 22.6h. Pour les A549 le temps de dédoublement varie de 22h **(Chauhan *et al*., 2012)** à 23.41h (**Miao *et al*., 2004)**.

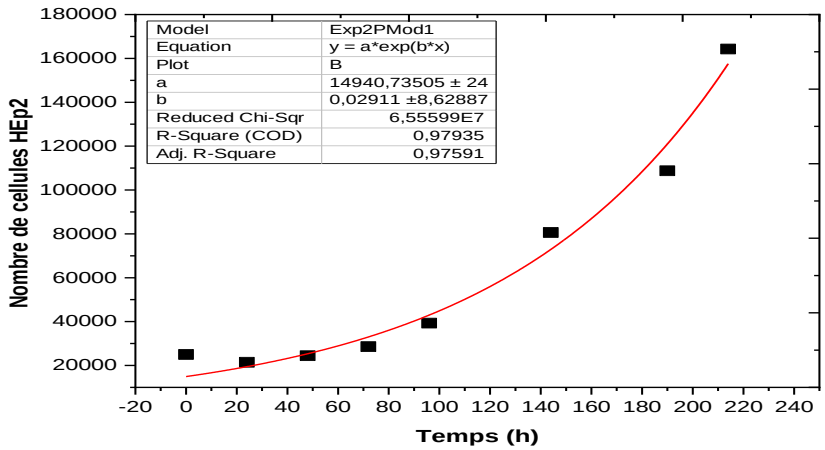
En ce qui concerne les cellules saines Véro, il est de 24h d'après **Nahapetian *et al*., (1986)** et **Ammerman *et al*., (2008).** La différence entre le temps calculé et le temps donné par la littérature est certainement dû à la composition des milieux de cultures utilisés qui n'est pas particulièrement la même (richesse ou pauvreté en nutriments).

5.1.3. Détection des mycoplasmes

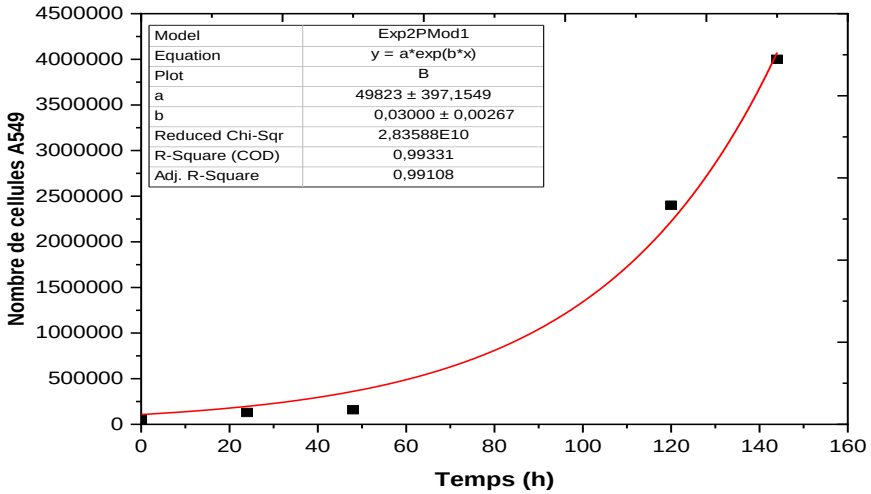
Ce test de détection est réalisé pour s'assurer de la pureté des cellules et de l'absence des mycoplasmes, en utilisant un agent intercalant le DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) et par observation au microscope à fluorescence (Leica DM 6000B).

La figure 62 démontre des cellules HEp2 et A549 saines non mycoplasmées, cependant il faut renouveler ce test tous les 3 mois.

(a)



(b)



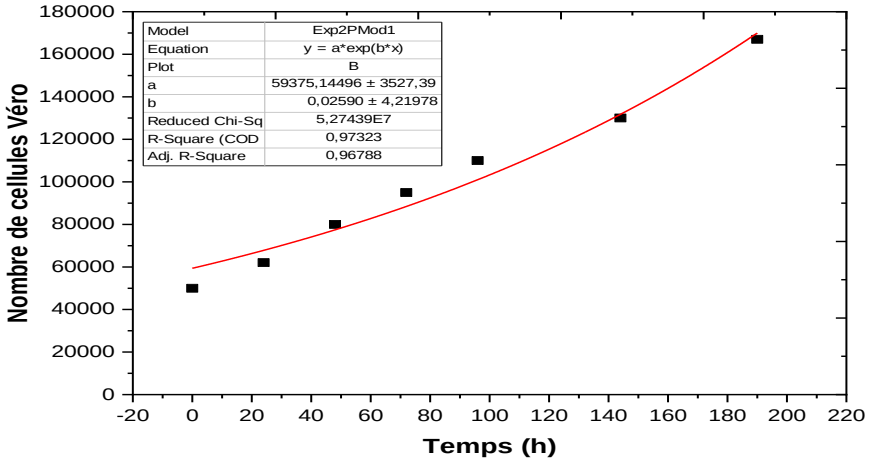


Figure 61 : Courbes représentants les temps de dédoublement des cellules HEp2 **(a)**, A549 **(b)** et Véro **(c).**

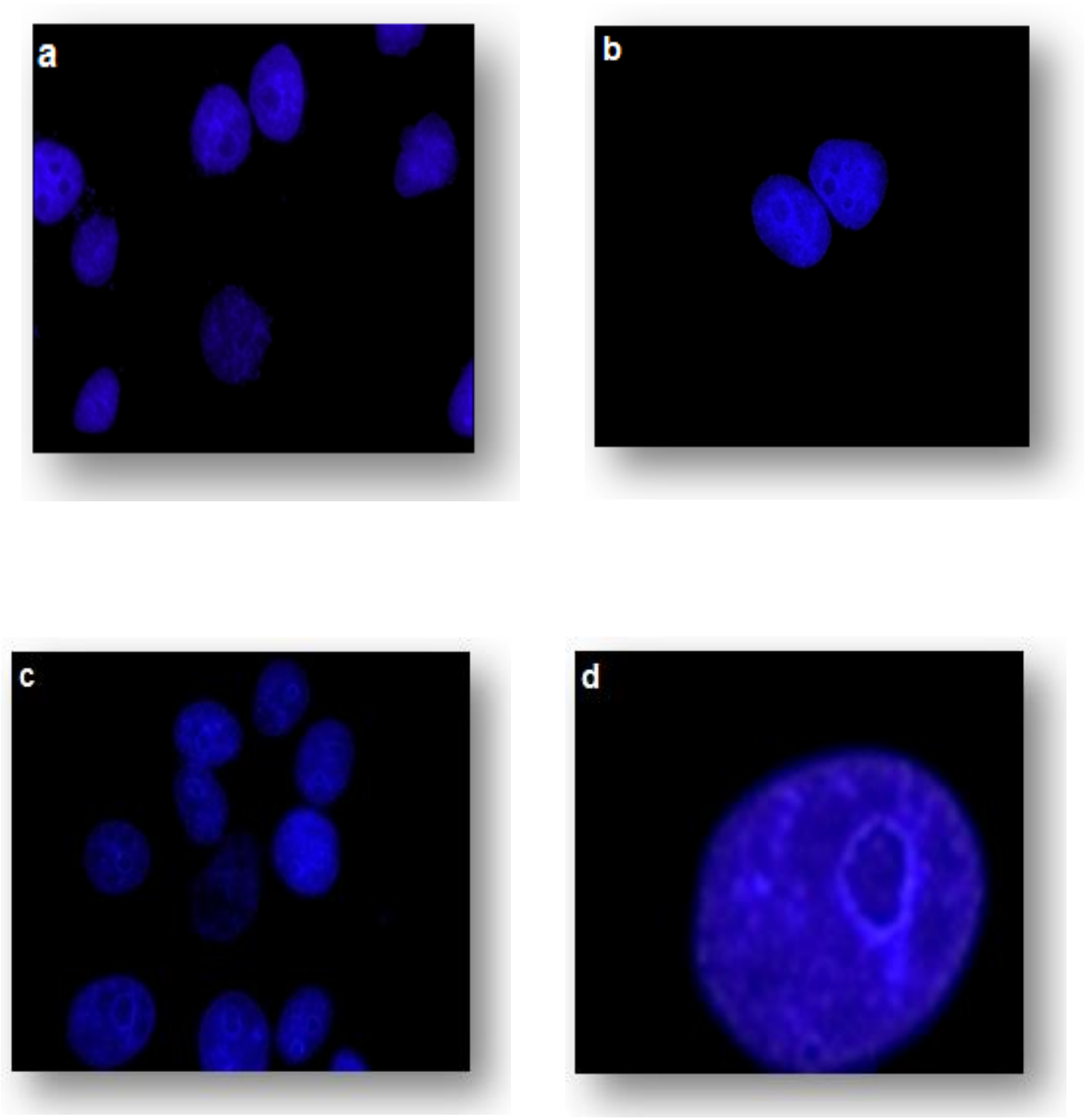


Figure 62 : La figure illustre des micrographies représentants des noyaux de cellules HEp2 (**a**&**b**) et des cellules A549 (**c**&**d**) non mycoplasmées marquées au DAPI observées au microscope à fluorescence (GX600).

5.2. Criblage de l'activité cytotoxique et anti-proliférative des fractions protéiques de la PS1-*BDzG*

Chaque fraction protéique obtenue (solubilisée,activée et purifiée) de la souche productrice de la parasporine 1-*BDzG,* a été testée envers les trois lignées cellulaires HEp2, A549 et Véro.

Les fractions protéiques causant une mort cellulaire supérieure ou égale à 60% ont été ainsi sélectionnées.

Les résultats obtenus révèlent un effet cytotoxique significatif ($p<0.05$) des différentes fractions de la protéine active (PS1-*BDzG*) envers les cellules cancéreuses du larynx (HEp2) En effet, quatorze (14) fractions (F14, F23, F24, F27, F32, F33, F34, F35, F36, F37, F38, F39, F40 et F42) ont donnés un effet cytotoxique ≥60% pour un temps de contact de 24h seulement, avec un effet cytotoxique très significatif pour les fractions F24, F27, F33 et F42.

Ceci pourrait suggérer que ces dernières contiennent les fractions actives de la PS1-*BDzG*. Ce résultat concorde assez bien avec les résultats des travaux de **Mizuki *et al*., (2000)**, où ils trouvèrent que la parasporine1 ne présentait une activité cytocide que lorsqu'elle était dégradée par des protéases en molécules plus petites de 40 à 60 kDa.

On peut constater d'après les figures 63-65, que l'effet cytotoxique de ces fractions envers les HEp2 n'a pas augmenté significativement avec l'augmentation du temps de contact (48h et 72h) (différence non significative $p>0.05$).

Par ailleurs, en ce qui concerne les cellules cancéreuses du poumon A549, presque toutes les fractions ont un effet cytotoxique < 50%, y compris les fractions chez qui on a observé un effet cytotoxique significatif envers les HEp2. De même cet effet cytotoxique ne se prononce pas d'avantage avec l'augmentation du temps de contact (48h et 72h).

D'autre part, en ce qui concerne les cellules saines Véro, elles semblent être insensibles vis- à-vis des différentes fractions de la protéine (PS1-*BDzG*), en comparaison avec les 2 autres lignées cancéreuses testées, Cette insensibilité ne semble pas disparaitre avec l'augmentation du temps de contact.

Nos résultats, nous permettent de conclure que l'augmentation du temps de contact de la molécule cytotoxique avec les lignées cellulaires ne semblerait pas avoir un grand effet sur l'action de cette molécule. Mêmes constatations ont été faites par **Mizuki *et al*., (2000);**

Namba *et al*., (2003); **Yamagiwa *et al*., (2004)**; **Ohba *et* al., (2009), Moazamian *et al*., (2018),** qui avancèrent que l'action cytotoxique maximale était atteinte au bout de quelques heures seulement (1h-8h) après administration de la PS.

D'autres part, d'après les résultats de **Katayama *et al.*, (2007)**, la parasporine1 a inhibé la synthèse des protéines peu après sa mise en contact avec les cellules. De même, l'inhibition partielle de la synthèse d'ADN a été observée immédiatement après l'ajout de la PS1. Ils suggèrent que la parasporine 1 exercerait rapidement son effet toxique et ne nécessiterait même pas son entrée dans le cytoplasme cellulaire pour agir. Il suffirait qu'elle se lie grâce à des récepteurs membranaires spécifiques à la surface des cellules pour qu'elle induise un afflux de Ca^{2+}et une élévation soutenue de la concentration intracellulaire de Ca^{+} dans les cellules sensibles aux toxines (dans les 3 minutes qui suivent l'ajout).

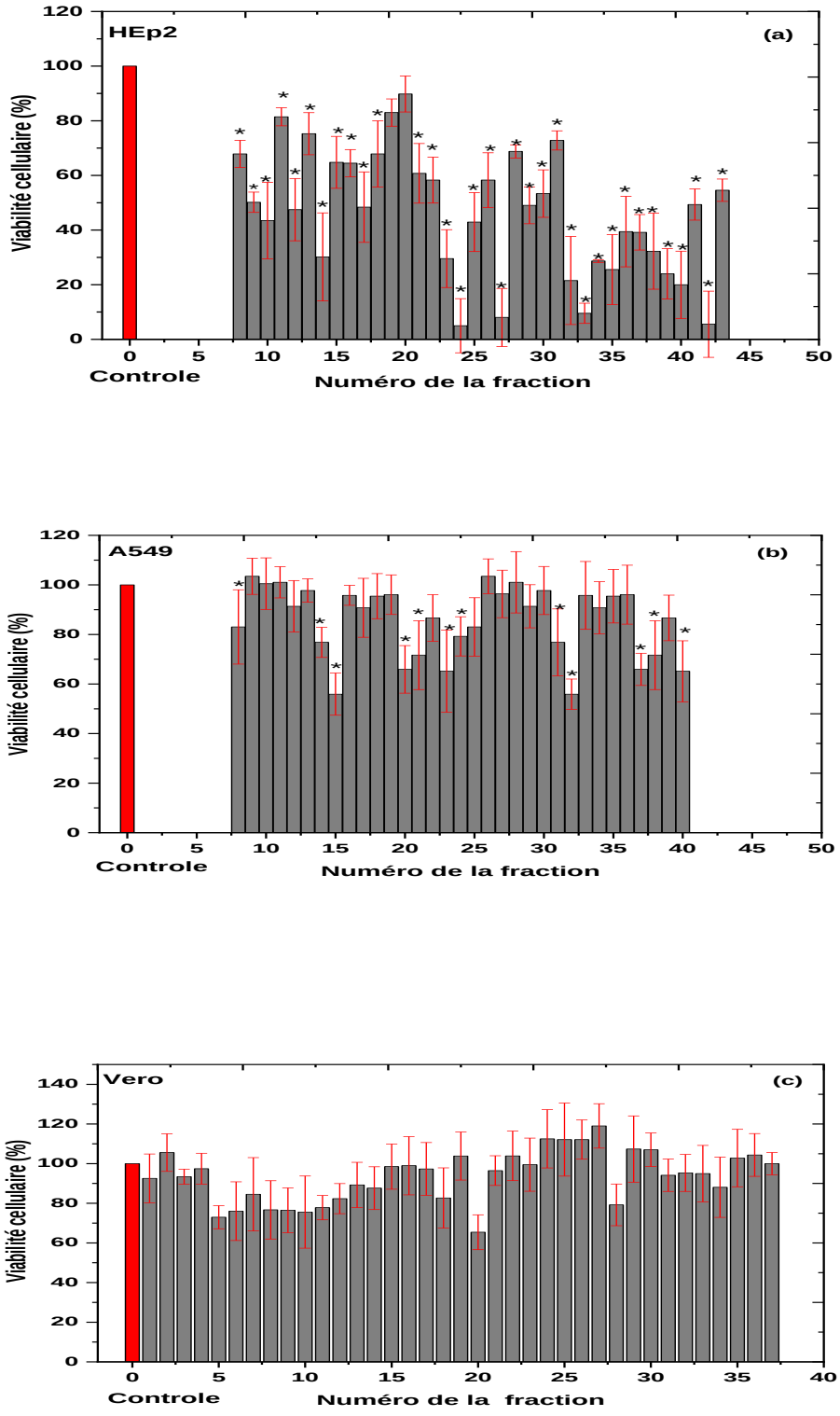


Figure 63 : Histogrammes représentants l'activité cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules (HEp2 (**a**), A549(**b**) et Véro(**c**)) à 24h de contact. (Moyenne ± SD), (n=3). (*Différence significative $p<0.05$).

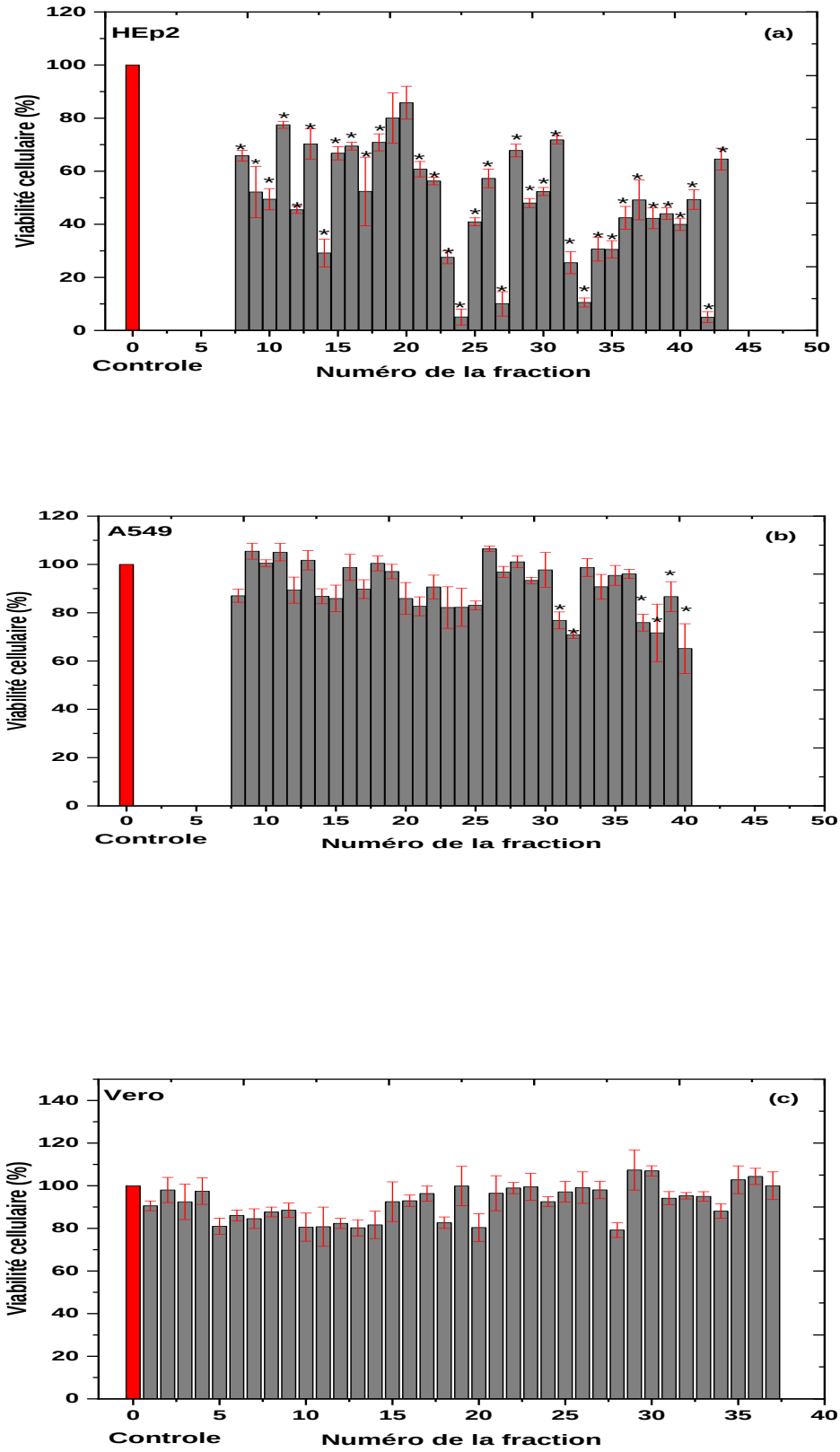


Figure 64 : Histogrammes représentants l'activité cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules (HEp2 (**a**), A549(**b**) et Véro(**c**)) à 48h de contact. (Moyenne ± SD), (n=3). (*Différence significative $p<0.05$).

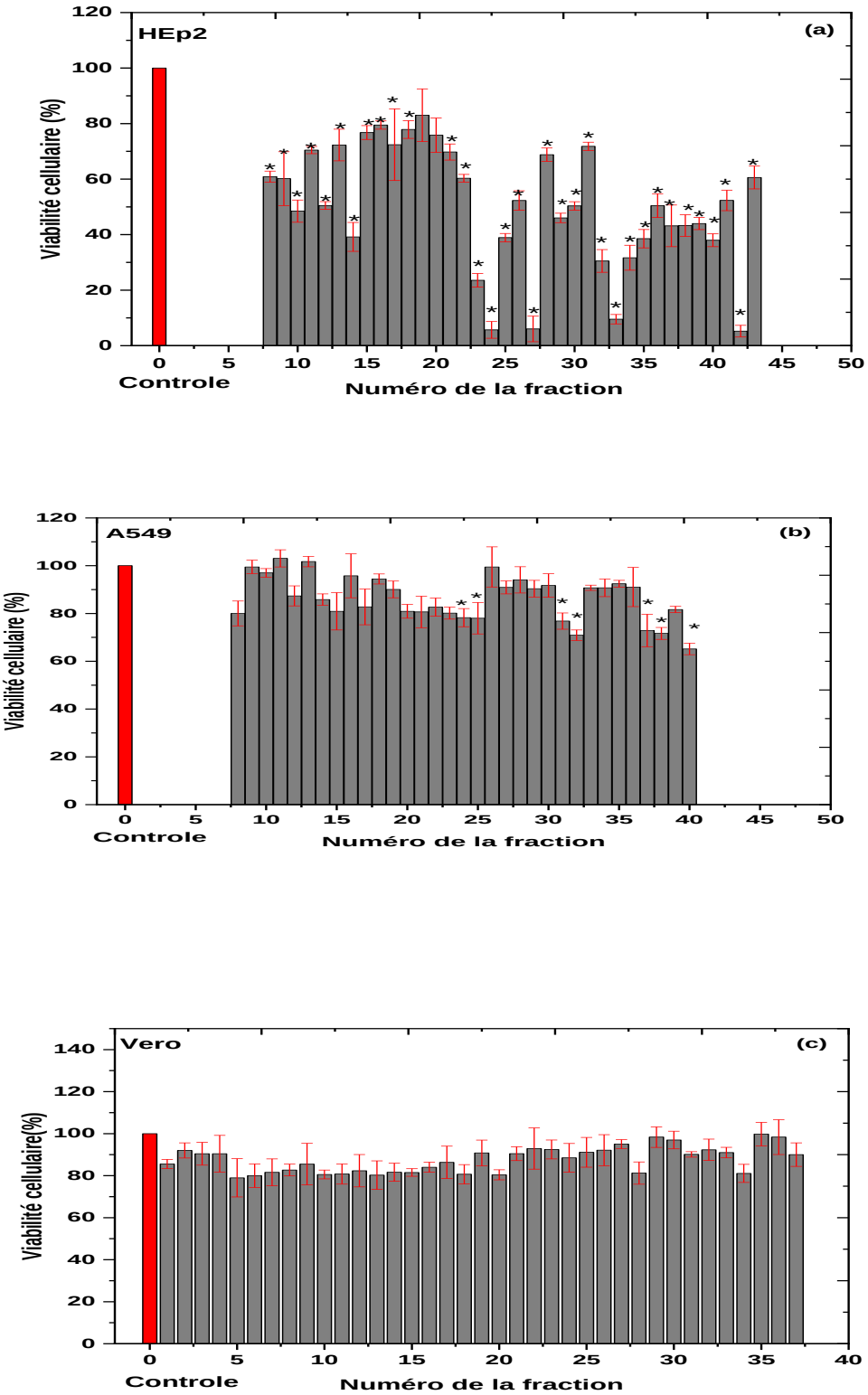


Figure 65 : Histogrammes représentants l'activité cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules (HEp2 (**a**), A549(**b**) et Véro(**c**)) à 72h de contact. (Moyenne ± SD), (n=3).(*Différence significative $p<0.05$).

En observant la différence d'action cytotoxique de la parasporine 1 (*BDzG*) envers les deux lignées cellulaires cancéreuses (HEp2 et A549) et l'absence de cytotoxicité envers les cellules normales (Véro), on peut suggérer que cette activité cytotoxique sélective est due soit, à la présence de récepteurs spécifiques différents à la surface des membranes de chaque lignée cellulaire, soit carrément à leur absence. Ces résultats ressemblent beaucoup à ceux de **Brasseur *et al.*, (2015)** qui ont émis l'hypothèse que : la cytotoxicité sélective de leurs parasporine (PS2Aa1) envers les cellules cancéreuses et l'absence de cytotoxicité envers les cellules normales suggèrent que soit différents récepteurs sont présents à la surface membranaire des cellules normales et cancéreuses soit qu'ils sont seulement absents dans les cellules normales.

D'après les travaux de **Chubika *et al.*, (2018)**; l'effet cytocide de la plupart des parasporines est considéré comme étant induit par des récepteurs, même si les mécanismes d'action décris sont très divers. **Namba *et al.*, (2003) et Saitoh *et al.*, (2006)** suggèrent que la toxicité spécifique des parasporines envers les cellules cancéreuses peut être due à la surexpression de ses molécules réceptrices ciblées ce qui n'est pas le cas chez les cellules normales. Ainsi, la protéine reconnaît et tue spécifiquement les cellules cancéreuses.

5.3. Détermination de l'effet cytotoxique des fractions protéiques (PS1-*BDzG*)

Le criblage de l'effet des fractions protéiques sur la viabilité cellulaire avait révélé un effet cytotoxique significatif de 14 fractions protéiques (supérieur à 60%). Ces fractions ont été concentrées puis utilisées pour évaluer cet effet cytotoxique par la relation dose-réponse.

Les concentrations inhibitrices causant 20%, 50% et 80% de mort cellulaire (IC_{20}, IC_{50}, IC_{80}) sont déduites des courbes dose- réponse (Annexe 10).

Comme le montrent les figures 66 (a, b et c), les taux de viabilité des cellules en fonction des différentes concentrations de chaque fraction de protéine ont montré une diminution significative ($P < 0,05$) qui est inversement proportionnelle à la concentration de protéines.

Dans le cas des cellules HEp2, la fraction F24 (*BDzG*) avec un PM de 56,62 kDa possède la meilleure activité cytotoxique avec une IC_{50} de 2,33 µg/ml (Figure 66.a & Annexe10-Tableau I) alors que l'activité cytotoxique envers les cellules A549 n'a pas été suffisamment révélée (Figure 66.b & Annexe10-Tableau II) car la majorité des fractions ont donné une viabilité cellulaire supérieure ou égale à 50%.

Les fractions protéiques testés envers les cellules HEp2 dont l'IC_{50} est inférieure à 10 ont été testées envers les cellules A549 et Véro. Comme le montre la figure 66.b (graphe inséré), l'effet cytopatique était inférieur à celui des HEp2, même aux concentrations élevées. Une IC_{50} de 19,32 µg/ml pour la fraction F42 a été calculé, alors que pour la fraction F24, elle était de 18,54 µg/ml.

Nous remarquons que cette valeur est premièrement supérieure à 10 µg/l (limite d'une bonne activité cytotoxique d'après **Ohba *et al.*, (2009**) et qu'elle est très proche de celle de la fraction F42 (la fraction F42 pourrait être la trypsine).

D'autre part, on peut constater que presque toutes les fractions n'ont pas affecté les cellules normales Véro (Figure 66.c & Annexe10-Tableau III**)**. La viabilité cellulaire est supérieure à 70 % (dont certains dépassent même les 100 %). Ce qui montre qu'il y'a une prolifération cellulaire accrue avec un environnement favorable et sans inhibition de croissance.

L'IC_{50} calculée pour les cellules Véro, nous a permis de confirmer l'inactivité de notre protéine cytotoxique envers les cellules saines, ainsi pour la fraction F24 une IC_{50} de 63.44 µg/ml a été trouvé. Cette valeur est la plus importante de toutes les fractions testées, alors que l'IC_{50} de la fraction F42 est de 11.74 µg/ml. Ceci peut être justifié par la sensibilité des Véro envers la trypsine.

De ces résultats, on peut avancer que pour les mêmes fractions testées envers les lignées cellulaires (HEp2, A549 et Véro) une différence significative ($p<0.05$) de l'activité cytotoxique a été observée (Figure 67 & Tableau 27).

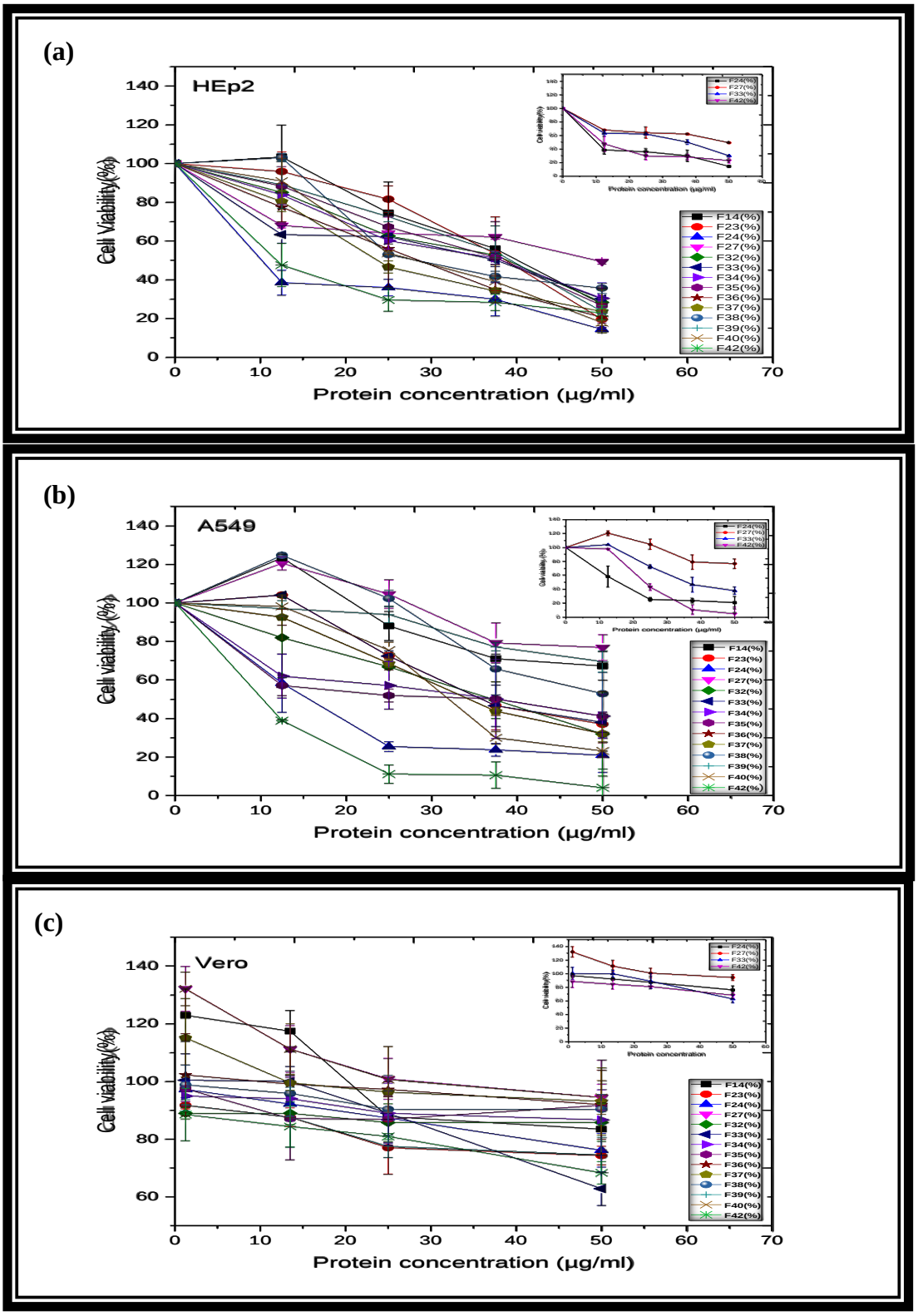
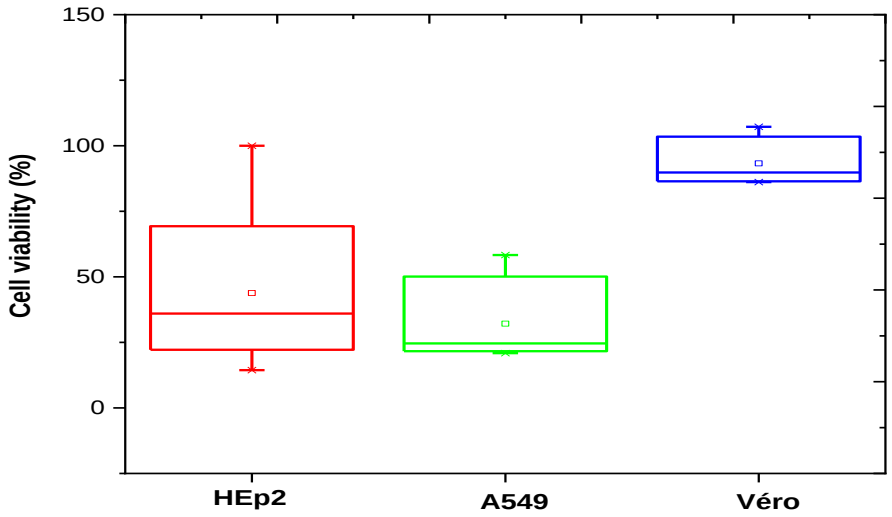


Figure 66 : Graphiques représentent les courbes dose-réponse des fractions cytotoxiques de la protéine PS1-*BDzG* envers les cellules HEp2 (**a**), A549 (**b**) et Véro (**c**) à 24 h post-inoculum. (Moyenne ± SD), (n=6).

Tableau 27: Tableau récapulatif montrant les poids moléculaires des différentes fractions protéique de la PS1-*BDzG* ayant une IC_{50}<10 envers les lignées HEp2, A549 et Véro.

Fractions	PM (kDa)	$IC_{50}^{HEp2(1,2)}$ (µg/ml)	SD	$IC_{50}^{A549(1,2)}$ (µg/ml)	SD	$IC_{50}^{Vero(1,2)}$	SD
F24*	56.62	**2.337**	0.696	**18.545**	1.268	**63.44**	0.25
F27	50.69	**7.969**	0.654	**27.449**	1.438	**38.09**	0.24
F33	40.64	**9.343**	0.328	**25.542**	1.407	**26.58**	0.06
F42	27.8	**3.872**	0.628	**19.323**	1.286	**11.74**	0.13

IC_{50} [1] Data of dose-response cytotoxicity curve of fractions against each cells line. [2] Represent (Moyenne ± SD), n = 6.***(P = 0.003)**



Null hypothesis: The means of all levels are equal.
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.
At the 0.05 level, the population means are **significantly different Prob>0,00917**

Figure 67: Box charts représentant la différence significative de l'activité cytotoxique que possède la PS1-*BDzG* envers les trois lignées cellulaires (HEp2, A549 et Véro) obtenu grâce au logiciel ANOVA oneWay.

5.3.1. Visualisation microscopique de l'effet cytotoxique de la fraction F24 (PS1-*BDzG*)

a) Observation au microscope à contraste de phase

Dans le but de mettre en évidence l'effet cytotoxique déterminé; une visualisation microscopique des changements morphologiques ou autres a été réalisée.

Cet effet cytopathique de la souche *BDzG* (productrice de PS1) a été clairement observé envers la lignée cellulaire HEp2 au cours du temps de contact (Figure 68**(b)**), et a été comparée avec celui de la souche *BDzB* (non productrice de PS) (Figures 68**(a)**B & C). Différents changements morphologiques des cellules HEp2 par rapport aux cellules témoins (traitées uniquement avec solution de solubilisation) ont été observés au microscope à contraste de phase (Figure 68**(a)**A).

Pendant les premières heures de contact (2h seulement) de la protéine PS1-*BDzG* avec les HEp2 (Figure 68**(b**)), les cellules s'isolent les unes des autres et perdent le contact entre elles et deviennent rondes, on appelle ce phénomène Anoikis qui signifie «sans-abris» ou mort cellulaire indépendante de l'ancrage**.** En effet, les contacts cellulaires sont assurés par différents types de protéines présentes à la surface cellulaire, telles que les intégrines et les cadhérines, qui sont respectivement impliquées dans les contacts entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC) et entre cellules voisines (**Gagnoux-Palacios & Hueber, 2019).**

On suppose que cette perte d'adhérence, la condensation à la fois du noyau et du cytoplasme sont que le résultat d'un mécanisme réactionnel engendré par la fixation de la PS1- *BDzG* à un récepteur membranaire spécifique. L'ensemble de ces phénomènes induit une diminution significative du volume cellulaire.

Au bout de 4 h de mise en contact, nous avons observé un taux significatif (~70%) de mortalité cellulaire (Figure 68**(b)**).

Après 16h de mise en contact de la PS1-*BDzG* pratiquement toutes les cellules été mortes (100%).

Ces observations valident les suggestions proposées dans la (**Section 5.2** de ce chapitre) quant à la vitesse d'action cytotoxique (environ 4 h) de la protéine PS1-*BDzG*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Moazamian *et al.*, (2018)** où les effets cytopathiques de la protéine parasporale des isolats envers les cellules HCT-116 et CCRF-CEM ont été observés à moins de 24h de contact; avec altération de la structure cytosquelettique, gonflement, hémorragie et lyse cellulaire.

Par ailleurs,**Mizuki *et al.*, (2000)** ont observés les mêmes effets cytopathiques de leur parasporine 1 envers les cellules MOLT-4 et Héla et ce en quelques heures de contact

seulement.

Des résultats similaires avaient été obtenus par **Yamagiwa *et al.*, (2004**) où les protéines cristallines de la souche de *Bacillus thuringiensis subsp. coreanensis* A2316 a provoqué la condensation nucléaire et le gonflement des cellules cancéreuses de la leucemie K 1h seulement après l'administration de la toxine.

De même **Namba *et al.*, (2003)** ont observé que la protéines cristalline A1519 de la souche *Bacillus thuringiensis subsp. coreanensis* A1519 a provoqué la condensation nucléaire et le gonflement des cellules cancéreuses (MOLT-4) 3h seulement après que la toxine ait été administrée.

Pour les cellules A549, l'activité cytotoxique de la protéine PS1-*BDzG* n'est pas significative, tandis que pour la protéine Cyt-*BDzB*, la mort cellulaire était beaucoup plus importante, presque la même que celle observée pour les HEp2 (Figures 68**(a)**E &F).

Nos résultats révèlent également une importante différence d'action des protéines issues des deux souches non hémolytiques (*BDzB*&*BDzG*) envers les cellules saines Véro, où la protéine Cyt de *BDzB* possède une activité cytocide, alors que la PS1-*BDzG* n'en n'a pratiquement pas (Figures 68**(a)**H &I).

De ces observations, nous pouvons conclure que la PS1-*BDzG*, a une action cytotoxique bien spécifique, elle est très importante envers la lignée cellulaire HEp2 (ATCC®CCL23™) provenant d'un carcinome épithéliale laryngé humain, modérée envers la lignée cellulaire A549 (ATCC®CCL-185™) issue d'un carcinome alvéolaire humain, et quasiment nulle pour la lignée cellulaire saine Véro (ATCC®CCL-81™) isolée à partir de cellules épithéliales rénales extraites d'un singe vert africain.

Le résultat de l'effet cytopathique a confirmé que le mode d'action cytocide de la PS1 (*BDzG*) est basé sur les récepteurs membranaires tandis que l'activité cytocide de la toxine de la *BDzB* est cytolytique (porogéne) et non spécifique car elle agit à la fois sur les cellules saines et cancéreuses.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Katayama *et al.*, (2007)** qui ont démontrés que la parasporine 1 n'est pas une toxine formant des pores (cytolytique). En effet, pour vérifier si oui ou non la parasporine1 affecte la perméabilité de la membrane, les auteurs ont mesuré la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) et l'afflux de l'iodure de propidium (PI). Ils sont trouvés que la parasporine 1 n'a pas induit la libération de LDH par les cellules Héla,

alors que la streptolysine O (SLO), une toxine formant des pores membranaires de *Streptococcus pyogenes*, a induit la libération de LDH en 30 min seulement. Ces essais ont également démontrés que la parasporine 1 n'affecte pas l'afflux d'IP donc la perméabilité de la membrane, contrairement à SLO qui induit l'afflux d'IP.

En plus de ces tests, **Katayama *et al*., (2007)** avaient analysé les effets de la parasporine 1 sur le potentiel membranaire des cellules traitées à l'aide d'une sonde fluorescen**t**e sensible au potentiel **:**Iodure de 3,3′-dipropylthiadicarbocyanine (DiSC3**)**. Lorsque la SLO a été ajoutée aux cellules Héla, une augmentation rapide de l'intensité de la fluorescence a été observée, ce qui indique que les membranes des cellules sont dépolarisées**.** En revanche, l'intensité de la fluorescence a à peine augmenté après un traitement de 10g/ml de parasporine 1. Leurs résultats avaient montrés que la parasporine 1 ne forme pas de pores dans la membrane plasmique ou induit une dépolarisation des membranes**.**

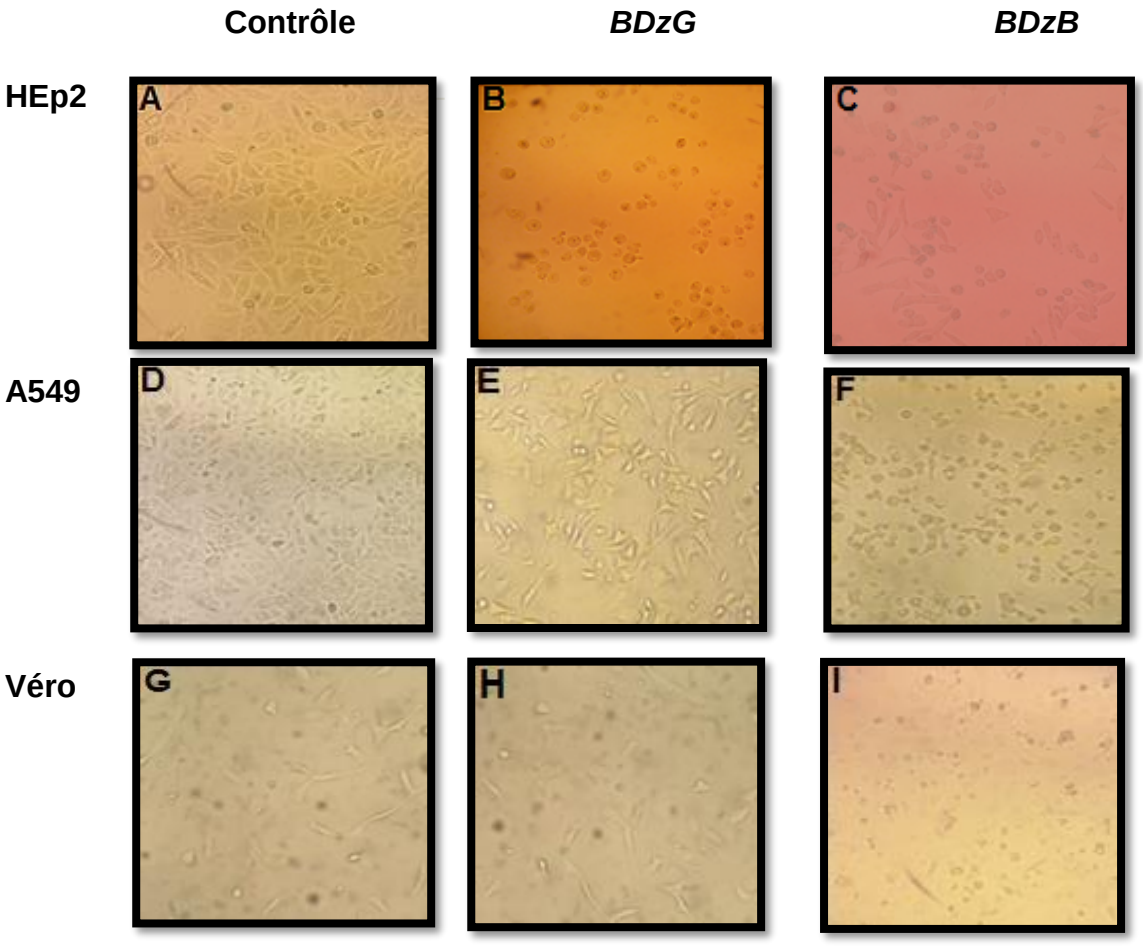
La parasporine 1 semble préférer induire la mort cellulaire par une voie apoptotique avec un mécanisme cytotoxique unique **(Katayama *et al*., 2007 ; Ohba *et al*., 2009).**

Fait intéressant, il a été rapporté que la parasporine1 pouvait se lier au récepteur Beclin-1 (pro-apoptotique) dans la membrane cellulaire **(Katayama *et al*., 2011).** Chez les mammifères, Beclin-1 existe dans des lignées cellulaires de carcinome épithélial du sein humain avec une expression limitée, mais abondant dans les épithéliums normaux du sein.

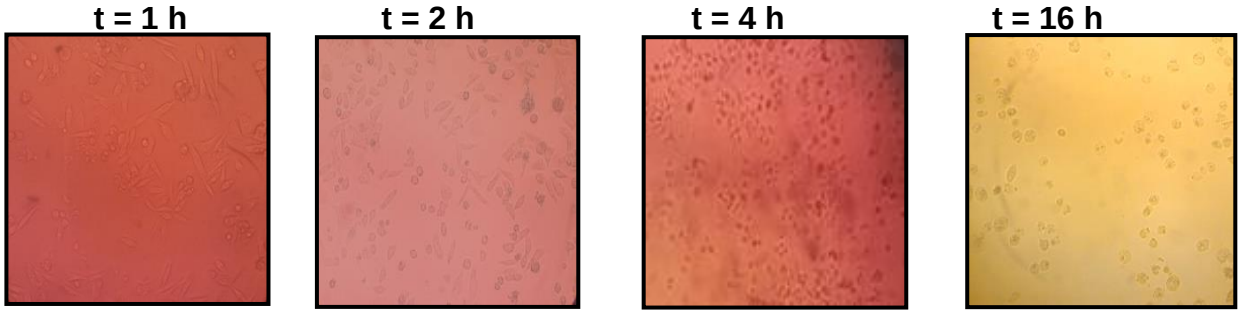
Il joue un rôle clé dans les processus d'autophagie et est crucial dans plusieurs voies chez toutes les espèces eucaryotes **(Liang *et al*., 1999).**

Récemment, une autre proposition a été émise par **Mendoza-Almanza *et al*., (2020),** où ils suggèrent que dans les cellules saines, la beclin-1 existe au niveau intracellulaire et est impliquée dans les processus d'autophagie et d'apoptose. Cependant, dans les cellules cancéreuses, la beclin-1 existe au niveau extracellulaire et agirait comme récepteur à la PS1.

L'interaction de la parasporine 1 avec la Beclin-1 et son mécanisme d'action est encore sous investigation.



(a) 24 h post- inoculation



(b) Intervalle de temps post inoculation (HEp2)

Figure 68: Observation de l'activité cytotoxique des protéines extraites des souches (*BDzB* & *BDzG*) envers les lignées cellulaires saine (Véro) et cancéreuses (HEp2 & A549) au microscope à contraste de phase *BDzG* (B, E, & H) et *BDzB* (C, F, & I) et Contrôle (A, D & G)" Cellules traitées uniquement avec le tampon de solubilisation", 24 h post inoculum. (b). Observation au microscope à contraste de phase de l'activité cytotoxique de la protéine cytotoxique PS1-*BDzG* à différents intervalles de temps (1, 2, 4 & 16 h) envers la lignée cellulaire HEp2.

b) Détermination du type de mort cellulaire induite par la PS1-*BDzG*

La détermination du type de mort cellulaire induite par la PS1-*BDzG* a été mise en évidence après coloration et révélation au microscope à fluorescence. La figure 69, montre des noyaux fragmentés et une chromatine condensée dans les cellules HEp2 traitées avec la fraction protéique cytotoxique (IC_{50}= 2,33 µg/ml). Alors que les noyaux des cellules contrôles (non traitées avec la fraction protéique cytotoxique) sont restées sous leur forme initiale et de couleur vert fluorescent.

Le marquage à l'acridine orange a révélé un effet apoptotique de la molécule avec apparition des cellules apoptotiques avec un grand nombre de cellules HEp2 en phase de mort programmée.

Le type de mort cellulaire induite est principalement l'apoptose.

La mort cellulaire programmée est un processus rapide (quelques heures). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir tout dommage infligé aux tissus alentours.

Le potentiel apoptotique sélectif de la PS1 sur les cellules cancéreuses et non sur les cellules saines confirme son appartenance à une classe privilégiée de protéines cytotoxiques anticancéreuses.

Ces résultats sont en accord avec ceux **d'Ohba *et al.*, (2009)** qui étaient les premiers à suggérer que leurs PS1Aa1- A1190 induisaient la mort cellulaire par apoptose. D'après eux, il y a une forte preuve que la PS1Aa1 induit l'apoptose dans les cellules Héla, car premièrement, l'activité cytocide de la PS1Aa1 est supprimée par des inhibiteurs synthétiques de la caspase. Deuxièmement, le traitement PS1Aa1 conduit à la dégradation des protéines liées à l'apoptose (activation), la procaspase-3 et la poly (ADP-ribose) polymérase, dans les cellules Héla. Des résultats similaires ont été obtenus par **Aboul soud *et al.*, (2019)** où ils estimèrent les niveaux d'expression de deux gènes marqueurs liés à l'apoptose, à savoir la caspsase 3 (hsCASP3) et la caspase 9 (hsCASP9) par RT-qPCR. La hausse significative des niveaux d'expression de l'ARNm des gènes hsCASP3 et hsCASP9 soutient l'hypothèse selon laquelle la susceptibilité observée des cellules HéLa aux protéines PS est médiée par l'activation de la voie d'apoptose extrinsèque.

La voie intrinsèque serait de ce fait engagée à la surface de la cellule par l'activation médiée par le récepteur de mort de CASP9, ou de CASP8/CASP10 comme principaux initiateurs, conduisant à l'activation de la CASP3 qui est considérée comme un effecteur. Il convient de

noter qu'une fois que le CASP3 est activé, la cascade de signalisation apoptotique ne peut être inversée ou arrêtée.

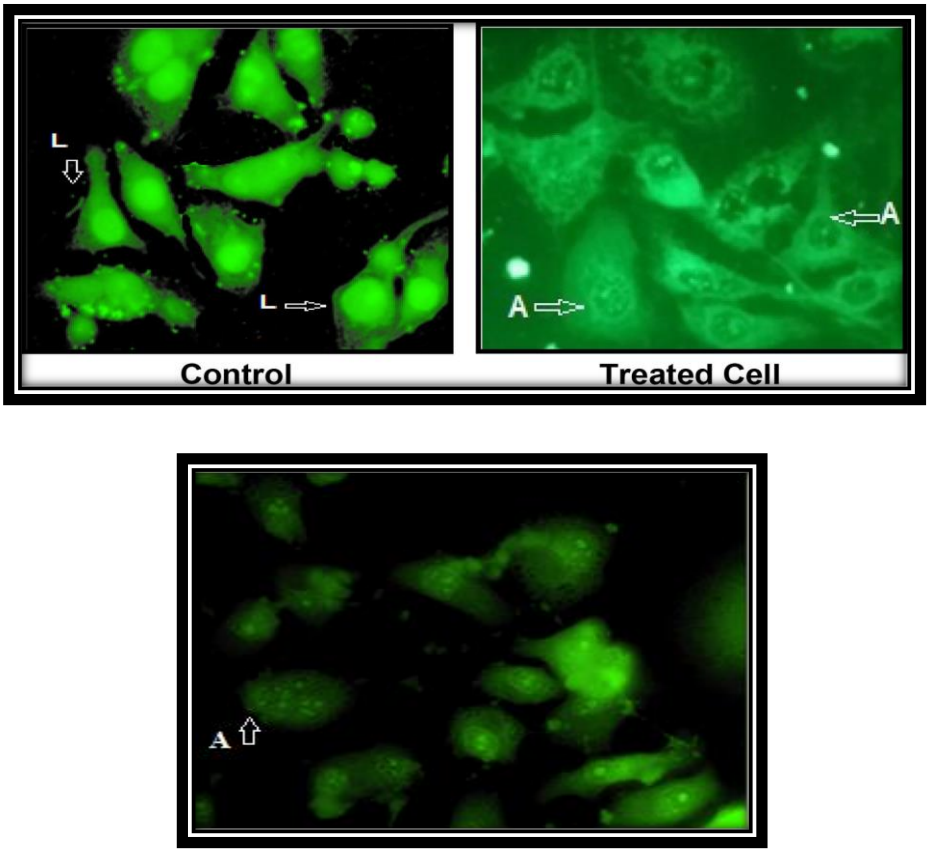


Figure 69 : Changements morphologiques des cellules HEp2 après 24h de traitement avec la protéine PS1-*BDzG*. Coloration à l'acridine orange (AO): cellules vivantes (L) et cellules apoptotiques (A) (G×40).

6. Activité cytotoxique du rayonnement ionisant

6.1. Caractérisation des lignées cellulaires

- **La radio- survie cellulaire et détermination de la fraction de survie (SF2)**

La quantification de la survie des cellules HEp2, A549 et Véro aux rayonnements gamma est déterminée par le test de clonogénicité, qui permet de dénombrer uniquement les cellules survivantes à l'irradiation et dont la capacité à former un clone n'a pas été altérée (Figure 70).

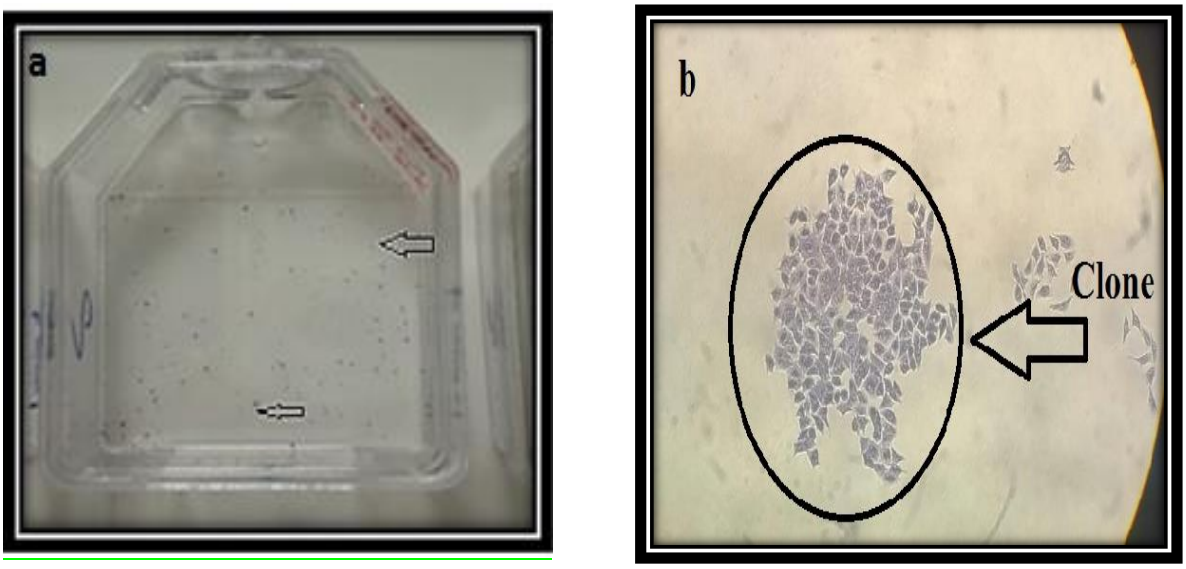


Figure 70: Observation à l'œil nu de clones (sous forme de points bleus) sur boite T25 **(a),** Observation au microscope à contraste de phase d'un clone cellulaire de la lignée A549 après coloration au bleu de Giemsa **(b)**.

Les clones formés de 50 cellules et plus sont comptés (Tableau 28 & Figure 70). Leurs proportions diminue lorsque les doses augmentent suivant un modèle mathématique décrit par des courbes exponentielles telles que présentés dans les (Figures 71-73).

La fraction de survie à 2 Gy (SF2) est obtenue à partir de l'équation linéaire quadratique calculée à partir des points expérimentaux. Etant supérieures à 0,5; les lignées A549 (SF2=0.740), HEp2 (SF2=0.585) et Véro (SF2=0.517) sont radiorésistantes.

Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés dans des études antérieurs. En effet Pour la lignée A549; **Cen *et al.*,(2009)** ont trouvés une SF2 de 0.7412, tandis que celle (**Qu *et al*., 2013**) était de 0.7360.

Pour la lignée HEp2 une SF2=0.592 a été obtenue par **Hui Qiu *et al*., (2015)** et enfin pour la lignée Véro une SF2=0.52 a été obtenue par **Elmaghraby, (2002**).

Pour les radiothérapeutes, le rapport α/β fournit des informations importantes sur la nature précoce ou tardive de la réponse du tissu irradié et sur l'effet du fractionnement de la dose.

Le rapport α/β est défini mathématiquement comme étant : « La dose pour laquelle la mort cellulaire liée à la composante linéaire est égale à la mort cellulaire liée à la composante quadratique ».

En radiothérapie, le rapport alpha/beta représente la capacité de réparation du tissu (cellules) considéré. Ainsi un tissu à faible capacité de réparation et donc radiosensible aura un rapport alpha/beta élevé supérieur à 10, à l'inverse un tissu à forte capacité de réparation et donc radio résistant aura un rapport alpha/beta faible inférieur ou égale à 3 **(Renoult, 2013).**

D'après nos résultats, le rapport α/β des trois lignées cellulaires varie entre (0.51-2.08) donc inferieurs à 3.Ce qui prouve encore une fois que nos lignées sont toutes radios résistantes.

Tableau 28: Caractéristiques radio-biologiques des cellules HEp2, A549 et Véro déterminés avec des paramètres dérivés des courbes dose-survie d'un modèle standard LQ

Type cellulaire	TD (h)	PE	-α (Gy^{-1})	- β (Gy^{-2})	α/β (Gy)	SF2 (Gy)
Cellules HEp2	**21**	**0,040**	**-0,150 ±0,26**	**-0,070±0,08**	**2, 08**	**0, 585**
Cellules A549	**28**	**0.054**	**-0.032± 0.08**	**-0.062 ±0.02**	**0.51**	**0.740**
Cellules Véro	**22**	**0.038**	**-0.152±0.12**	**-0.089±0.03**	**1.70**	**0.517**

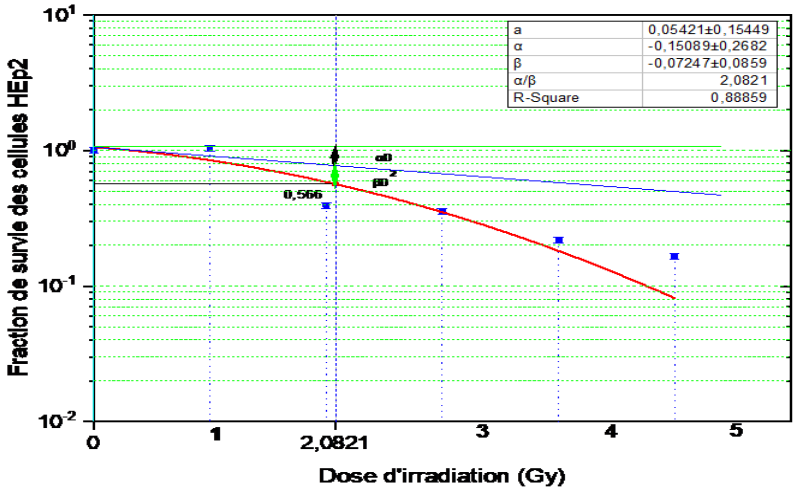


Figure 71 : Courbe de survie des cellules HEp2

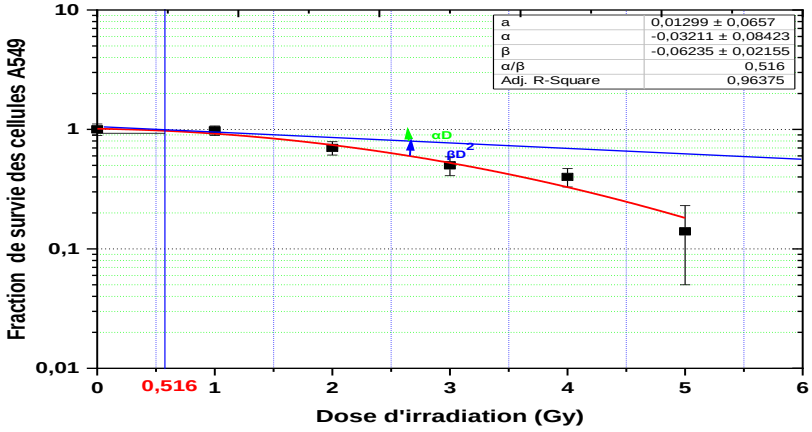


Figure 72 : Courbe de survie des cellules A549.

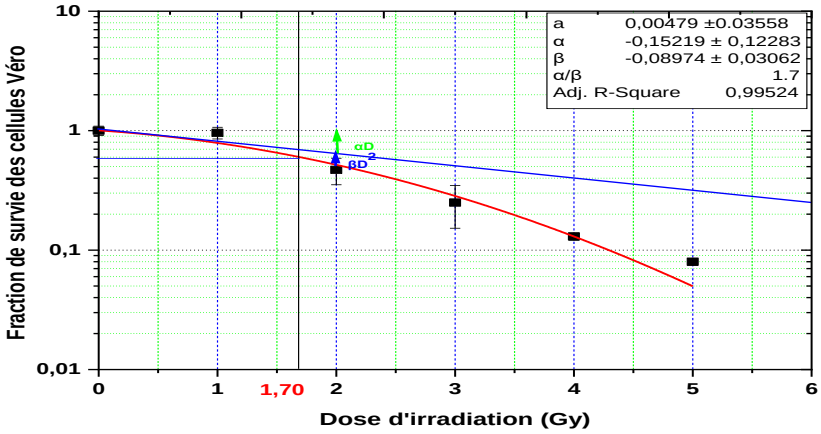


Figure 73 : Courbe de survie des cellules Véro.

6.2. Evaluation de la survie cellulaire aux rayonnements

Les taux des cellules viables aux doses croissantes d'irradiation sont mis en évidence par le test MTT. L'irradiation des HEp2, A549 et Véro a montré une radiosensibilité différente de ces cellules exposées aux doses (1, 2, 3, 4 et 5 Gy).
Les résultats sont montrés sous forme d'histogrammes tracés à l'aide du logiciel Origin 2019b représentants le pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la dose délivrée (Gy).

D'après les résultats obtenus (Figure 74), nous remarquons que le taux de survie des cellules irradiés diffère d'une lignée à une autre. En effet, la viabilité des cellules HEp2 irradiées à 1 et 2 Gy n'a pas été modifiée. Au contraire, nous observons même une légère prolifération cellulaire (à 1Gy). Cependant à partir de 3Gy on remarque que les HEp2 commencent à être de plus en plus radiosensibles en fonction de l'augmentation de la dose d'irradiation jusqu'à atteindre les 46,55±3.7% à 5Gy. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'à des doses aussi faibles (1-3Gy), les cellules HEp2 ont pu survivre et déclencher le processus de réparation des lésions qui reflète l'activation du mécanisme de protection **(Joiner *et al.*, 1996).**

Pour la lignée A549, on ne remarque pas une diminution significative de la viabilité cellulaire et ce même à une dose de 5 Gy puisque elle atteint les 73.73±1.5%. Ce résultat est en accord avec ceux de **Li *et al.*, (2020)** où il trouvèrent que l'apoptose n'a pas été induite significativement chez les cellules A549 traitées par 2 et 4 Gy, mais qu'elle a été induite significativement que lorsque la dose de rayonnement a été portée à 6 Gy.

Ceci a déjà été constaté dans des études antérieures où ils ont révélé que les radiations à faibles doses peuvent amener les cellules tumorales à acquérir des capacités de migration et d'invasion élevées et qu'à une irradiation de 4 Gy la prolifération cellulaire était inhibée (**Moncharmont *et al.*, 2014).**

D'après la figure 74, on constate que des doses d'irradiations comprises entre 1 et 5Gy n'ont aucun effet sur la survie cellulaire des cellules Véro.

Donc, toutes les cellules testées ne commençaient pratiquement à être affectées qu'aux doses supérieures à 4 Gy. Dans ce cas, un traitement radio-sensibilisateur par un adjuvant tel que notre molécule cytotoxique (PS1-*BDzG*) serait fort intéressant et devrait être entrepris.

En ce qui concerne les cellules saines Véro, leurs capacité à résister au rayonnement est une caractéristique recherchée. C'est effectivement le souhait de tout radiothérapeute et le

challenge qu'il s'impose pour que les cellules saines entourant la tumeur soient radio-résistantes. Cela limiterait de manière extraordinaire les dégâts radio-induits lors de la radiothérapie, malheureusement, ce n'est pas toujours le cas !!!

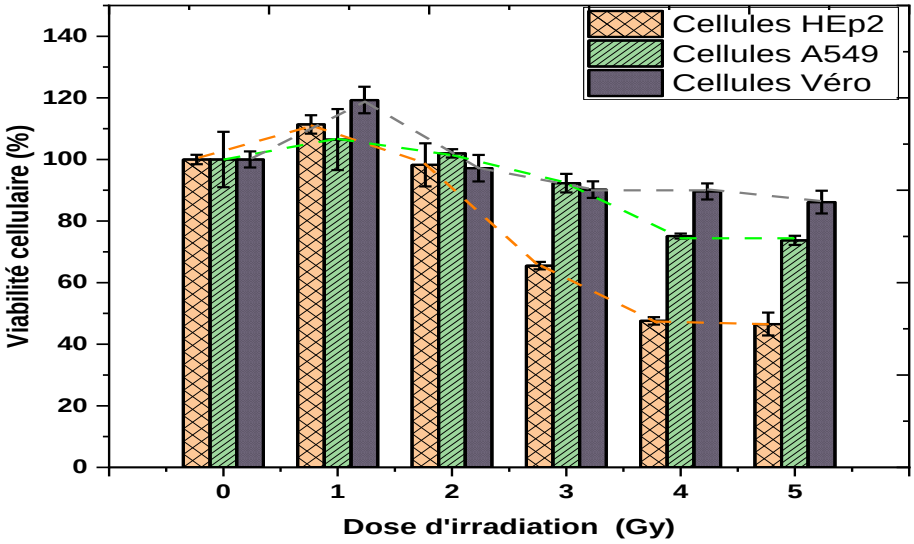


Figure 74 : Histogramme représentant la comparaison de l'effet de la dose d'irradiation au rayonnement gamma envers la viabilité des trois lignées cellulaires évalué par le test MTT.

Nous pouvons conclure que l'évaluation de la survie cellulaire aux rayonnements, ne montre pas un effet significatifaux faibles doses (1-3 Gy) envers les cellules HEp2, A549 et Véro. Par ailleurs l'augmentation de la dose d'irradiation à ≥4 Gy sensibilise les mêmes cellules de manière différente.

7. Activité cytotoxique concomitante (PS1-*BDzG* + rayonnement ionisant)

Dans cette étape, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet concomitant des deux traitements (radiothérapie néo-adjuvante) au cours desquels l'action cytotoxique préférentielle de notre protéine (PS1-*BDzG*) démontrée envers les cellules cancéreuses et non saines en se fixant sur un récepteur membranaire (Beclin-1) enclenchant ainsi un mécanisme réactionnel aboutissant à l'apoptose qui serait probablement amplifié par les rayonnements ionisants.
L'étude *in-vitro* de l'effet concomitant de la PS1-*BDzG* et du rayonnement gamma émis par une source de cobalt-60 a été réalisée envers les mêmes cellules cancéreuses HEp2, A549 et saines Véro.

À cette fin, les cellules ont été réparties en différents groupes, à savoir :

- Contrôle (sans aucun traitement),
- Traitement à la PS1-*BDzG* seule,
- Radio-traitement seul aux doses de 1 à 5 Gy,
- Radio-traitement +PS1-*BDzG*,

Les effets ont ensuite été évalués et les résultats ont révélés, après 24h d'incubation, un effet très significatif de la PS1-*BDzG* seule sur la mort des cellules cancéreuses. Les concentrations inhibitrices obtenues (IC_{50}) envers les cellules HEp2 et A549 sont de l'ordre de 2.33±2.18 µg/ml et 18.54±1.268 µg/ml respectivement (Figure 66.a & Annexe 10-Tableau I); (Figure 66.b & Annexe 10-Tableau II) **(Aberkane *et al*., 2020).**
Contrairement aux cellules cancéreuses, chez les cellules saines Véro, le traitement par la PS1-*BDzG* seule n'a pas eu d'effet significatif avec une IC_{50} de 63.44±2.5 µg/ml (Figure 66.c & Annexe 10-Tableau III).

L'effet du radio-traitement seul envers les trois lignées n'est pas très remarquable, des différences insignifiantes ont été trouvées comparativement au groupe témoin (Figure 74).

Les résultats ont montrés que les 3 lignées (HEp2, A549 et Véro) sembleraient résister aux doses reçues. Lorsque la dose était augmentée à 4 Gy, les taux de mortalité cellulaire étaient significativement plus élevés que dans le groupe témoin (47.58±1.2 % pour les HEp2), (75.11±0.8 % pour les A549) et (89.62±2.6 % pour les Véro). La lignée Véro semble être la plus radiorésistante, suivie des cellules A549 et HEp2.

De ce fait, significativement la radiosensibilité n'est apparente qu'aux doses supérieures à

4Gy. Ce résultats est en accord avec les résultats de travaux antérieurs **(Joiner *et al*., 1996; El maghraby, 2002 ; Li *et al*., 2020)**.

Cette réponse est probablement due à l'insuffisance de l'énergie transférée des photons aux cellules pour infliger des dommages à l'ADN et augmenter le taux de mortalité cellulaire.

Par ailleurs, plus on augmente la dose plus la probabilité de générer et d'accumuler des radicaux libres radio-induits dans l'environnement cellulaire est grande **(Wardman *et al*., 2009; Dole, 2013).**

En ce qui concerne la radiothérapie néoadjuvante envers les cellules HEp2, aucune différence significative n'a été constatée en comparant les résultats avec ceux du groupe traité seulement par la PS1-*BDzG* (IC_{50}=2.33µg/ml).

En effet, les IC_{50} obtenues relativement aux différentes doses d'irradiation (4.47±1.29, 4.62±1.27, 4.40±1.29, 3.51±1.58 et 2.51±1.49 µg/ml pour 1, 2, 3, 4 et 5 Gy respectivement) ne varient pas significativement (Figures75 & 78). Cependant, la légère augmentation aperçue peut être due au fait que certaines cellules qui avaient subi des dommages minimes induits par les traitements ont pu réparer leurs dommages, relancer leur prolifération et poursuivre ainsi leur croissance, d'où l'augmentation du nombre de cellules viables. Ce résultat est similaire à celui obtenu par **Fard *et al*., (2017)** qui ont étudiés les effets de la thérapie néoadjuvante (Docetaxel +rayonnements ionisants) envers les cellules MCF-7.

La radiothérapie néoadjuvante n'avait pas amélioré les résultats obtenus par la monothérapie à la PS1-*BDzG* pour endommager et tuer les cellules cancéreusesHEp2, **Pradier *et al*., (2001)** ont fait relativement état de la même conclusion.

Cependant, pour les cellules A549, aucune différence significative n'a été constatée comparativement aux résultats du groupe traité seulement par la PS1-*BDzG* (IC_{50}=18.54µg/ml). Les IC_{50} de 19.65±4.71, 16.13±5.11et 14.188±5.04 µg/ml obtenues pour les doses respectives de 1, 2 et 3 Gy varient légèrement. Par contre pour la dose 4 Gy, l'IC_{50} de 8.13±6.07µg/ml obtenue est pratiquement de moitié par rapport au témoin traité uniquement à la PS1-*BDzG*, jusqu'à atteindre une IC_{50} de 5.32 ±6.14µg/ml à une dose de 5Gy (Figures 76 & 78).

Nos résultats montrent ainsi un effet synergique de la radiothérapie combinée à la PS1-*BDzG* sur la mortalité des cellules A549 comparativement aux effets obtenus séparément. Cet effet

est clairement démontré par une IC_{50}<10.

D'autre part, comme discuté en **Section 5.3** de ce chapitre les cellules saines "Véro" n'ont pas été altérées par la monothérapie à la PS1-*BDzG*(IC_{50}=63.44±2.50 µg/ml) et ont même survécus aux mêmes doses d'irradiation. A noter que la survie cellulaire a été estimée à 86,16±3.7 pour la dose de 5Gy %. Ce résultat est assez encourageant et satisfait le challenge de la radiothérapie d'affecter principalement les cellules cancéreuses sans pour autant affecter les saines **(Fard *et al*., 2017)**.

La radiothérapie néoadjuvante a permis de réduire la concentration de la PS1-*BDzG* en particulier à la dose 5 Gy, oùnous avons obtenu une IC_{50} de 30,77±5,06 µg/ml (presque la moitié de celle obtenue avec la PS1-*BDzG* seule) (Figures 77&78). Cet effet synergique, bien démontré, a considérablement amélioré la radiosensibilité des Véro.

Pour l'estimation de cet effet radio-sensibilisant de la PS1-*BDzG* sur les cellules tumorales HEp2 & A549, un facteur de synergie (FS) a été calculé à l'aide de l'équation suivante **(Foucquier *et al*., 2015)**:

$$FS = \frac{mort\ cellulaire\ induite\ par\ la\ thérapie\ néoadjuvante}{mort\ cellulaire\ induite\ par\ (PS1-BDzG)seule + mort\ cellulaire\ induite\ par\ le\ rayonnement\ seul}$$

Un FS>1 montre un effet synergique du traitement concomitant de la PS1-*BDzG* et la radiothérapie sur la mortalité cellulaire.

A l'inverse un FS<1 démontre qu'il n'ya aucun effet synergique des deux traitements concomitants (**Forouzmand *et al.*,2018**).

Les résultats représentés dans le tableau 29confirment ceux relatés plus haut et suggèrent que la radiothérapie néoadjuvante utilisant la PS1-*BDzG* induit des effets synergiques sur la mort des cellules A549 (FS = 1,46) et produit des résultats plus significatifs que la monothérapie. Ce qui n'est pas le cas des cellules HEp2, où la thérapie utilisant la PS1-*BDzG* suffit amplement (FS=0.71).

Pour les cellules saines Véro, d'une part le facteur de synergie calculé de 1.63 suggérant que la radiothérapie néoadjuvante utilisant la PS1-*BDzG* et les radiations ionisantes a un effet

synergique sur la mort cellulaire et d'autre part une IC_{50} de 30,77±5,06 µg/ml est nécessaire.

Tableau 29: Les facteurs de synergie en fonction des lignées cellulaires

Lignée cellulaire	Facteur de synergie (FS)
HEp2	**0.71**
A549	**1.46**
Véro	**1.63**

Au niveau moléculaire, l'accumulation de cytochrome p53,dû en réponse aux rayonnements ionisants, provoque un blocage du cycle cellulaire en G1, favorisant ainsi la réparation d'ADN et /ou la mort cellulaire selon la lignée. Il est à noter que le p53 joue un rôle controverse concernant la radiosensibilité des tumeurs. L'hétérogénéité des résultats est due au fait que les lignées cellulaires sont génétiquement différentes **(Böhnke *et al.*, 2004).**

Par ailleurs, il été proposé l'hypothèse que la radiorésistance est fort probablement due à l'acquisition de changements (mutations) au niveau moléculaire rendant les cellules insensibles. C'est pour cela que le succès de la radiothérapie dépend principalement et traditionnellement de la dose totale délivrée uniformément à la tumeur. Cependant, la délivrance de cette dose est limitée par la tolérance des tissus sains dans le volume d'irradiation **(Emami *et al.*, 1991).**

En conclusion de tous ces résultats obtenus, on peut se permettre d'avancer que le but de notre travail est atteint. En effet, l'objectif de n'importe quel traitement contre le cancer c'est d'éliminer au mieux les cellules cancéreuses et préserver les cellules saines environnantes.

La radiothérapie néoadjuvante proposée, pourrait éliminer de manière satisfaisante les cellules cancéreuses A549 avec de faibles concentrations en PS1-*BDzG* et aux doses de radiations ionisantes n'altérant pas les cellules saines Véro.

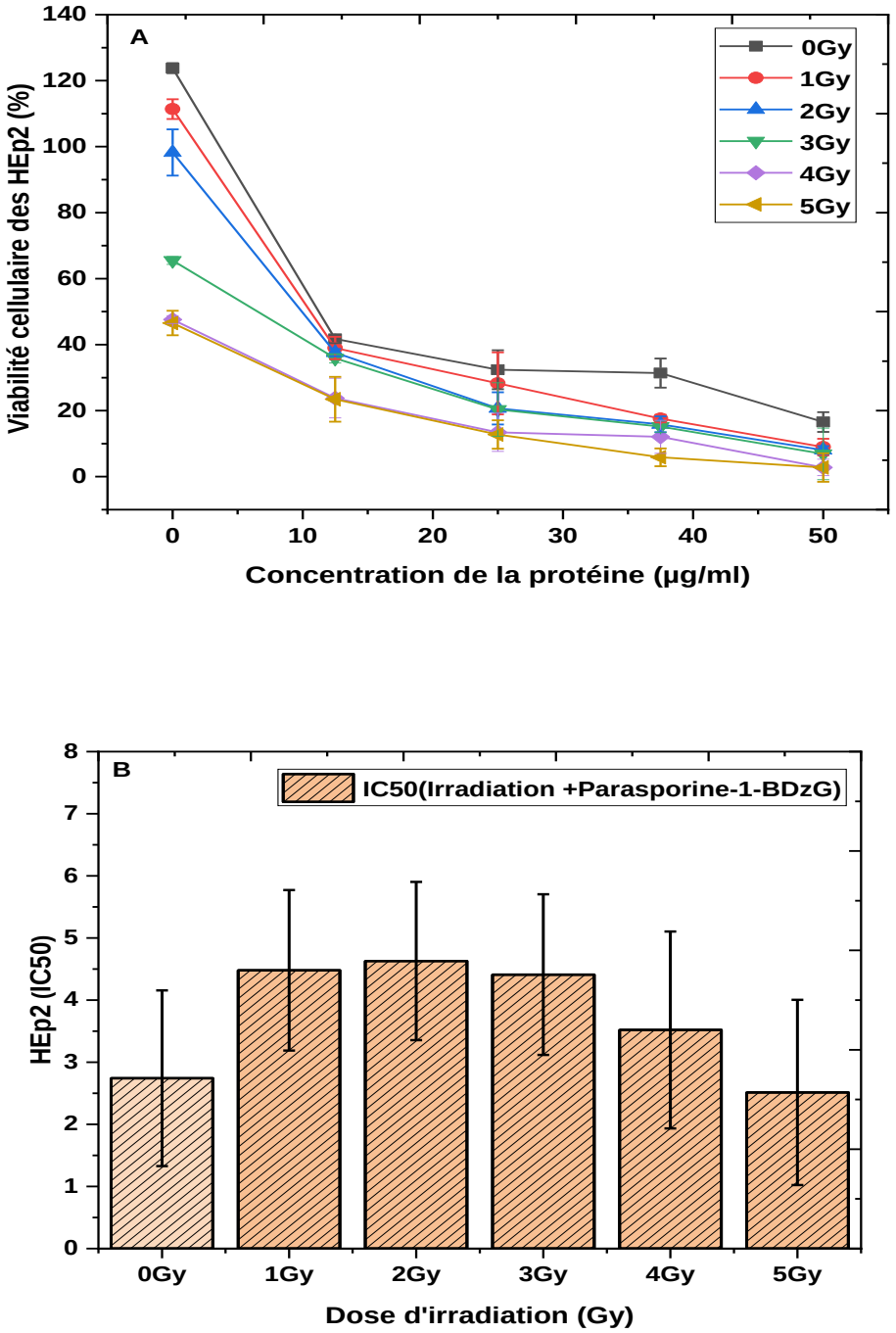


Figure 75: (A) Estimationde la viabilité cellulaire des HEp2 sous l'effet du traitement concomitant (PS1-*BDzG* + irradiation gamma)**; (B)** Histogramme représentant les IC_{50} (µg/ml) du traitement concomitant envers la lignée HEp2. Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3).

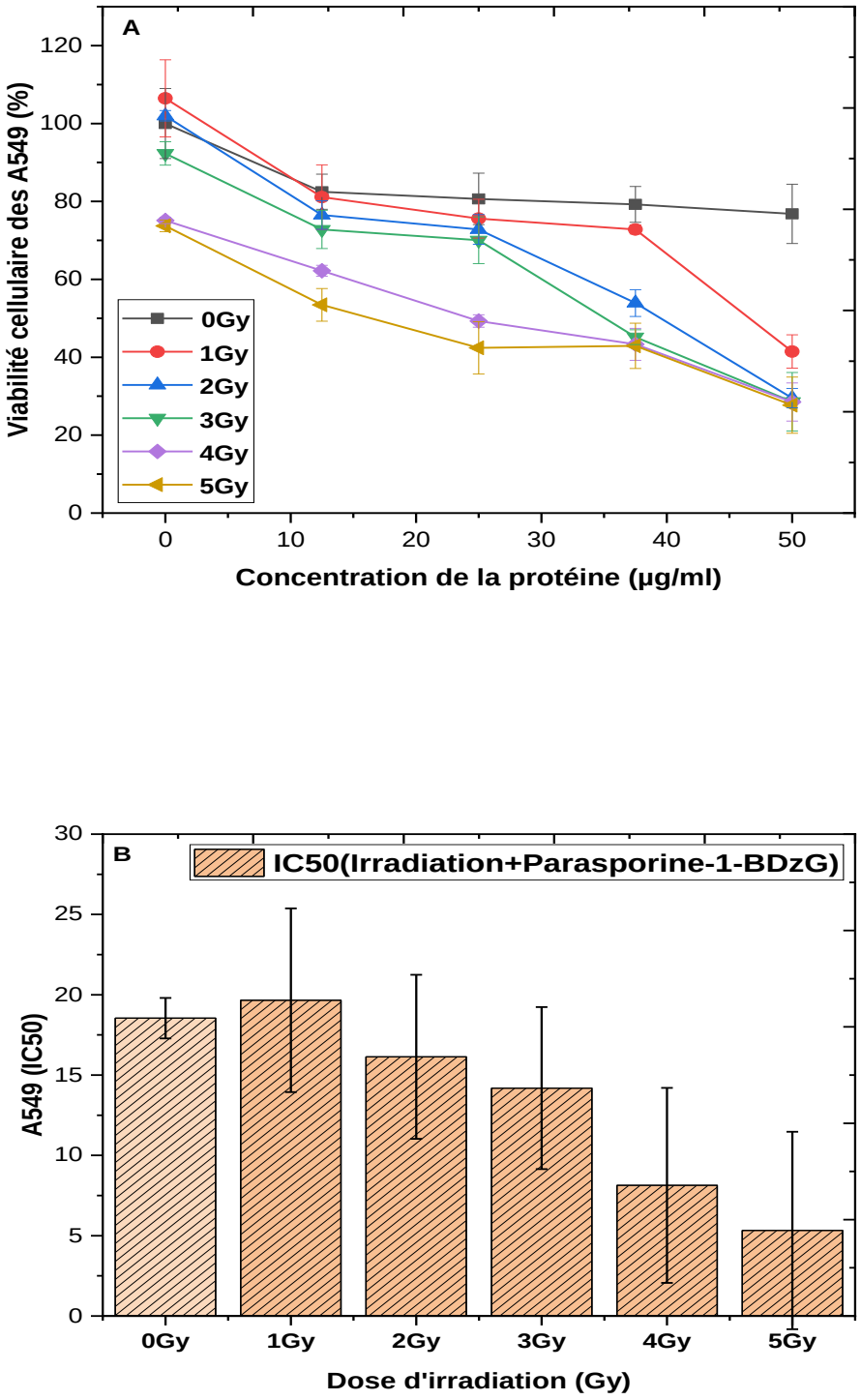


Figure 76: (A) Estimationde la viabilité cellulaire des A549 sous l'effet du traitement concomitant (PS1-*BDzG* +irradiation gamma) **(B)** Histogramme représentant les IC_{50} (µg/ml) du traitement concomitant envers la lignée A549. Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3).

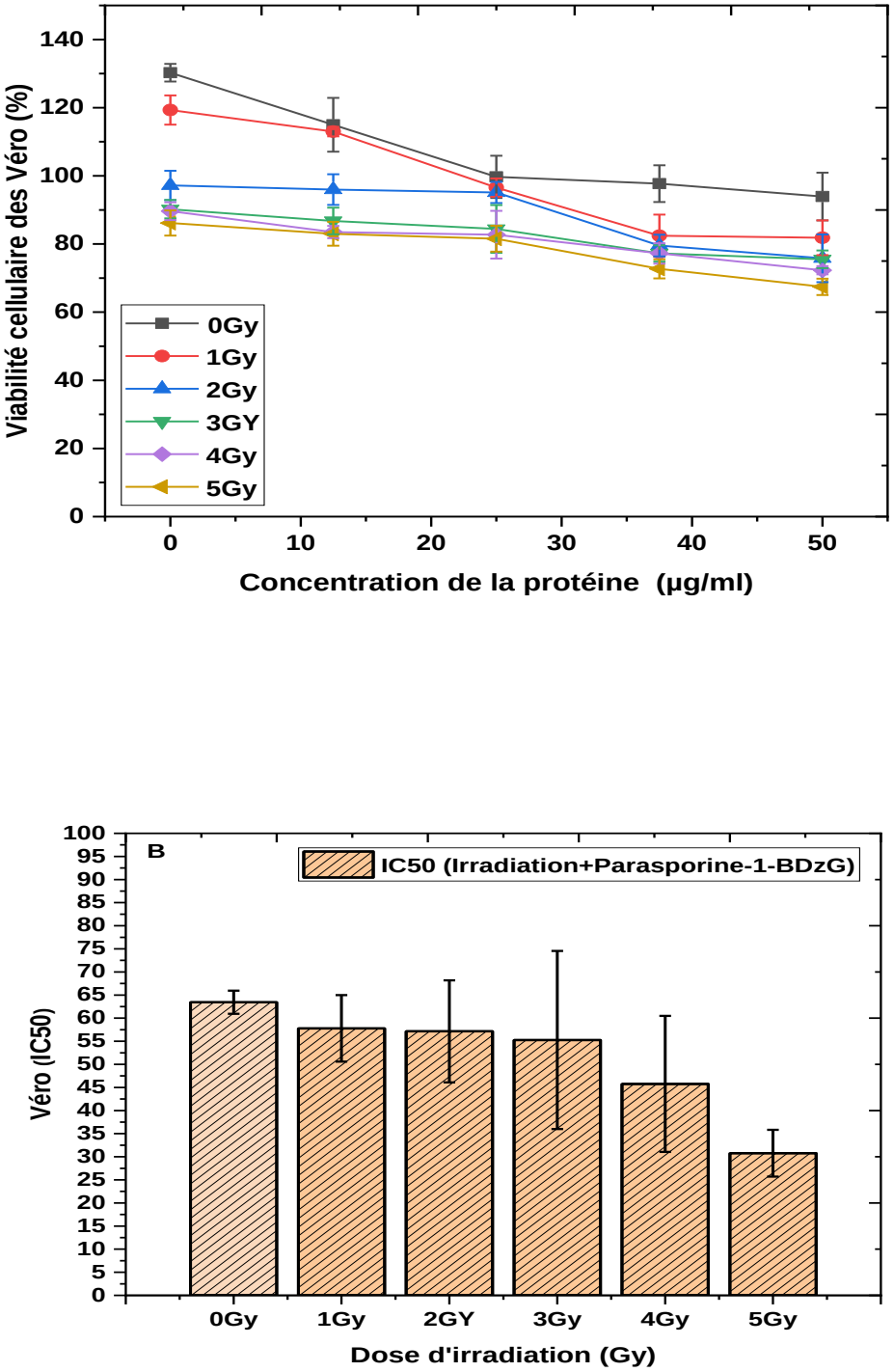


Figure 77: (A) Estimationde la viabilité cellulaire des Véro en fonction du traitement concomitant (PS1-*BDzG* +irradiation gamma); **(B)** Histogramme représentant les IC_{50} (µg/ml)du traitement concomitant envers la lignée Véro. Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3).

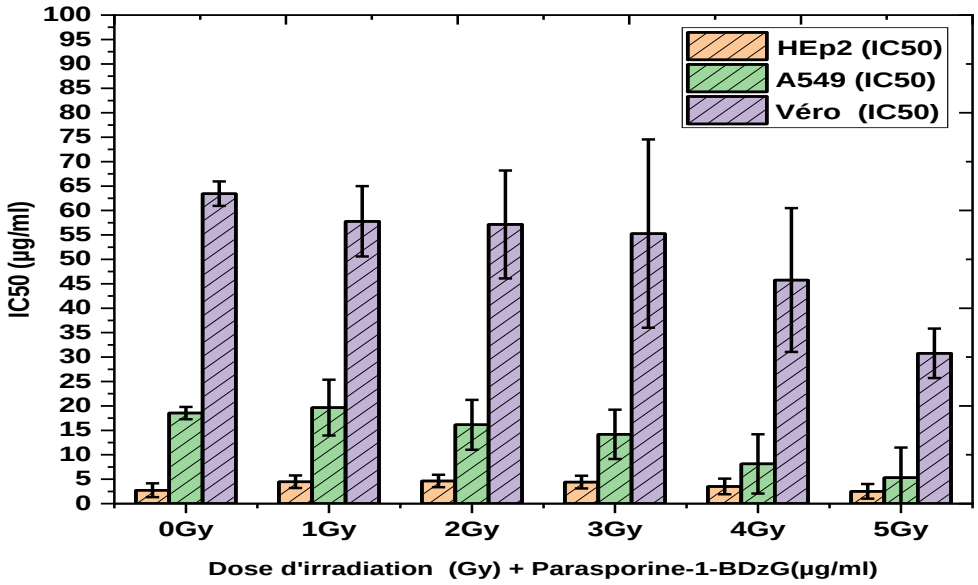


Figure 78: Histogramme représentant les IC_{50}de la thérapie néoadjuvante (PS1-*BDzG*+irradiation gamma) envers les trois lignées cellulaire (HEp2, A549 et Véro).Les données sont exprimées en (moyenne ±SD) (n=3).

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Conclusion générale

Ces dernières années, les recherches concernant les causes du cancer, les bases moléculaires de la transformation maligne qui contribuent aux risques individuels du cancer ont fait d'immenses progrès. La découverte des voies de la signalisation cellulaire a permis le développement de nouveaux médicaments anticancéreux plus spécifiques et par conséquent moins pénibles pour les patients. Malgré tous ces progrès, à ce jour, il n'existe pas d'anticancéreux dirigés spécifiquement contre les cellules cancéreuses.

Les principales complications morbides associées au cancer sont la résistance à la thérapie conventionnelle du cancer (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie) ainsi que l'apparition de métastases. En effet, le problème du traitement du cancer réside essentiellement dans le fait que les cellules cancéreuses métastasiques résistent aux traitements car elles résultent de populations de cellules migrantes qui sont protégées contre l'apoptose. Malheureusement, un grand nombre de patients atteints de cancer présentent des métastases au moment du diagnostic.

La découverte et le développement d'autres molécules de différentes origines (végétale, microbienne ou autre) ayant une activité cytotoxique et ayant pour cible spécifique les cellules cancéreuses constituent une très grande avancée dans ce domaine.

Ce travail a montré les potentialités de souches appartenant au groupe *Bacillus* à synthétiser des molécules actives pouvant trouver leurs applications aussi bien dans la lutte biologique que dans le domaine médical.

L'étude que nous avions abordée a permis de prouver l'activité cytotoxique d'une protéine d'origine bactérienne de l'espèce *Bacillus thuringiensis* isolée du sol Algérien envers des cellules cancéreusesissues de lignées référencées.

Des échantillons de sol ont étés collectés à partir d'une dizaine de points de prélèvements de différentes niches écologiques (sol rhizosphérique ou non rhizosphérique) du territoire national, à savoir : Adrar, Alger, Boumerdes, Tizi-ouzou, Bechar, Bejaia, Biskra, El-Menia, Sidi-Bel-Abbès et Tamanrasset.48 souches de type *Bacillus spp*. ont été isolées et l'observation au microscope a permis la sélection d'une dizaine de souches de type *Bacillus spp.*par la présence du cristal parasporal .Le Bt index global calculé a été trouvé de 0.208.

Une identification complète de ces dix souches de *Bacillus thuringiensis* natives du sol Algérien a été entreprise.

La morphologie microscopique de la protéine cristalline (cristal) est sous troisprincipales formes bipyramidale chez 4 souches (S1, S4, S7, S8); sphérique chez 4 souches (S2, S3, S5,

S9) et cubique chez 2 souches (S6, S10).

Les dix souches sélectionnées appartiennent au groupe *B. cereus* et ont un haut pouvoir de synthèse d'enzymes. Le biotypage biochimique confirme l'appartenance à seulement quatre biotypes différents *thuringiensis, sotto, kurstaki* et *dendrolimus.*
Deux souches seulement ne sont pas hémolytiques, la S2 et la S7 et ont été retenues pour la suite de l'étude.

Le test de résistance aux antibiotiques a montré que les souches sont sensibles à presque tous les antibiotiques à part l'ampicilline, et pour les souches S4, S5, S7 et S10 à la Pénicilline G aussi.

Les résultats de l'antagonisme antibactérien vis-à-vis de cinq germes pathogènes sont évalués et a remarqué que *Micrococcus sp* est le germe le plus sensible vis-à-vis de ces souches, contrairement à *E.coli* qui est la plus résistante par rapport aux autres germes testés (*SARM, SASM et P.aeruginosa)*. L'antagonisme vis-à-vis de ces autres germes pathogènes testés est plus ou moins moyen et variable.

L'évaluation de l'antagonisme de ces dix souches de *Bacillus* vis-à-vis d'une archaebactérie (*Natronococcus sp)* a montré que presque toutes les souches testées sont dotées d'une activité anti-archaebactérie. En effet, l'enjeu est de cribler des molécules pouvant constituer une ébauche à l'activité anti-tumorale.
L'analyse des résultats de l'activité antifongique montre une grande variabilité dans le spectre d'activité des souches. Parmi les 10 souches testées, 2 (S4 et S8) ne montrent aucune activité vis à vis des champignons testés (*Thielaviopsis sp; Aspergilus niger DSM 737; Monilia sp; Colletotricum sp; Aspergilus flavus; Fusarium oxysporum DSM 62297 T)*. Les autres souches présentent une activité antagoniste contre au moins un champignon. En effet, deux souches (S1 et S2) sont actives sur 3 champignons, 1 souche (S6) présentant une activité vis à vis de deux champignons, 5 souches (S3, S5, S7, S9 et S10) inhibent la croissance d'un champignon. Les activités les plus importantes ont été observées avec la souche S1 qui inhibe significativement la croissance du mycélium de 3 champignons (*Aspergilus niger DSM 737, Monilia sp et Colletotricum sp).*
L'identification génétique par *16S* rRNA confirme l'appartenance des dix souches *(S1(BDzA), S2(BDzB), S3(BDzC), S4(BDzD), S5(BDzE), S6(BDzF), S7(BDzG), S8(BDzH), S9(BDzI), S10(BDzJ)) à Bacillus thuringiensis.* Ces dernières ont été enregistrées dans la banque de données GenBank et un numéro de série a été attribué à chacune d'elles.

Une extraction des protéines cristallines des deux souches non hémolytiques *BDzB* et *BDzG* par un système de séparation biphasique a permis d'obtenir des cristaux pure à 98%.

Apres solubilisation et activation de ces cristaux (pro-protéines cristallines), une purification par chromatographie d'exclusion moléculaire a permis d'obtenir plusieurs fractions protéiques de poids moléculaires divers.

L'analyse électrophorétique a permis de déterminer le poids moléculaire des pro-protéines purifiées et des fractions actives. Les poids moléculaires des pro-protéines des souches *BDzB* et *BDzG* sont de 37 et 81 kDa respectivement. Ils laissaient suggérer que ces protéines pourraient être des parasporines 2 & 1 respectivement.

La protéolyse de la pro-protéine de 37 kDa de la souche *BDzB* par la protéinase K a permis d'obtenir un peptide de 20 kDa, qui ne correspond pas au poids moléculaire attendu de la protéine active de la parasporine 2 de 30 kDa.

La protéolyse de la pro-protéine de la souche *BDzG* de 81 kDa par la trypsine a permis d'obtenir des peptides de différents poids moléculaires allant de 18 à 58kDa. Ces résultats sont très proches de ceux de la parasporine1de la souche A1190où des peptides de 56 et 15 kDa ont été obtenus après activation trypsique. Ce qui nous amène à suggérer encore une fois que la souche *BDzG* pourrait être une souche productrice de PS1.

Cependant afin de confirmer avec certitude ces hypothèses, une analyse PCR du gène codant pour ces protéines (PS1,PS2) a été réalisée.

L'analyse PCR des gènes codant pour les quatre protéines (PS1, PS2, PS3 et PS4) a donné un seul résultat positif avec une bande de 2694 bp seulement pour la souche *BDzG*. Cette pro-protéine de 81 kDa est bel et bien une parasporine 1.

Tandis que l'absence d'une bande attendu de 700 bp confirme aussi que la souche *BDzB* n'est pas une souche productrice de parasporine 2 ni d'ailleurs d'aucune autre parasporine.

Le séquençage NH_2 terminal des 21 derniers acide aminés de cette protéine (PS1-*BDzG*) a permis en premier lieu de nous renseigner sur la pureté de la protéine MGPFSNYSEQKYPESNNDQQI (GenBank accession number: **MN637834**) et aussi sur la similitude des séquences comparant à celle de PS1 déjà identifiées.

Parmi toutes les souches isolées et identifiées, une seule est productrice d'une parasporine: la PS1-*BDzG* 'MN637834'(GenBank).

L'étude de l'activité cytotoxique de la protéine activée de la souche *BDzG* envers les lignées cellulaires a montré que notre PS1-*BDzG* a un effet cytotoxique remarquable envers les cellules cancéreuses de larynx humain (HEp2) à une IC_{50} de 2.33µg/ml, alors que cet effet est

moins révélé chez les cellules cancéreuses de poumon (A549) à une IC_{50} de 18.58µg/ml. Par ailleurs, chez les cellules saines (Véro), cette activité cytocide est quasi nulle puisque le taux de survie cellulaire >70%.

Une capacité d'action cytotoxique sélective de la PS1-*BDzG*est mise clairement en évidenceenvers les lignées cellulaires. Cette action préférentielle pourrait être au fait que les cellules tumorales possèdent des récepteurs membranaires que la PS1-*BDzG* reconnait très rapidement (quelques heures) et de ce fait le mécanisme réactionnel aboutissant à la mort cellulaire est enclenché.D'autant plus qu'on a pu démontrer que le type de mort induite est l'apoptose (mort cellulaire programmée).

L'étude de l'effet des rayonnements gamma sur les lignées cellulaires A549, HEp2 et Véro ainsi que le calcul de leurs fractions de survie (SF2) et du rapport α/β, a permis d'affirmer que ces dernières étaient toutes radio-résistantes. Ce n'est qu'a une dose > 4Gy que l'on observait une faible radio sensibilité.

Pour pallier à ce problème, l'effet concomitant des deux traitements (Rayonnement δ+ PS1-*BDzG*) a été étudié. En effet, le but était de radio-sensibiliser de manière préférentielle les cellules cancéreuses et non saines par la protéine cytotoxique (*BDzG*-PS1). Le mécanisme d'apoptose des cellules tumorales enclenchée par la molécule est amplifié par les rayonnements ionisants.

Les résultats suggèrent que cette radiothérapie néoadjuvante utilisant la PS1-*BDzG* et les radiations ionisantes a un effet synergique sur la mort des cellules A549 et produit des résultats plus significatifs que les modalités de monothérapie, ce qui n'est pas le cas des cellules HEp2, où la thérapie utilisant la PS1-*BDzG* suffit amplement.

En ce qui concerne les cellules saines Véro, d'une part un facteur de synergie de 1.63 a été calculé qui suggère que cette radiothérapie néoadjuvante a un effet synergique sur la mort cellulaire, d'autre part une IC_{50} de 30,77±5,06 µg/ml est nécessaire.

La radiothérapie néoadjuvante proposée pourrait éliminer de manière satisfaisante les cellules cancéreuses A549 avec de faibles doses de PS1-*BDzG* et de radiations ionisantessans altérer les cellules saines (doses ne rendant pas les cellules Véro radiosensibles).

Tous ces résultats, suggèrent que la PS1-*BDzG* isolée du sol Algérien peut être un candidat potentiel dans les nouvelles thérapies anticancéreuses.

❖ **Perspectives**

Au vu des résultats obtenus et en continuité de ce travail et en perspectives, il serait intéressant de:

- Etudier le mécanisme réactionnel menant à la mort cellulaire par apoptose engendré par la PS1-*BDzG*, et de ce fait déterminer le type de caspases mises en jeu par la technique de Western blot.
- Mise en évidence de l'effet de la PS1-*BDzG* sur le cycle cellulaire par cytomètrie en flux
- L'identification des récepteurs membranaires afin d'approfondir la compréhension de la spécificité de la PS1-*BDzG* et l'évaluation d'une application potentielle de cette connaissance dans le domaine médical.
- Poursuivre l'étude du traitement concomitant établi (PS1-*BDzG*+Rayonnement δ) par des essaies *in-vivo*.
- Optimiser l'étude du traitement concomitant établi (PS1-*BDzG*+Rayonnement δ) à d'autres types de rayonnements, d'autres gammes de doses, d'autres modalités de combinaison du traitement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abe Y., Shimada H., Kitada S., (2008) Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumour activity. J. Biochem. 143: 269–275.

AbeY., InoueH., AshidaH., MaedaY., KinoshitaT., KitadaS., (2017) Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytocidal oligomerization of an antican- cer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from Bacillus thuringiensis strain A1547. Journal of Invertebrate Pathology, 142, 71–81. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.008.

Aberkane L., Nacer-Khodja A., Djenane Z.,Djouadi LN., Ouafek A., Bouslama L, Grib H., Mameri N., Nateche F., Djefal A., (2020) *In- vitro* Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus thuringiensis* Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers. Current Microbiology.77:405–414.

Abou El-Hag H., Safhi MA., (2011) Antimalignancy Activity of *Bacillus thuringiensis* Serovar Dakota (H15*) in- vivo* . World journal of Medical Sciences 6(1): 06-16.

Aboul-Soud Mourad MAM., Al-Amri MZ., Kumar A., Al-SheikhYA., Ashour AE., El-Kersh TA., (2019) Specific cytotoxic effects of parasporal crystal proteins isolated from native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* strains against cervical cancer cells. *Molecules* 24:506. https ://doi.org/10.3390/molecules2 40305 06.

Agaisse H., Gominet M., Okstad OA., Kolsto AB., Lereclus D., (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol. 32:1043-2053.

Akiba T., Abe Y., Kitada S., Kusaka Y., Ito A., Ichimatsu, T., Harata, K. (2004). Crystallization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal activity against human cells. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 60 (12): 2355-2357. doi: 10.1107 / s0907444904026307.

Akiba T., Abe Y., Kitada S., Kusaka Y., Ito A, et *al.*, (2009) Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. Journal of molecular biology. 386: 121–133. doi: 10. 1016/j.jmb.2008.12.002 PMID: 19094993.

Akiba T., Okumura S., (2017) Parasporins 1 and 2: Their structure and activity.Journal of Invertebrate Pathology : 44-49.doi: 10.1016/j.jip.2016.10.005.

AmanoH., Yamagiwa M., Akao T., Mizuki E., Ohba M, Sakai H., (2005) A novel 29-kDa Crystal Protein From *Bacillus thuringiensis* Induces Caspace Activation and Cell Death of Jurkat T Cells. Biosc Biotechnol Biochem.69 (11): 2063-2072.doi.10.1271/bbb.69.2063.

Ammerman NC., Beier-Sexton M., Azad AF.,(2008) Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. Curr Protoc Microbiol. Appendix–4E. doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11.

Ammons D., Short JD., Balley J., Hinojosa G., Tavarez L., et *al.*, (2016) Anti-cancer Parasporin Toxins are Associated with Different Environments : Discovery of two novel Parasporin 5-like Genes. Curr Microbio. 72:184-189.

Angus TA, (1956) Extraction, purification and properties of *Bacillus sotto* toxin.Can. J.Microbiol.2:416-426.

Aoki K., Chigasaki Y., (1915) Ueber die Pathogenitat cler sag. Sotto Bacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen.APitt. Med. Fnk. Tokyo. 13: 419-440.

Aoki K., Chigasaki Y., (1916) Ueber atoxogene Sotto-Bacillen. Bull. Impr.Sericef.Expt. Stn. Japan, 1, 141.sporulation, germination, and outgrowth, p. 174-177.In H. S. Levinson, A. L. Sonenshein, and D. J. Tipper (ed.), Spores VIII. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Ardaillou R., (2002) La thérapie génique : sa place actuelle et son avenir. La Revue de Médecine Interne.**23** : 679-682.

Aronson AI., Angelo N., Holt SC., (1971) Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T. Characterization of mutants producing altered amounts of protease. J. Bacteriol. 106:1016-1025.

Aronson AL., Beckman W., Dunn P., *(*1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol.Rev. 50:1-24.

Ashkenazi A., Dixit VM., (1998) Death receptors: signalling and modulation. Science. 5381: 1305-1308.

Ashkenazi A., Dixit VM., (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr.Opin. Cell Biol. 11: 255–260.

Attari F., Sepehri H., Delph L., Goliei B., **(2009)** Apoptotic and necrotic effects of pectic acid on rat pituitary GH3/B6 tumor cells. Iran Biomed J. 13(4):163–170.

Auger P, (2015) Activité anti-cancéreuse d'une Parasporine de *Bacillus thuringiensis* 4R2. Thèse de Doctorat.Université du Québec à Trois –Riviéres. pp 85.

B

Baatout S., Derradji H., Petitfour O., Van Suchodoletz H., Mergeay M., (2002) Mechanisms of radio-induced apoptosis. Canadian journal of physiology and pharmacology. 80:629-37.

Ballihaut G., MounicouS. , Lobinski R.,(2007) Approche multitechnique par spectrométrie de masse pour la détection de la glutathion peroxydase sélénoprotéine bovine: focus sur le sélénopeptide**.** Anal Bioanal Chem. 388 (3): 585-91.doi: 10.1007 / s00216-007-1257-4

Barnabe M, (2017) Cell viability assays: MTT assay application and protocol. https ://blog.quart zy.com/2017/05/01/cell-viabi lity- assay s-mtt-proto col. Accessed 1 May 2017.

Baumann L., Okamoto K., Unterman BM., Lynch MJ., Baumann P., (1984) Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*.J. Invertebr. Pathol. 44:329-341.

Béchohra L, (2017) Etude des activités cytotoxiques du venin et de ses constituants sur

certaines lignées cellulaires. Thèse de doctorat.USTHB Algérie .pp 180.

Becker N., Margalit J., (1993) Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice, P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs (Ed.)): 147-170. John Wiley & Sons, New York.

Bel Y., Granero F., Alberola TM., Martinez-SebastianMJ., Ferre J., (1997) Distribution, frequency anddiversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. Syst. Appl. Microbiol. 20:652–658

Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sinai R., Manasherob R., Khamraev A., Troitskaya E., Dubitsky A., Berezina N.,Margalith Y., (1997). Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology.63: 4883-4890.

Berbert-Molina MA., PrataA MR , Pessanha LG, SilveiraM M., (2008) Kinetics of *Bacillus Thuringiensis Var. Israelensis* Growth on High Glucose Concentrations.J Ind Microbiol Biotechnol35(11):1397-404. doi: 10.1007/s10295-008-0439-1.

Bershtein L., Poroshina T., Zimarina T., Tsyrlina E., Zhil'tsova E., Kovalevskii A., Semiglazov V., (2004) Expression of estrogen receptors-I and -A, in primary breast neoplasms and tumors exposed to neoadjuvant hormonal therapy. Bulletin of Experimental Biology & Medicine.138: 494-496.

Bernhard, K., Utz R, (1993) Production of *Bacillus thuringiensis* insecticide for experimental and commercial uses. In: Entwistle, P. F., Cory, J.S., Baily, M.J. and Higgs, S., Eds., *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Wiley & Sons, Chichester, New York, Toronto: 255-267.

Bodez V, (2000) Irradiations de cellules de mélanome humain par des neutrons de 14 mev ; interprétation des courbes de survie ; simulation physique de l'interaction des neutrons dans le milieu cellulaire. Thèse de doctorat en Sciences médicales. Clermont-Ferrand 2.Université de Lille.pp 156.

Böhnke A., Westphal F., Schmidt A., Dahm-Daphi J., (2004) The rôle of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells .Int J Radiat Biol. 80(1): 53-63.

Boudard D, (2016) La Mort Cellulaire Programmée**.** Med Sci (Paris). 26 (5): 534-7. doi: 10.1051 / medsci / 2010265534.https://slideplayer.fr/slide/3987597/

Bradford MM, (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Bioche.72 (1, 2):248–254. https ://doi.org/10.1006/abio.1976.9999.

Bravo A., Gill SS., Soberon M., (2005) *Bacillus thuringiensis* mechanism and use in: comprehensive molecular insect science. Elsevier BV: 175-206.

Brown KL., Whiteley HR., (1992) Molecular characterization of two novel crystal protein

genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. J Bacteriol. 174: 549-557.

Brasseur K., Auger P., Asselin E., Parent S., Côté JC., Sirois M., (2015) Parasporin-2 From a New *Bacillus Thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells**.** PLoS One.11;10(8):e0135106. doi: 10.1371/journal.pone.0135106.

Briggs DC., Naylor CE., Smedley JG., Lukoyanova N., Robertson S., Moss DS., Mc Clane BA., Basak AK., (2011) Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming .J.Mol.Biol. 413:138-149.

Buchanan RE., Gibbons NE., (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7. Baltimore: Williams and Wilkins Co.

Butt AJ., Firth SM., Baxter RC., (1999) The IGF axis and programmed cell death. Immunol Cell Biol. 77: 256-262.

C

Callen JC., Perasso R., (2005) Biologie cellulaire des molécules aux organismes. Seconde édition chez © Dunod, Paris, 2005 ISBN 2 10 049236 5.pp 514.

Carmichael J., De Graff WG., Gazdar J., Minna D., Mitchell B.,(1987) Evaluation of a tetrazolium-based semi automated colorimetric assay: Assesment of Chemosensitivity Testing .Cancer Research.47 (4):936-942.

Carozzi NB., Kramer VC., Warren GW., Evola S., Koziel MG.,(1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Applied and Environmental Microbiology. 57: 3057-3061.

Cen WJ., Pan Y., Li WX., Yang SQ., (2009) Comparison of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit expression in two lung adenocarcinoma cell lines with different radiosensitivity. Journal of Southern Medical University.29(11):2241-3.PMID: 1992307.

Chabner BA., Roberts TG.Jr., (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. Nature Reviews of Cancer. 5 :65-72.

Charles JF., de Barjac H., (1983) Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L. en microscopie électronique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 134A:197-218.

Chauhan V., Howland M., Wilkins R., (2012) A Comparitive Assessement of Cytokine Expression in Human-Derived Cell Lines Exposed to Alpha Particles and X-Rays. The Scientific World Journal Volume .doi:10.1100/2012/609295.

Chautan M., Chazal G., Cecconi F., Gruss P., Golstein P., (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. Current biology. 9:967-81.

Chen ML., Tsen HY., (2002) Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with *16S* rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites .J Appl Microbiol**.** 92(5):912-9.doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01606.x.

Cheung et *al.*,(1986).http://www.environnement.gouv.qc.ca/pesticides/virusnil/bti/chap3.htm

Chilcott CN., Knowles BH ., Ellar DJ., Drobniewski FA., (1990) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body. In Bacterial Control of Mosquitoes and Blackfles, eds de Barjac, H. & Sutherland, D.J. pp. 45-65. New Brunswick : Rutgers University Press.

Cho KS., Lee EH., Choi JS., Joo CK.,(1999) Reactive oxygen species- induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. IOVS 40(5):911–919.

Chubicka T., Girija D ., Deepa K. , Salini S., Meera N. , Raghavamenon AC , Divya MK., Babu TD (2018) A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. Indian Academy of Sciences. J Biosci . 43(2): 407–416. doi: 10.1007/s12038-018-9759-0.

CIRC du 12/09/2018. Dernières données mondiales sur le cancer .http://www.iarc.fr>pr263_F. (Date de consultation 11/12/2019).

CIRC du 15/12/2020. Dernières données mondiales sur le cancerhttps://news.un.org/fr/tags/circ. (Date de consultation 11/01/2021).

Cohen S., Dym O., Albeck S., Ben-Dov E., (2008) High-Resolution Crystal Structure of Activated Cyt2Ba Monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. Journal of Molecular Biology. 380(5):820-7. doi: 10.1016/j.jmb.2008.05.010

Couzinet A., Hérincs Z., Hueber AO., (2002) Programmed cell death' regulation: Towards a more dynamic conception.Med Sci (Paris).18: 841–852.

Crickmore N., Zeigler DR., Feitelson J., Schnepf HE., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean DH., (1998). Révision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol.Mol.Rev. 62:807-813.

Crickmore N., Zeigler DR., Schnepf E ., Rie JV., Lereclus D., Bravo A., Dean DH., (2018) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available at:http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

Grochulski P., MassonL., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz JL., BrousseauR., Cygler M., (1995) *Bacillus Thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. J Mol Biol. 1.254(3):447-64.doi: 10.1006/jmbi.1995.0630.

D

de Barjac H., Bonnefoi A., (1962) Essai de classification bio-chimique sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. Entomophaga. 7:5-31.

de Barjac, H. (1978) Toxicité de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* pour les larves d'Aedes aegypti et d'hopheles SteRhenSi, C.R. Acad. Sci. (Paris). 286: 1175-1178.

de Lucca AJ., Simonson JG ., Larson AD., (1981) Répartition de *Bacillus thuringiensis* dans les sols des États-Unis. J. Microbiol. 27: 865 – 870.

de Maagd RA ., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf HE., (2003a) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore froming entomopathogenic bacteria. Annual Review of Genetics. 37: 409-433.

Didur O, (2007) Etude de voies de signalisation apoptotiques suite à divers stress dans les cellules NEURO 2A. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal. pp 112.

Ding W., Ong C., (2003) Rôle of Oxidative Stress and Mitochondrial Changes in Cyanobacteria-induced Apoptosis and Hepatotoxicity. FEMS. 220: 1-7.

Djenane Z, (2012) Criblage de souches autochtones de *Bacillus* en vue de la mise en évidence de molécules actives présentant un intérêt en Biotechnologie industrielle et santé. Thèse de magister en Biologie Spécialité : Biotechnologie et Santé. USTHB. pp131.

Djenane Z., Nateche F., Ameziane M., Gomis-Cebolla J., El-Aichar F., Khorf H., Ferré J., (2017) Assessment of the Antimicrobial Activity and Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Algeria.Toxins.9.139.doi:10.3390/toxins9040139.

Dole M, **ed., (2013)** The radiation chemistry of macromolecules, vol. 2. Elsevier. https://scholar.google.com/scholar?q=The+radiation+chemistry+of+macromolecules&btnG=&hl=en&as_sdt=0%2C5.

Domanska B, (2016) Mode of action of a human cancer cell active toxin (Parasporin-3) from *Bacillus thuringiensis*. Thèse de doctorat. Université de Sussex. Avaible online via Sussex Research Online: http://sro.sussex.ac.uk/. pp318.

Draganov MM., Fransazov SH., Draganov DM., Murdjeva MA., Popov NK (2009) Two new serum free and protein free cell strains, derived from hep-2 cell line: cultural conditionsand proliferation activity.Journal of Culture Collections. 6(1):112-121.

Dulmage HT, (1970) Production of the spore - endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology.16:385-389.

E

Earnshaw WC., Martins LM., Kaufmann SH., (1999) Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates and Functions During Apoptosis. Annu Rey Biochem. 68: 383-424.

Ejiofor AO., Johnson T., (2002) Physiologycal and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the south central United States. Journal of indutrial microbiology and biotechnology. 28:284-290.

Ekino K., Okumura S., Ishikawa T., Kitada S., Saitoh H., Akao T.,Oka T., Nomura Y., Ohba M., Shin T., Mizuki E.,(2014) Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 strain. Toxins 6(6):1882–1895.

Elhigazi A, (2019) Investigating the Specificity of *Bacillus Thuringiensis* Cry41Aa Toxin Through Mutagenesis in Domain II .These de doctorat. University of Sussex, pp. 315.

Elmaghraby T, (2002) Protective effect of deoxynucleotide triphosphates on DNA damage in different mammalian cells exposed to δ-radiation. The Egyptian Journal of Hospital Medicine .8: 62– 69.

Elmore S, (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 35(4): 495–516.

Emami B., Lyman JA., Brown A., Coia L., Goitein M., Munzenrider J E., Shank B., Solin LJ., Wesson M., (1991) Tolérance of normal tissue to therapeutic irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys.21(1):109-22.

Eswarapriya B., Gopalsamy B., Kameswari B., Meera R., Devi P., (2010) Insecticidal activity of *Bt* IBT-15 strain against *plutella xylostella*. Int.J. PharmTech Res. 2(3).

Evan G., Littlewood T., (1998) A matter of life and cell death. Science 281: 1317–1322.

F

Fard EA., Tavakoli MB., Salehi H., Emami H., (2017) Synergetic effects of Docetaxel and ionizing radiation reduced cell viability on MCF-7 breast cancer cell. Applied Cancer Research 37: 29.https://doi.org/ 10.1186/s41241-017-0035-7.

Federici BA., Lüthy P., Ibarra JE., (1990) Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis:* structure, protein composition, and toxicity, pp: 16–44. *In* de Barjac H.Sutherland S.[eds.], Bacterial control of mosquitoes and blackflies: biochemistry, genetics, and application of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. Rutgers University PressNew Brunswick, NJ.

Feitelson JS., Payne J., Kim L., (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Bio/Technology 10:271-275.

Ferdous UT., Shishir MA., Khan SN., Hoq MM., (2018) *Bacillus spp*: attractive sources on anti-cancer and anti-proliferative biomolecules. Microb Bioact.1(1):033-045.https://doi.org/10.25163/microoiacts.11005B0408130818.

Fertil B., Malaise EP., (1981) Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys.7 :621-629.

Fertil B., Malaise EP., (1985) Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radio responsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 11: 1699-707.

Filho OG., Denolf P., Frutos ZR., Peferoen M., Eskes AB., (1993) L'identification de toxines de *Bacillus thuringiensis* actives contre *Perileucoptera coffeela*. 15^{éme} colloque scientifique international sur le café, Montpellier (France).

Foda MS., Salama HS., Selim M., (1985) factors affecting growth physiology of *Bacillus*

thuringiensis. Applied Microbiology and Biotechnology.22:50-52.

Foray N., Colin C., Bourguignon M., (2013) Radiosensibilité. L'évidence d'un facteur individuel. Med Sci (Paris). 29 (4) : 397-403.

Foucquier J., Guedj M.,(2015) Analysis of drug combinations: current methodological landscape. Pharmacol Res Perspect.3. doi:10.1002/prp2.149.

Forouzmand SH., Mousavi SH., VazifedanV., Nourbakhsh M., Chamani J, Hoseini A., Fanipakdel A., (2018) Synergistic effects of Ferula gummosa and radiotherapy on induction of cytotoxicity in HeLa cell line. Phytomed. 8(5): 439-447.

G

Gagnoux-Palacios L., Hueber AO., (2019) La mort cellulaire au service de l'homéostasie épithéliale.m/s 11(35).doi :10.1051/medsci/2019164.

Galluzzi L., Kroemer G., (2007) Mitochondrial apoptosis without vdac. Nature cell biology. 9**:**487- 489.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J M., Alnemri ES., Baehrecke E H., Blagosklonny M V., Dawson T M., Dawson VL et *al*., (2012b) Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. Cell Death Differ.19**:**107-20.

Ge ZNI Shivarova ., Dean DH., (1989) Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin protein. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:4037-4041.

Gerber DE, (2008) Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. Am Fam Physician. 1.77(3):311-319.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., (1999) Integrin signaling. Science 285: 1028–1032.

GlareTR., O'Callaghan M., (2000) "*Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety" Chichester; New York: John Wiley, U.S.A. 350: 2-80.

Goldberg I., Sneh B., Battae E., Klein D., (1980) Optimization o f a medium for a high product ion of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littorallis.* Biotechnology Letters.2: 419- 426.

Goldsby RA., Kindt TJ., Osborne BA., (2001) Immunologie. Dunod (4 éme édition), Paris: 31-35.

Golstein P., Kroemer G., (2007) Cell death by necrosis: Towards a molecular definition. Trends in biochemical sciences.32**:** 37-43.

González JM., Carlton BC., (1982) Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*: 85-95. In U. Streips, S. Goodgal, W. Guild, and G. Wilson (ed.), Genetic Exchange: A Celebration and a New Generation. Marcel-Dekker, Inc., New York.

Gonzalez JM., Dulrnage HT., Carlton BC., (1981) Correlation between specific plasmids

and δ-endotoxin production in *Bacillus thuringiemis*. Plasmid 5: 351-365.

Gonzalez E., Granados JC., Short JD., Ammons DR., Rampersad J., (2011) Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. Curr Microbiol.62(5):1643-8. doi: 10.1007/s00284-011-9905-5.

Goodman NS., Gotfried RJ., Rogoff MH., (1967) Biphasic System for Separation of Spores and Crystals of *Bacillus thuringiensis*. Journal of bacteriology 94 (2): 485.

Gordon RL., Haynes WC., Pang CHN., (1973) The Genus *Bacillus*. Agricultural Handbook. 427 Washington DC: Agricultural research service, US Department of Agriculture.

Granzotto A., Joubert A., Viau M., Devic C., Maalouf M., Thomas C., VoginG., Malek K., Colin K., Balosso J., Foray N., (2011) Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose ? C.R Biologies. 344 :140-157.

Green DR., Reed JC., (1998) Mitochondria and apoptosis.Science. 281: 1309–1312.

Guo SY., Ye S., Liu YF., Wei L., Xue J., Wu HF., Song FP., Zhang J., Wu XA., Huang DF., Rao ZH., (2009) Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. Journal of Structural Biology.168: 259–266.

Grochulski P., Masson L., Barisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz JL., Brousseau R ., Cygler M ., (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin : crystal structure and channel formation. J.Mol.Biol. 254:447-464.

H

Hanahan D., Weinberg RA.,(2000) The Hallmarks of Cancer .Cell. 100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hannay CL, (1953) crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. Nature. 172. 1004.

Harris CC, (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. Carcinogenesis. 17: 1187–1198.

Hayakawa T., Kanagawa R., Kotani Y., Kimura M., Yamagiwa M., Yamane Y., Takebe S., Sakai H.,(2007) Parasporin-2Ab, a Newly Isolated Cytotoxic Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis*. Current Microbiology. 55(4):278-83 doi: 10.1007/s00284-006-0351-8 ·

Hayflick L, (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. Biochemistry 62: 1180–1190.

Helassa N, (2008) Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dans le sol. Thèse de doctorat. Université de Montpellier SupAgro.pp178.

Helgason E., 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):2627-30.10.1128/aem.66.6.2627-2630.2000.

Hernández-Fernández JA, (2011) *Bacillus thuringiensis*: a Natural Tool in Insect Pest Control. In book: The Handbook of Microbial Bioresourses, Edition: 1, Chapter: 8, Publisher: CABI, Editors: edited by Vijai Kumar Gupta, Gauri Dutt Sharma, Maria G. Tuohy, Rajeeva Gaur: 121-139.

Hilbert DW., Piggot., (2004) Compartmentalization of Gene Expression During *Bacillus Subtilis* Spore Formation. Microbiol Mol Biol Rev. 68(2):234-62.doi: 10.1128/MMBR.68.2.234-262.2004.

Hofmann C., Lüthy P., (1986) Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells.Arch.Microbiol.146:7-11.

Höfte H., Whiteley HR., (1989) Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis.*Microbiol. Rev. 53:242-255.

Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E., Folkman J., Klein G., Ernberg I., Falk KI., (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood. 93: 3956–3963.

Holmes B., Willcox W R., Lapage SP., (1978) Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. Journal of Clinical Pathology.31 : 22-30.

Honée G.,Visser B., (1993) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomol.Exp.Appl.69:145-155.

I

Ibarra JE., Federici BA., (1986) Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity**.** FEMS microbiology letters. 34 (1):79-84.

Ibrahim MA., Griko N., JunkerM., BullaLA., (2010) *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. Bioengineered Bugs. 1(1): 31–50. doi: 10.4161/bbug.1.1.10519.

Ishii T., Ohba M., (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* environmental isolates showing larvicidal activity specific for mosquitoes. Journal of General Microbiology .139 : 2849-2854.

Ishino Y., Ishino S., (2012) Rapid progress of DNA replication studies. Sci China Life .55(5): 386-403. *Archaea*, the third domain of life.

Ishiwata S, (1901) On a kind of severe flacher (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho .114: 1-5.

Ishiwata S, (1902) Examination of sotto disease *bacillus*. Kyoto Sangyo Koshuio Sanji Hokoku. 2: 346-347.

Ishiwata S, (1905) Sotto bacillus study. Dainihon Sunshi Kaiho, 14:24-28.

Ishizaki Y., Cheng L., Mudge AW., Raff MC., (1995) Pro-grammed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. Mol. Biol. Cell. 6: 1443–1458.

ItoA., Sasaguri Y., Kitada S., Kusaka Y., Kuwano K., Masutomi K., Mizuki E., Akao T., Ohba M.,(2004) A *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells.The journal of Biological Chemistry .279(20):14: 21282-21286.

Iwabuchi H, (1908) "Popular Silkworm Pathology," 1st ed., 428 pp. Meibundo, Tokyo.

J

Janku F., Mcconkey DJ., Hong DS., Kurzrock R., (2011) Autophagy as a target for anticancer therapy. Nature reviews Clinical oncology. 8**:**528-539.

Jensen GB., Hansen BM., Eilenberg J., Mahillon J., (2003) The hidden life styles of *Bacillus cereus* and relatives. Environ. Microbiol. 5: 631-640.

Jenzer C., Legouis R., (2017) Les multiples facettes de l'autophagie au cours du développement Multiple functions of autophagy during development. Med Sci. 33(3): 238 – 245.

Jo KJ., Cha MR., Lee MR., Yoon MY., Park HR., (2008) Methanolic extracts of *Uncaria rhynchophylla* induce cytotoxicity and apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells. Plant Foods for Human Nutrition. 63: 77-82.

Johnstone A.,Thorpe R., (1987) Immunochemistry in practice. Second edition. Blackwell Scientific Publications; pp 306 .doi:https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90036-9.

Joiner MC., Lambin P., Malaise EP., Robson T., Arrand J.E., Skov KA., Mqles B., (1996) Hypersensitivity to very-low single radiation doses: its relationship to radioadaptive response and induced resistance. Mutation Res. 358 : 171-183.

Jonas D., Walev I., Berger T., Liebetrau M., Palmer M., Bhakdi S., (1994) Novel path to apoptosis: small trans-membrane pores created by staphylococcal α-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. Infect. Immun. 62:1304–1312.

Jung YC., Mizuki E., Akao T., Cote JC., (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. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03260.x.

K

Katayama H., Yokota H., Akao T., Nakamura O., Ohba M., Mekada E., Mizuki E.,(2005) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to Human cells from non-insecticidal parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*. J Biochem. 137:17–25. https ://doi.org/10.1093/jb/mvi00 3.

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*,

Unduces Ca^{2+} Influx and a sustained Elevation of the Cytoplasmic Ca^{2+} concentration in Toxin-sensitive cells. J Biol Chem. 282(10):7742-7752.

Katayama H., Kusak, Y., Mizuk, E., (2011) Parasporin-1 Receptor and Use Thereof. U.S. Patent 20110038880.

Kebdani M, (2017) Identification des souches locales de *Bacillus thuringiensis* en vue d'une lutte biologique contre *Ceratitis capitata* et autres pathogénes de l'oranger *Citrus sinensis*. Thése de Doctorat. Université Abou Baker Belkaid de Tlemcen. pp179.

Kerr JF., Wyllie AH., Currie AR., (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implication in Tissue Kinetics. Br. J. Cancer. 26: 239-257.

Kim HS., Yamasashita S., Akao T., Saitoh H., Higuchi K., Park YS., Mizuki E., Ohba M .,(2000) *In vitro* cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. J Appl Microbiol. 89(1):16-23. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01087.x

Kitada S ., Abe Y., Shimada H., Kusada Y., Matsuo Y., Katayama H., Okumura S., Akao T., Mizuki E ., Kuge O., Sasaguri Y., Ohba M., Ito A.,(2006) Cytocidal Action of parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. The Journal of biological chemistry. 281:26350-26360.

Kitada S., Abe Y., Maeda T., Shimada H., (2009) Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytocidal action to human hepatoma cells. Toxicology. 264(1, 2): 80-88. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.016.

Koni PA., Ellar DJ., (1993) Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ-endotoxin. J. Mol. Biol. 229:319-327.

Knowles BH, (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ-endotoxins. Advan Insect Physiol. 24: 275-308.

Knowles BH., Blatt MR., Tester M., Horsnell JM., Carroll J., Menestrina G., Ellar DJ., (1989) A cytolytic δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. FEBS Lett. 244: 259– 262.

Krishnan K., Ker JE., Mohammed SM., Nadarajah VD., (2010) Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. Journal of Biomedical Science. 17:86. doi:10.1186/1423-0127-17-86.

Krishnan V., Domanska B., Elhigazi A., Afolabi F., West MJ., Crickmore N.,(2017) The human cancer cell active toxin Cry41Aa from *Bacillus thuringiensis* acts like its insecticidal counterparts **.** Biochemical Journal .474: 1591–1602 doi: 10.1042/BCJ20170122.

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E., Baehrecke E., Blagosklonny M., El-Deiry W., Golstein P., Green D., (**2009)** Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. Cell Death & Differentiation. 16: 3-11.

Kuroda S., Begum A., Saga M., Hirao A., Mizuki E., Sakai H., Hayakawa T.,(2013) Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. Curr Microbiol.66(5):475-80. doi: 10.1007/s00284-013-0301-1.

L

Lacoursière JO., Boisvert J.,(2004) Le *Bacillus Thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec.Document préparé pour le ministère de l'environnement du Québec. Université De Québec A Trois Rivières. pp108. http://www.environnement.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/bti.pdf.

Laemmli UK, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. https ://doi.org/10.1038/22768 0a0.

Lambert B., Peferoen M.,(1992) Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Bioscience. 42:112-122.

Lambert AW., Pattabiraman DR., Weinberg RA., (2017) Emerging biological principles of metastasis. Cell.168:670–691. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037.

Lane DJ, (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Wiley, New York: 115–175.

Lecadet MM., Frachon E., Dumanoir VC., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiery I.,(1999) Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J Appl Microbiol. 86:660-72.

Lee DW., Akao T., Yamashita S., et al., (2000) Non-insecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. Biochem Biophys Res Commun .272:218-223.

Lee M., Bae D., Lee D., Jang K., Oh D., Ha S., (2006) Reduction of *Bacillus cereus* in cooked rice treated with sanitizers and disinfectants. J. Microbiol. Biotechnol. 16: 639-642.

Leighton TJ., Doi., RH., (1971) The Stability of Messenger Kibonucleic Acid during Sporulation in *Bacillus subtilis*. The Journal of Biological Chemistry.246:3189- 3195.

Lengauer C., Kinzler KW., Vogelstein B., (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature. 396: 643–649.

Lereclus D., Bourgouin C., Lecadet M., Klier A., Rapoport G .,(1989) Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Regulation of prokaryotic development.Eds.Smith I. Slepecky RA., Setlow P. American Society for Microbiology.Washington,D.C.Etats Unis:255-276.

Le Roux D ., Niedergang F., (2010) Autophagie et micro-organismes": points chauds d'un mini-symposium.Med Sci (Paris). 26 (5): 534-7.doi: 10.1051 / medsci / 2010265534.
Levine AJ, (1997) The cellular gatekeeper for growth and division. Cell. (88):323–331.

Leroy S., Duperray C., Morand S., (2003) Flow cytometry for parasite nematode genome

size measurement. Mol Biochem Parasitol. 128: 158-164.

Li H., Chougule NP., Bonning BC., (2011) Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) J. Invertebr. Pathol.107:69–78. doi: 10.1016/j.jip..02.001.

Li J., WuDM., Han R., Shi-hua YY Deng., Liu T., Zhang T., Xu Y., (2020) Low-Dose Radiation Promotes Invasion and Migration of A549 Cells by Activating the CXCL1/ NF-κB Signaling Pathway. OncoTargets and Therapy.13: 3619–3629.

Liang XH., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H., Levine B.,(1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature. 402:672–676.

Liu BL., Tzeng YM., (2000) Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Bioengineering. 68(1):11-7. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1<11::AID-BIT2>3.0.CO;2-T.

Liu L., Boyd SD., Bulla-Jr LA., Winkler DD., (2018) The Defined Toxin-binding Region of the Cadherin G-protein Coupled Receptor, BT-R1, for the Active Cry1Ab Toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Proteomics Bioinform. 11: 201–210.

Loeb LA, (1991) Mutator phenotype may be required for multistep carcinogenesis. Cancer Res. 51: 3073–3079.

Logan NA., Berkeley RCW.,(1984) Identification of *Bacillus* strains using API system.J Gen Microbiol. 130(7):1871–1882.

Logan NA., Carman JA., Melling J., Berkeley RCW., (1985) Identification of *Bacillus anthracis* by API tests. J Med Microbiol. 20(1):75–85. https ://doi.org/10.1099/00222 615-20-1-75.

Logan N, (2005) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and other aerobic endospore-forming bacteria. Topley and Wilson's Microbiology & Microbial Infections Bacteriology. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. 10th ed. London, UK: Hodder Arnold: 922-952.

Loudhaief R, (2018) Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile. Thèse de doctorat Université Cote d'Azur. pp214.

Lotem J., Sachs L., (1996) Differential suppression by protease inhibitors and cytokines of apoptosis induced by wild-type p53 and cytotoxic agents **.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences. 93:12507-12512.

Luce A, (2008) Implication des voies des récepteurs de mort dans les effets cibles et non cibles des radiations ionisantes. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Université de paris XI. Spécialité : radiobiologie. Université paris XI faculté de médecine paris-sud école doctorale de cancérologie : biologie, médecine, santé. pp160.

Luo X., Budihardjo I., Slaughter C., ang X., (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface

death receptors. Cell. (94) :481-490.

Lüthy P., Ebersold HR., (1981a) The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Pharmac.Ther. 13:257-283.

Lüthy P., Ebersold HR., (1981 b) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action. Pathogenesis of invertebrate Microbial Disease. E.W Davidson,ed., Allanheld, Osmun and Co.Publishers, Totowa, New Jersey:235-267.

M

Mac donald JS, (2003) Chemotherapy in the management of gastric cancer. J Clin Oncol. 1;21(23 Suppl): 276s-279s. doi: 10.1200/JCO.2003.09.137.PMID: 14645410.

Mancheňo JM et *al.*, (2005) Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex wiyh a sugars. J. Biol. Chem.280:17251-17259.

Mareel M., Leroy A., (2003) Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. Physiol Rev .83(2):337-76.doi: 10.1152/physrev.00024.2002.

Margalith Y., Ben-Dov E., (2000) Biological control by *Bacillus thuringiensis ssp.israelensis* .In InsectPestmanagement: Techniques for Environmental Protection .Rechcigl, J.E., and Rechcigl, N.A. (eds). BocaRaton,FL,USA: Lewis Publishers and CRC Press LLC :243–301.

Marino G., Niso-Santano M., Baehrecke EH., Kroemer G.,(2014) Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol.15:81-94.

Martin PAW., Travers RS., (1987) Woldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol.55 (10):2437-2442.

Martin JC., Vassal JM., (2012) Expertise INRA -CIRAD : Définition d'une méthodologie de tests au laboratoire de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* sur *Hylesia metabu*s, agent de la papillonite en Guyane Française.

Masson L., Mazza A., Gringorten L., Baines D., Aneliunas V., Brousseau R., (1994) Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system.Mol.Microbiol.14:851-860.

Mattes 0, (1927) Parte Frankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche iiber die ihre Verwendbarkeit als biologisches Beklmpfungsmittel (zugleich ein Beitrag zur Zytologie der Bakterien). S&her.Ges.Befiirder.Ges. Naturwu;iss. Marburg. 62: 381-417.

Meadows MP., Ellis DJ., Butt J., Jarrett P., Burges HD., (1992) Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1344–1350.

Mendoza-Almanza G., L. Esparza-Ibarra E., Ayala-Luján JL., Mercado-Reyes M., Godina-González S., Hernández-Barrales M., Olmos-Soto J., (2020) The Cytocidal

Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. Toxins. 12. 301; doi:10.3390/toxins12050301.

Miao ZH.,Tong LJ., Zhang JS., Han JX.,Ding J., (2004) Characterization of Salvicine-Resistant Lung Adenocarcinoma A549/SAL Cell Line. Int. J. Cancer: 110: 627– 632.

Milia J, (2005) Implication De Rhob Dans Les Mécanismes Cellulaires De Réponse Aux Rayonnements Ionisants. Université de Toulouse. Thèse de doctorat. pp138.

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. J Appl Microbiol.86(3):477–486. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00692 .x.

Mizuki E., Park YS., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K., Ohba M., (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clin Diagn Lab Immuno.l 7(4):624–634. https ://doi.org/10.1128/CDLI.7.4.625-634.2000.

Moazamian E., Bahador N., Azarpira N., Rasouli M., (2018) Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. Curr Microbiol. 75(8):1090-1098. doi: 10.1007/s00284-018-1479-z.

Mohammedi S., Balasubramanian S., Yan S., Tyagi RD., Valero JR., (2006) Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process. Biochem. 41: 829-835.

Molva C., Sudagidan M.,Okuklu B., (2009) Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. Food Control. 20(9):829-834.

Moniatte M., Van der Goot FG., Buckley JT., Pattus F., Dorsselaer VA., (1996) Characterization of the heptameric pore-forming complex of the *Aeromonas* toxin aerolysin using MALTI-TOF mass spectrometry.FEBS Lett. 384:269-272.

Moncharmont C., Levy A., Guy JB., *et al.*, (2014) Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. Crit Rev Oncol Hematol. 92:133–142. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.05.006.

Mora I., Cabrefiga J., Montesinos E., (2015) Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. PLoS ONE .10: 1–21.

Muniady S., Rathinam X., Subramaniam S., (2011) Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from chicken manure samples.African Journal of Microbiology Research . 5(20): 3131-3137.

N

Nadarajah VD., Ting D., Chan KK., Mohamed SM., Kanakeswary K., Lee HL., (2008) Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. South East Asian J Trop Med Public Health. 39(2):235–245. https ://doi.org/10.3390/molecules24030506.

Nagahama M., Hara H., Fernandez-Miyakawa M., Itohayashi Y., Sakurai J., (2006) Oligomerization of *Clostridium perfringens* ε-toxin is dependent upon membrane fluidity in liposomes. Biochemistry. 45:296-272.

Nagamatsu Y., Okamura S., Saitoh H., Akao T., Mizuki E.,(2010) Three Cry toxins in two Types from *Bacillus thuringiensis* Strain M019 Preferentially Kill Human Hepatocyte Cancer and Uterus Cancer cells.Biosci.Biotechnol. Biochem. 74(3): 494-498.

Nahapetian AT., Thomas JN., Thilly WG., (1986) Optimization of environment for high density Vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. J Cell Sci. 81:65–103.

Nakata HM, (1964) Organic Nutrients Required For Growth And Sporulation Of *Bacillus Cereus*, Journal of Bacteriology.88:1522-1524.

Namba A., Yamagiwa M., Amano H., Akao T., Mizuki E., Ohba M., Sakai H., (2003) The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis subsp. coreanensis* A1519 strain against the human leukemic T cell. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1622 (1) : 29–35. doi: 10.1016 / s0304-4165 (03) 00102-8

Nicolier M., Decrion-Barthod AZ., Launay S., Prétet JL., Mougin C., (2009) Spatiotemporal activation of caspase-dependent and-independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53wt and p53mt human cervical carcinoma cells. Biology of the Cell.101**:**455-467.

Nijhawan D., Honarpour N., Wang X., (2000) Apoptosis in Neural Development and Disease. Annu Rey Neurosci 23: 73-87.

O

Ohba M., Aizawa K., (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. invertebr.Pathol.32:303–309.

Ohba M., Aizawa K., (1986) Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. J Invertebr Pathol. 47: 12-20.

Ohba M., Mizuki E., Uemori A., (2009) Parasporin, a new anticancer Protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Research. 29(1):427-343.

Okassov A., NersesyanA., Kitada S., Ilin A., (2015) Parasporins as New Natural Anticancer Agents: A Review J BUON.20(1):5-16. PMID: 25778289.

Okumura S., Saitoh H., Ishikawa T., Inouye K., & Mizuki E., (2011) Mode of action of

parasporin-4, a cytocidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 1808(6): 1476–1482. doi:10.1016/j.bbamem.2010.11.003.

O'Neil L., Kaltschmidt C., (1997) NF-KB: a Crucial Transcription Factor for Glial and Neuronal Cell Function. Trends Neurosci. 20: 252-258.

P

Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P., (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. Toxins 6 : 3296–3325.

Paul S., Étienne R., (2002) Immunothérapie génique du cancer. Transfusion Clinique & Biologique. 9: 301-321.

Pearson D., Ward OP., (1987) Purification of the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis subp.israelensis* and development of a novel bioassay technique . Biotechnology Letters. 9: 771-776.

Pearson D., Ward OP., (1988) Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* susp. *Israelensis* and development media for production of the protein crystal endotoxin. Biotechnology Letters.10:451-456.

Pigott CR., Ellar DJ., (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71: 255–281.

Pradier O., Rave-Fränk M., Lehmann J., Lücke E., Boghun O., Hess CF., Schmidberger H., (2001) Effects of docetaxel in combination with radiation on human head and neck cancer cells (ZMK-1) and cervical squamous cell carcinoma cells (CaSki). Int J Cancer. 91(6):840–5.

Puck TT., Marcus PI., (1956) Action of x-rays on mammalian cells. J Exp Med.103: 653-66.

Q

Qiu H., Zhao DY., Yuan LM., Zhang G., Xie GH., (2015) Regulatory effects of WRAP53 on radiosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells. Asian Pacific journal of cancer prevention : Asian Pac. J. Cancer Prev.doi: 10.7314/apjcp.2015.16.7.2975.

Qu YY., Hu SL., Xu XY., Wang RZ., Yu HY., Xu KY., ChenL., Dong GL., (2013) Nimotuzumab Enhances the Radiosensitivity of Cancer Cells In Vitro by Inhibiting Radiation-Induced DNA Damage Repair. Plos One. 8 (8)| e70727.

R

Rahbani MJ., Salameh D., Kallassy AM., Chamy L., Brandam C., Lteif R., (2014) A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. J Microbiol Methods .107:147– 149. https ://doi.org/10.1016/j.mimet .2014.10.003.

Rahbani MJ, (2015) Optimisation, étude de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides à base de souches de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol Libanais. Thèse de doctorat.Université de Toulouse. pp234.

Rakhi S., Daman S., Dwarakanath BS., Madhu C., (2011) Inhibition of Human Cervical Cancer Cell Growth by Ethanolic Extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) Root.Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine: 1-13.

Ray RB., Raychoudhuri A., Steele R., Nerurkar P., (2010) Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Modulating Cell Cycle Regulatory Genes and Promotes Apoptosis. Cancer Research .70:1925-1931.

Renganathan K., Rathinam X., DanialM., Subramaniam S., (2011) Quick isolation and characterization of novel *Bacillus thuringiensis* strains from mosquito breeding sites in Malaysia . Emirates Journal of Food and Agriculture. 23(1):17-26.

Renoult F, (2013). Efficacité et sécurité de la technique de radiothérapie mammaire avec complément d'irradiation concomitant. Analyse de 121 cas traités à l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Thèse de doctorat en médecine. Université de Lorraine. pp59.

Revue de l'ACOMEN, (1998) Action Concertée en Médecine Nucléaire, Radiobiologie et faibles doses d'irradiation. 4 (4).

Rivera D, (1998) Growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* batch, Fed-batch and continuous bioreactor cultures. M.E.Sc Thesis, The University of Western Ontario, London, Canada.

Roh JY., Par, HW., Jin BR., Kim HS., Yu YM., Kang SK., (1996) Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolates from Korea. Letters in Applied Microbiology. 23(4):249–252.

Roh JY., Choi JY., Li MS., Jin BR., Je YH., (2007) *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. J. Microbiol. Biotechnol. 17(4): 547-559.

Rowe GE., Margaritis AM., (1987) Bioprocess Developments in the Production of Bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis.* CRC Critical Reviews in Biotechnology . 6(4): 87-127.

S

Sachveda V., Tyagi RD., Valéro JR., (1999) Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. Recent Research Developments in Microbiology. 3: 363-375.

Salama HS., Foda MS., Dulmage HT., (1983) Novel Media for Production of δ- endotoxins form *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology.41:8-19.

Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T., (1989) Molecular cloning . A laboratory manual. 2nd Edition Cold spring Harbor (New york): Cold spring Harbor Laboratory Press.

Saitoh H., Okumura S., Ishikawa T., (2006) Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. Biosci Biotechnol Biochem .70:2935-2941.

Sanchis V., Bourguet D., (2008) *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. Agron. Sustain. Dev. 28: 11–20.

Sanchis V, (2016) La lutte biologique avec *Bacillus thuringiensis* Paroles d'experts - Jardins de France 639 - Janvier-février.

Seifinejad A., Jouzani GS., Hosseinzadeh A Abdmishani C.,(2008) Characterization of Lepidoptera–active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biological control. 44(22): 216-226.doi :10.1016/j. biocontrol.2007.09.010.

Shelton AM., Zhao JZ., Roush RT., (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. Annu. Rev. Entomol. 47: 845-881.

Shimada H., Kitada S.,(2010) Mega assemblages of oligomeric aerolysin-like toxins stabilized by toxin-associating membrane proteins. Journal of Biochemistry. 149(1):103-15.

Schnepf HE., Whiteley HR.,(1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2893- 2897.

Schnepf HE., Tomczak K., Ortega JP., Whiteley HR.,(1990) Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific incecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. J.Biol.Chem.265:20923-20930.

Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler DR., Dean DH., (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.Microbiol.Mol. Biol. Rev. 62(103): 775-806.

Schünemann R., Knaan N., Fiuza LM.,(2014) Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture.Literature Review.doi: 10.1155/2014/135675.

Slatin SL., Abrams CK., English L., (1990) Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers.Biochem.Biophys.Res.Commun.169:765-772.

Smith AR, (1982) Effect of strain and medium variation on mosquito production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis.* Canadian Journal of Microbiology.28:1090-1092.

Soberón M., Pardo-Lopez L., Lopez I., Gomez I., Tabashnik BE., Bravo A., (2007) Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. Science. 318:1640-1642.

Soberón M., Portugal L., Garcia-Gómez BI., Sánchez J., Onofre J., Gómez I., Bravo A., (2018) Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 93: 66–78. doi:10.1016/j.ibmb.2017.12.008.

Sporn MB, (1996) The war on cancer. Lancet 347: 1377–1381.

Steinhaus EA, (1951) Possible use of *B.t.* berliner as an aid in the control of alfalfa caterpillar. Hilgardia. 20: 359- 381.

T

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30(12):2725–2729. https ://doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Tamura K., Nei M., (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol .10(3):512–526. https :// doi.org/10.1093/oxfor djour nals.molbe v.a0400 23.

Thomas, WE., Ellar, DJ.,(1983)*Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in- vitro* and *in- vivo*. Journal of Cell Science. 60:181-197.

Thorburn A, (2008) Apoptosis and autophagy: Regulatory connections between two supposedly different processes. Apoptosis.13:1-9.

Thornberry NA., Lazebnik Y., (1998) Caspases: enemies within.Science.281: 1312–1316.

Thorne CB, (1968) Transducing Bacteriophage for *Bacillus cereus*. Journal of Virology. (2): 657-662.

Tigrine C, (2014) Effets anticancéreux et chimio protecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de Cléome arabica. Université Ferhat Abbas de Sétif. Thèse de doctorat en sciences. pp 132.

Toumanoff C., Vago C., (1951) L'agent pathogène de la flacherie des vers à soie endémique dans la région des Cévennes: *Bacillus cereus var. alesti var. nov.* C.R. Acad. Science. 233:1504-1506.

Travers RS., Martin PA., Reichelderfer CF.,(1987) Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus spp*. Appl Environ Microbiol.3(6):1263-6. PMID:16347359.

Truc G., Bernier V., Mirjolet C., Dalban C., Mazoyer F., Bonnetain F., Blanchard N., Lagneau É., Maingon P., Noël G.,(2016) A phase I dose escalation study using simultaneous integrated-boost IMRT with temozolomide in patients with unifocal glioblastoma. Cancer Radiother.20(3):193-198. doi:10.1016/j.canrad.2015.12.005.

Tsuzuki K., Kimura K., Fujii N., Yokosawa N., Indoh T., Murakami T., Oguma K., (1990) Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by *Clostridium botulinum* type C. Infect Immun. 58: 3173-3177**.**

Tubiana M D J., Wambersie A., (1986) Radiobiologie:Hermann eds, Paris.

U

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): 91-95.

V

Vachon V., Laprade R., Schwartz JL., (2012) Current Models of the Mode of Action of *Bacillus Thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins: A Critical Review**.**J Invertebr Pathol.111(1):1-12. doi: 10.1016/j.jip.2012.05.001.

Verelle P, (1998) L'apoptose radio-induite. Revue de l'ACOMEN.(4) 4.

W

Ward ES., Ridley AR., Ellar DJ., Todd JA., (1986) *Bacillus thuringiensis var israelensis* endotoxin. Cloning and expression of the toxin in sporogenic and asporogenic strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Molecular Biology.191: 13-22.

Wardman P, (2009) The importance of radiation chemistry to radiation and free radical biology (The 2008 Silvanus Thompson Memorial Lecture). Br J Radiol.82(974):89–104.

Wang J., Boets A., Van Rie J., Ren G., (2003) Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. Journal of Invertebrate Pathology.82 (1) : 63–71. doi: 10.1016 / s0022-2011 (02) 00202-1.

Wang Z., Liu Y., Cui Y., (2005) Pathways to caspase activation. Cell Biology International. 29: 489-496.

Whalon ME., Wingerd BA., (2003) *Bt*: mode of action and use. Arch Insect Biochem Physiol(54):200.211.AnnuRev.Microbiol.40:54976.doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.003001.

Whiteley HR., Schnepf HE.,(1986) The Molecular Biology of Parasporal Crystal Body Formation in *Bacillus Thuringiensis.* Annu Rev Microbiol.40:549-76. doi: 10.1146/annurev.mi.40.100186.003001.

Widner WR., Whiteley HR., (1989) Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. Journal of Bacteriology. 171:965–974.

WirawanE., Vanden Berghe T., Lippens S., Agostinis P., VandenabeeleP., (2012) Autophagy: For Better or for Worse. Cell Res. 22(1):43-61. doi: 10.1038/cr.2011.152.

Whiters HR, (1992) Biological basis of radiation therapy for cancer.Science & Practice.339 (8786):156-159. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90218-R.

Wong SYR, (2010) *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins and their effect on Human cancer cells: On Overview. leJSME 4(2):3-9. https://pdfs.semanticscholar.org/972c/989063b3e42b5a5d1cbfa3c69db903f80866.pdf.

Wyllie AH., Kerr JF., Currie AR., (1980) Cell Death: The Significance of Apoptosis**.** Int Rev Cyto.68:251-306.doi: 10.1016/s0074-7696(08)62312-8.

X

XuX., ArakiK., Li S., Han JH., Ye L., TanWG., Konieczny BT., Bruinsma MW., Ma rtinez J., Pearce EL., Green DR., Jones DP., Virgin HW., Ahmed R., (2014) Autophagy is essential for effect or $CD8^+$ T cell survival and memory formation. Nature Immunology.15:1152–1161.

Y

Yamashita S., Katayama H., Saitoh H., Akao T., Park YS., Mizuki E., et *al.*, (2005) Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytocidal activity on limited human cancer cells. J Biochem. 138(6):663–672. https://doi.org/10.1093/jb/mvi17 7.

Yamagiwa M., Akao T., Ohba M., Hirao T., Mizuki E., Sakai H., (2004) The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis subsp. coreanensis* A2316 strain against the human leukemic T cell .Memoirs of the Faculty of Engineering. Okarama University.38. (l&2) :97-100.

Z

Zelnak AB, (2007) Clinical pharmacology and use of microtubule-targeting agents in cancer therapy. Methods in Molecular Medicine. 137: 209-234.

ANNEXES

Annexe 1

1. Compositions des Milieux de cultures et des colorants utilisés en microbiologie

Tableau I: Composition du milieu de culture Gélose Nutritive.

Milieu (de culture) : *Milieu Nutritif (GN)* (Saitoh et al., 2006)
⊕ 10g polypeptone. ⊕ 10g Extrait de viande. ⊕ 2g NaCl. ⊕ 20g Agar. ⊕ 1000 ml d'eau distillée. ⊕ pH. 7,6 et Température de 30°C. Pour le milieu GN liquide, même composition – Agar.

Tableau II: Composition du milieu de culture Bouillon Nutritif.

Bouillon nutritif (g)	
⊕ Extrait de viande…….……	3g
⊕ Peptone……	5g
⊕ Eau distillée qsp……..…	1L

Tableau III: Composition des milieux de culture utilisés pour l'isolement des souches Bt d'après le protocole proposé par **(Travers et *al.*, 1987).**

Milieu 1 (de culture) : *Milieu LB Agar*	**Milieu 2 (de sporulation) : *MilieuT3***
⊕ 10g Tryptone. ⊕ 5g Extrait de levure. ⊕ 5g NaCl. ⊕ 15g Agar. ⊕ 1000 ml d'eau distillée.	⊕ 3g Tryptone. ⊕ 2g Tryptose. ⊕ 1.5g Extrait de levure. ⊕ 0.05M Phosphate de Na [pH 6.8]. ⊕ 0.005g MnCl. ⊕ 1000 ml d'eau distillée

Tableau IV: Composition du milieu Gélose au jaune d'œuf.

Composition	**Volume (ml)**
Gélose TSA en surfusion	180 ml
Emulsion de jaune d'œuf (v/v)	20 ml

Annexe 1

Tableau V: Composition du milieu de culture Shigel Gibbons.

Composition du milieu de culture Shigel Gibbons (SG) (g)
⊕ Sulfate de magnésium 7 fois hydraté: 1 g ⊕ Tri-sodium citrate: 3 g ⊕ Chlorure de potassium: 3 g ⊕ Carbonate de sodium: 5 g ⊕ Caséine: 7g ⊕ Extrait de levure: 10 g ⊕ Agar : 18g ⊕ NaCl : 200 g (20%) ⊕ Eau distillée: 1 L

Tableau VI: Composition du milieu de culture Gélose Columbia.

Composition du milieu de culture Gélose Columbia (g)	
⊕ Extrait de levure……..	3g
⊕ Peptone de viande……..……	5g
⊕ Peptone de Soja……	3g
⊕ Tryptone……..……	5g
⊕ Cœur-cerveau……..……	8g
⊕ Amidon……	1g
⊕ Chlorure de sodium……	5g
⊕ Agar……	18g
⊕ Eau distillée qsp……..……..	1L

Tableau VII: Composition du milieu de culture Gélose au sang frai de mouton.

Composition du milieu de culture Gélose au sang frai de mouton (ml)	
⊕ Gélose Columbia en surfusion……..……	190ml
⊕ Ampoule de sang frais……..…	10ml
Sauf indication, les milieu de culture utilisés sont ajustés à pH7 et stérilisés à l'autoclave, 120°C pendant 20 min	

Annexe 1

Tableau VIII: Composition du milieu de culture Gélose Mueller Hinton.

Composition du milieu de culture Gélose Mueller Hinton (g)
⊕ Extrait de viande……2g
⊕ Peptone trypsique de caséine……...17.5g
⊕ Amidon……1.5g
⊕ Agar……15g
⊕ Eau distillée qsp……1L

Tableau IX : Composition du milieu de culture Gélose Viande-Foie

Composition du milieu de culture Gélose Viande-Foie (g)
⊕ Base viande- Foie…….. ……...…….……..…30g
⊕ Glucose……..……..2g
⊕ Agar……6g
⊕ Eau distillée qsp……1L

Tableau X: Composition de la coloration Bleu brillant de Coomassie à 0,25% pour la coloration des cristaux.

Bleu brillant de coomassie à 0,25%	
⊕ Bleu brillant de coomassie G-250……..……	0,25%
⊕ Ethanol……	50%
⊕ Acide acétique……..…	7%
le volume est complété avec de l'eau distillée stérile à 100ml	

Tableau XI: Composition de la coloration Bleu de Coomassie utilisé pour le test de **Bradford, 1976.**

Bleu brillant de coomassie, selon la méthode de Bradoford,(1976)	
⊕ Bleu brillant de coomassie G-250……..……	100 mg
⊕ Ethanol à 95%……	50 ml
⊕ Acide phosphorique à 85%……	100 ml
Le volume est complété avec de l'eau distillée stérile à 1000 ml. La solution est ensuite filtrée et conservée dans un flacon sombre à 4°C à l'abri de la lumière pour une période ne dépassant pas 1 mois.	

2. Préparation des milieux de cultures et des solutions utilisés pour la culture cellulaire

❖ Milieu DMEM (Gibco™)

Un sachet de milieu DMEM (~13.5g) est ajouté à 800 ml d'eau ultra-pure, à laquelle on ajoute 3.7 g de sodium bicarbonate "$NaHCO_3$"(Sigma-Aldrich), le tout est mis sous agitation et le pH est ajusté à 7 .4 grâce à une solution de HCl 1N.
Une fois le pH ajusté et le milieu reconstitué on ajuste le milieu à 1L ; en ajoutant de l'eau ultra pure.
On ajoute ensuite soit : 10% de SVF (Gibco™) pour l'entretien des cellules ou bien 20% de SVF pour la congélation et décongélation des cellules. De la Pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich) et un antifongique qui est l'Amphotericine B à 1% (Sigma) sont ajoutés pour prévenir une éventuelle contamination.
La solution DMEM ainsi préparée est ensuite filtrée et stérilisée à l'aide d'un système de filtration 0.22µm (Sigma-Aldrich) sous hotte à flux laminaire ; puis dispatchées dans des flacons stériles hermétiquement fermés où le type de milieu, la date de reconstitution du milieu, et le % SVF est noté.

❖ Solution PBS "Phosphate Bufferd Saline" (Gibco™)

Il s'agit d'un soluté physiologique, il peut être utilisé à des fins de lavage de cellules adhérentes ou non adhérentes afin d'enlever toute trace du milieu. La solution ne contient aucun composant d'origine animale. Il peut être disponible sous forme de sachets préparés (1 sachet pour reconstituer 1L de PBS) ou bien on le prépare.

- **Composition**

La composition ionique par litre de la solution **PBS**, est la suivante :

NaCl……..……8g
KCl…….0.2g
NaH_2PO_4…….....1.44g
KH_2PO_4……0.24g
Eau distillée ……1L

Ajuster le pH avec du HCl 7,4 et stériliser à l'autoclave.
La solution de PBS peut être conservée au réfrigérateur comme à température ambiante ne dépassant pas 25°C.

❖ Sérum de Veau fœtal (SVF)

Préalablement aliquotée dans des tubes Falcon de 50 ml et congelée à -20°C (50ml).

❖ Pénicilline- Streptomycine

Préalablement aliquotée dans des tubes Falcon de 15ml et congelée à -20°C (10ml).

Annexe 1

- **Antifongique**

L'Amphotericine préalablement aliquotée dans des tubes Eppendorf et congelée à -20°C (1ml).

- **Trypsine-EDTA**

Préalablement aliquotée dans des tubes Falcon de 15ml et congelée à -20°C (10ml).

- **L-glutamine**

Prélablement aliquotée dans des tubes Eppendorf et congelée à -20°C (1ml), son ajout dans le milieu booste de manière considérable la croissance cellulaire.

Annexe 2

Equipements et matériels utilisés

- Hotte microbiologique PSM à flux laminaire (lampe UV).
- Agitateur magnétique + plaque chauffante.
- Spectrophotomètre T60UV-visible (PG instruments, Lutterworth, England).
- Chromatographe Pharmacia LKB-UVicord SII (100 cmX2cm) (ALT,Connecticut, USA).
- Séquenceur de protéine (Applied Biosystems Protein sequencer ABI Procise 492/610A).
- Microscope photonique (Zeiss).
- Electrophorèse Omni PAGE - Mini systèmes d'électrophorèse verticale (Cleaver .Scientific.Ltd).
- Microscope électronique à balayage "SEM" (PHILIPS ASEM XL 30 ESEM).
- Matériels de culture microbiologiques et/ou consommables: Boites de Pétri, tubes Falcon, pipettes Pasteur, coton, barreaux magnétiques…etc)
- Irradiateur ELDORADO-78 AECL du CRNA: rayonnements gamma du Co^{60}.

La culture cellulaire est basée sur l'utilisation d'équipements tels que :

- Hotte à flux laminaire (PSM de grade II): C'est une enceinte qui permet de travailler stérilement sans flamme, l'air y est constamment filtré par des filtres absolus. Le mouvement de l'air, assuré par un puissant ventilateur, permet d'établir un flux laminaire d'air stérile sur le plan de travail.
- Incubateur thermostaté à CO_2 et à hygrométrie réglable (Forma™ Séries II 3110 Water Jacketed CO_2Incubator): réglé à une température de 37°C pour les cellules de mammifères, avec 5% de CO_2 sous forme gazeuse. L'incubateur doit être décontaminé régulièrement et le bac d'eau changé chaque semaine.
- Réfrigérateur: pour le stockage des milieux de culture à 4°C.
- Congélateur: pour le stockage de produits qui peuvent se dégrader à 4°C à long terme, en particulier les sérums (SVF), les antibiotiques, les antifongiques, les acides aminés...etc.
- Congélateur à -80°C pour la congélation des cellules.
- Mr Frosty™ (Thermo Fisher scientific) pour la congélation des cellules.

Annexe 2

- Bonbonne d'azote liquide -196°C (ARPEGE 40).
- Piptus rechargeable (accu-jet®).
- Autoclave: pour stérilisation du matériel de culture.
- Centrifugeuse (Centrusion Scientific K3 Series) : Thermostatées avec possibilité de changement de rotor pour plaques multipuits.
- Haemocytométre : cellule de Mallassez ou de Thomas.
- Microscope à contraste de phase inversé (BRESSER-Mikro Lab Cam).
- Bain-Marie : pour le réchauffement des milieux.
- Lecteur de plaque (BioTeksynergy HT).
- Microscope à fluorescence Leica DFC x345FX.
- Matériels de culture et/ou consommables: (tubes Falcon de différents volumes stériles, tubes Eppendorf, micro tubes de congélation, boites de Pétri stériles, pipettes de différents volumes stériles et jetables, Erlens, pipettes Pasteur stériles, système de filtration avec filtres de 0,22µm, matériel de dissection, microplaque de 96 multi puits et 6 mulipuits, flacons en verre auto lavables,. ….etc.

Annexe 3

Tests biochimiques galeries API® 20 E™ et API 50CH (Bio-Mérieux, France)

- **Préparation des galeries** : On prépare l'inoculum en prélevant plusieurs colonies identiques de l'isolat que l'on suspend dans une solution d'eau distillée stérile jusqu'à obtention d'une suspension d'opacité égale à 0.5 de Mc Farland (DO=0,063 à une longueur d'onde de 600 nm) * pour la galerie API 20^{E}.
- En ce qui concerne la galerie API 50 CH on réalise une suspension d'opacité égale à 2 Mc Farland (DO= 0,242 à une longueur d'onde de 600 nm)*dans l'ampoule d'API 50 CHB Medium puis remplir les tubules de la même manière et incuber à 30°C pendant 24h, 48 h.

Toutes les DO ont été déterminées grâce à un spectrophotomètre T60UV-visible (PG instruments, Lutterworth, England).

*Normes Mc Farland standard avec particules de latex issues de Hardy Diagnostics (12/10/2014), mesurées au laboratoire UCSF DeRisi

- **Lecture de la galerie**

On cherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu à part pour le test esculine (tube 25), où l'on observe un virage du rouge au noir.

Annexe 3

Tableau I : Résultats des tests biochimiques de la Galerie Api 20 E sur les dix souches sélectionnées.

N°	Test	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	ADH	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
3	LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	TDA	-	±	+	+	+	+	+	+	±	+
9	IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	GEL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
12	GLU	±	-	±	+	-	-	+	+	+	-
13	MAN	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
14	INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	SAC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
18	MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	AMY	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
20	ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Annexe 3

Tableau II: Résultats des tests biochimiques de la Galerie Api 50 CH sur les dix souches sélectionnées.

N°	Test	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	*T
0	0	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
1	Gly	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ery	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	LARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	DXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	MNE	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
14	SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	INO	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
18	MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

21	MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
24	ARB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	SAL	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
27	CEL	+/-	+	+/-	-	+/-	-	+-	+	-	-	+
28	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	SAC	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
32	TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	MLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	AMD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	GLYG	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
38	XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
39	GEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
40	TUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	TAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Annexe 3

45	**DARL**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	**LARL**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	**GNT**	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
48	**2KG**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	_
49	**5KG**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	_

(*T): *B. thuringiensis* var.berliner 1715 utilisée comme souche de référence, (+): positif, (-): négatif

Annexe 4

Tableau I: Critères de catégorisation de la sensibilité de *Bacilluss spp*. selon les valeurs critiques des CMI et des diamètres de zones d'inhibition de **CA-SFM/EUCAST, (2018)**.

	Concentrations critiques (mg/L) S ≤	R>	**Charge du disque (µg)**	**Diamètres critiques (mm)** S ≥	R<
AMINOSIDES					
Kanamycine	8	8	**30**	18	18
Gentamycine	**2**	**4**	**10**	**17**	**14**
Tobramycine	**2**	**4**	**10**	**17**	**14**
Streptomycine	**-**	**-**	**10**	**17**	**14-20**
BETA -LACTAMINES					
Cefalexine	**16**	**16**	**30**	**14**	**14**
Penicilline G	**0,5-1**	**0,25-2**	**10**	**15**	**12-18**
Ampicilline	**8**	**8**	**10**	**14**	**14**
PHENICOLES					
Chloram-phenicole	**8**	**8**	**30**	**17**	**17**
MACROLIDES					
Erythromycine	**0,5**	**0,25-1**	**15**	**26**	**23-29**
CEPHALOSPORINES					
Ceftriaxone	**1**	**2**	**30**	**25**	**22**

Annexe 5

Electrophorèse

a. Préparation des différents tampons

La composition et la préparation des différents tampons utilisés en électrophorèse sont :

- **Tampon d'électrophorèse :** Tris (3.03g), Glycine (14.41g), SDS (1g), dans 1L d'eau.
- **Tampon d'échantillon :** Tris-HCl 0.5M (12.5ml) pH6.8, sodium dodecyl sulfate (SDS) (2g), Glycérol (10ml), Sucrose (10g), bleu de Bromophénol (0.5g), Mercaptoéthanol (5.1 ml), dans 50 ml d'eau.
- **Ammonium persulfate (APS) 1.5%:** 0.15 g dans 10 ml.
- **Tris-HCl 1M (**2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol**):** 121.4g dans 1l, pH ajusté à 8.8 et 6.8 respectivement.
- **Sodium dodecyl sulfate de sodium (SDS) 10% :**10g dans 100ml d'eau distillée.
- **Acrylamide 50% :**48.75g d'acrylamide +1.25 g de bis acrylamide dans 100 ml d'eau distillée.
- **Gels de séparation et de concentration:** Les compositions du gel de séparation et de concentration sont données dans le tableau 7.
- **Solution de coloration (Stainning solution):** 0.1% bleu de Coomassie, 5% Ethanol, 5% acide acétique, compléter avec de l'eau distillée
- **Solution de décoloration (déstainning solution):** 7.5% Ethanol, 5% Acide acétique, compléter avec de l'eau distillée.

Annexe 6

Tableau I : Amorces utilisés pour le dépistage des parasporines 1, 2, 3 et 4 (Les amorces utilisés dans cette étude sont fournis par IDT DNA company (Belgique).

No	Amorce	Sequences	Longueur (bp)	Temperature de recuit (Annealing temperature)	Amplicon taille (bp)	Reference
1	***PS1-BDzG20*-F**	**5'-GGGCACATAAATAAAATTATTG-3'**	**22**	**58**	**2694**	**Mizuki et *al.*, (2000)**
	***PS1-BDzG21*-R**	**5'-ATATAACTAATGCTTAGTTTAC-3'**	**22**			
	***PS1-BDzG22*-F**	**5'-GGCTGAACCACCTTCAACTGG-3'**	**21**	**56**	**918**	
	***PS1-BDzG23*-R**	**5'-AGCATACGCATTAGTATTTGG-3'**	**21**			
	***PS1*F**	**5'-ATGCGAAATACTCTATGCARAGATTTACC-3'**	**29**	**57**	**1059**	**Chubicka *et al.*, (2018)**
	***PS1*R**	**5'-ATCTTGACTTGTTATACCGCCTGGTATTCC-3'**	**30**			
2	***PS2*F**	**5'-GATGGTATTGCATTAAATAATGAAAC-3'**	**26**	**60**	**700**	
	***PS2*R**	**5'-GCTGGTTGYACTAYAGTTTGGAAGT-3'**	**25**			
3	***PS3*F**	**5'-TGAATGGGCACTTCGAAAACA-3'**	**21**	**60**	**912**	
	***PS3*R**	**5'-ACATCGCGGRCCCAAAATTC-3'**	**20**			
4	***PS4*F**	**5'-TGGTGTGCTGCAAGGGGATA-3'**	**20**	**60**	**828**	
	***PS4*R**	**5'-CCGCTTGGTAGCGAAACTGG-3'**	**20**			

Bacillus thuringiensis strain *BDzA* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203612.1

LOCUS MN203612 1482 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzA 16S ribosomal RNA gene, partialsequence.
ACCESSION MN203612
VERSION MN203612.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
       1 tctgctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg aatggattaa
      61 gagcttgctc ttatgaagtt agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggta acctgcccat
     121 aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga taacattttg aaccgcatgg
     181 ttcgaaattg aaaggcggct tcggctgtca cttatggatg gacccgcgtc gcattagcta
     241 gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcgtagc cgacctgaga gggtgatcgg
     301 ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
     361 gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggctt tcgggtcgta
     421 aaactctgtt gttagggaag aacaagtgct agttgaataa gctggcacct tgacggtacc
     481 taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc
     541 gttatccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggtggt ttcttaagtc tgatgtgaaa
     601 gcccacggct caaccgtgga gggtcattgg aaactgggag acttgagtgc agaagaggaa
     661 agtggaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatat ggaggaacac cagtggcgaa
     721 ggcgactttc tggtctgtaa ctgacactga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
     781 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg gtttccgccc
     841 tttagtgctg aagttaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggccg caaggctgaa
     901 actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
     961 acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac cctagagata gggcttctcc
    1021 ttcgggagca gagtgacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg
    1081 gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc catcatttag ttgggcactc
    1141 taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc
    1201 cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacggtac aaagagctgc aagaccgcga
    1261 ggtggagcta atctcataaa accgttctca gttcggattg taggctgcaa ctcgcctaca
    1321 tgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc
    1381 ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg tggggtaacc
    1441 tttttggagc cagccgccta aggtgggaca gatgattggg tg
```

Bacillus thuringiensis strain *BDzB* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203613.1

LOCUS MN203613 1480 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203613
VERSION MN203613.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae;; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 cctgctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg aatggattaa
       61 gagcttgctc ttatgaagtt agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggta acctgcccat
      121 aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga taatattttg aactgcatgg
      181 ttcgaaattg aaaggcggct tcggctgtca cttatggatg gacccgcgtc gcattagcta
      241 gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcgtagc cgacctgaga gggtgatcgg
      301 ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
      361 gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggctt tcgggtcgta
      421 aaactctgtt gttagggaag aacaagtgct agttgaataa gctggcacct tgacggtacc
      481 taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc
      541 gttatccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggtggt ttcttaagtc tgatgtgaaa
      601 gcccacggct caaccgtgga gggtcattgg aaactgggag acttgagtgc agaagaggaa
      661 agtggaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatat ggaggaacac cagtggcgaa
      721 ggcgactttc tggtctgtaa ctgacactga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
      781 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg gtttccgccc
      841 tttagtgctg aagttaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggccg caaggctgaa
      901 actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
      961 acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgaaaac cctagagata gggcttctcc
     1021 ttcgggagca gagtgacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg
     1081 gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc catcattaag ttgggcactc
     1141 taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc
     1201 cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacggtac aaagagctgc aagaccgcga
     1261 ggtggagcta atctcataaa accgttctca gttcggattg taggctgcaa ctcgcctaca
     1321 tgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc
     1381 ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg tggggtaacc
     1441 tttttggagc cagccgccta aggtggacag atgattgggg
```

Annexe 7

Bacillus thuringiensis strain *BDzC* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203614.1

LOCUS MN203614 1482 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203614
VERSION MN203614.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensisBacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 tctgctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg aatggattaa
       61 gagcttgctc ttatgaagtt agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggta acctgcccat
      121 aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga taacattttg aaccgcatgg
      181 ttcgaaattg aaaggcggct tcggctgtca cttatggatg gacccgcgtc gcattagcta
      241 gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcgtagc cgacctgaga gggtgatcgg
      301 ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
      361 gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggctt tcgggtcgta
      421 aaactctgtt gttagggaag aacaagtgct agttgaataa gctggcacct tgacggtacc
      481 taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc
      541 gttatccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggtggt ttcttaagtc tgatgtgaaa
      601 gcccacggct caaccgtgga gggtcattgg aaactgggag acttgagtgc agaagaggaa
      661 agtggaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatat ggaggaacac cagtggcgaa
      721 ggcgactttc tggtctgtaa ctgacactga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
      781 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg gtttccgccc
      841 tttagtgctg aagttaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggccg caaggctgaa
      901 actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
      961 acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac cctagagata gggcttctcc
     1021 ttcgggagca gagtgacagg tggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg
     1081 gttaagtccc gcaacgagcg caacccttga tcttagttgc catcatttag ttgggcactc
     1141 taaggtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaaat catcatgccc
     1201 cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacggtac aaagagctgc aagaccgcga
     1261 ggtggagcta atctcataaa accgttctca gttcggattg taggctgcaa ctcgcctaca
     1321 tgaagctgga atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc
     1381 ttgtacacac cgcccgtcac accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg tggggtaacc
     1441 tttttggagc cagccgccta aggtgggaca gatgattggg tg
```

Annexe 7

Bacillus thuringiensis strain *BDzD* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203615.1

LOCUS MN203615 1486 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203615
VERSION MN203615.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 ctgctcagga tgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcga atggattaag
       61 agcttgctct tatgaagtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcccata
      121 agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aacattttga accgcatggt
      181 tcgaaattga aaggcggctt cggctgtcac ttatggatgg acccgcgtcg cattagctag
      241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc
      301 cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg
      361 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggcttt cgggtcgtaa
      421 aactctgttg ttagggaaga acaagtgcta gttgaataag ctggcacctt gacggtacct
      481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
      541 ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggtggtt tcttaagtct gatgtgaaag
      601 cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaga cttgagtgca gaagaggaaa
      661 gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatatg gaggaacacc agtggcgaag
      721 gcgactttct ggtctgtaac tgacactgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
      781 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgccct
      841 ttagtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
      901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
      961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaacc ctagagatag ggcttctcct
     1021 tcgggagcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
     1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc atcattaagt tgggcactct
     1141 aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc
     1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag
     1261 gtggagctaa tctcataaaa ccgttctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
     1321 gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
     1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaacct
     1441 tttggagcca gccgcctaag gtgggacaga tgattggggt gagtcg
```

Bacillus thuringiensis strain *BDzE* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203616.1

LOCUS MN203616 1486 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203616
VERSION MN203616.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 ctgctcagga tgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcga atggattaag
       61 agcttgctct tatgaagtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcccata
      121 agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aacattttga accgcatggt
      181 tcgaaattga aaggcggctt cggctgtcac ttatggatgg acccgcgtcg cattagctag
      241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc
      301 cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg
      361 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggcttt cgggtcgtaa
      421 aactctgttg ttagggaaga acaagtgcta gttgaataag ctggcacctt gacggtacct
      481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
      541 ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggtggtt tcttaagtct gatgtgaaag
      601 cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaga cttgagtgca gaagaggaaa
      661 gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatatg gaggaacacc agtggcgaag
      721 gcgactttct ggtctgtaac tgacactgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
      781 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgccct
      841 ttagtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
      901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
      961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgaaaacc ctagagatag ggcttctcct
     1021 tcgggagcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
     1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc atcattaagt tgggcactct
     1141 aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc
     1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag
     1261 gtggagctaa tctcataaaa ccgttctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
     1321 gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
     1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaacct
     1441 ttttggagcc agccgcctaa ggtgggacag atgattgggt gagcgt
```

Bacillus thuringiensis strain *BDzF* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203617.1

LOCUS MN203617 1479 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203617
VERSION MN203617.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 ctgctcagga tgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcga atggattaag
       61 agcttgctct tatgaagtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcccata
      121 agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aacattttga accgcatggt
      181 tcgaaattga aaggcggctt cggctgtcac ttatggatgg acccgcgtcg cattagctag
      241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc
      301 cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg
      361 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggcttt cgggtcgtaa
      421 aactctgttg ttagggaaga acaagtgcta gttgaataag ctggcacctt gacggtacct
      481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
      541 ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggtggtt tcttaagtct gatgtgaaag
      601 cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaga cttgagtgca gaagaggaaa
      661 gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatatg gaggaacacc agtggcgaag
      721 gcgactttct ggtctgtaac tgacactgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
      781 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgccct
      841 ttagtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
      901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
      961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaacc ctagagatag ggcttctcct
     1021 tcgggagcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
     1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc atcatttagt tgggcactct
     1141 aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc
     1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag
     1261 gtggagctaa tctcataaaa ccgttctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
     1321 gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
     1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaacct
     1441 ttttggagcc agccgcctaa ggtgggacng atgattggg
```

Bacillus thuringiensis strain *BDzG* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203618.1

LOCUS MN203618 1481 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzG 16S ribosomal RNA gene, partialsequence.
ACCESSION MN203618
VERSION MN203618.1
KEYWORDS .
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis,Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 tgctcaggat gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgagcgaa tggattgaga
       61 gcttgctctc aagaagttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccataa
      121 gactgggata actccgggaa accggggcta ataccggata ayattttgaa ctgcatggtt
      181 cgaaattgaa aggcggcttc ggctgtcact tatggatgga cccgcgtcgc attagctagt
      241 tggtgaggta acggctcacc aaggcaacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc
      301 acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc
      361 aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat gaaggctttc gggtcgtaaa
      421 actctgttgt tagggaagaa caagtgctag ttgaataagc tggcaccttg acggtaccta
      481 accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt
      541 tatccggaat tattgggcgt aaagcgcgcg caggtggttt cttaagtctg atgtgaaagc
      601 ccacggctca accgtggagg gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggaaag
      661 tggaattcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatatgg aggaacacca gtggcgaagg
      721 cgactttctg gtctgtaact gacactgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag
      781 ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttagagggt ttccgccctt
      841 tagtgctgaa gttaacgcat taagcactcc gcctggggag tacggccgca aggctgaaac
      901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac
      961 gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgaaaaccc tagagatagg gcttctcctt
     1021 cgggagcaga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt
     1081 taagtcccgc aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca tcattaagtt gggcactcta
     1141 aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccccc
     1201 tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gacggtacaa agagctgcaa gaccgcgagg
     1261 tggagctaat ctcataaaac cgttctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg
     1321 aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt
     1381 gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgtaacaccc gaagtcggtg gggtaacctt
     1441 tttggagcca gccgcctaag gtgggacaga tgattggggg a
```

Bacillus thuringiensis strain *BDzH* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203619.1

LOCUS MN203619 1479 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203619
VERSION MN203619.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis; Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 ctgctcagga tgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcga atggattaag
       61 agcttgctct tatgaagtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcccata
      121 agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aacattttga accgcatggt
      181 tcgaaattga aaggcggctt cggctgtcac ttatggatgg acccgcgtcg cattagctag
      241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc
      301 cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg
      361 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggcttt cgggtcgtaa
      421 aactctgttg ttagggaaga acaagtgcta gttgaataag ctggcacctt gacggtacct
      481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
      541 ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggtggtt tcttaagtct gatgtgaaag
      601 cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaga cttgagtgca gaagaggaaa
      661 gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatatg gaggaacacc agtggcgaag
      721 gcgactttct ggtctgtaac tgacactgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
      781 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgccct
      841 ttagtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
      901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
      961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaacc ctagagatag ggcttctcct
     1021 tcgggagcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
     1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc atcatttagt tgggcactct
     1141 aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc
     1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag
     1261 gtggagctaa tctcataaaa ccgttctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
     1321 gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
     1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaacct
     1441 ttttggagcc agccgcctaa ggtgggacng atgattggg
```

Annexe 7

Bacillus thuringiensis strain *BDzI* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203620.1

LOCUS MN203620 1479 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203620
VERSION MN203620.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis; Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 ctgctcagga tgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcga atggattaag
       61 agcttgctct tatgaagtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcccata
      121 agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aacattttga accgcatggt
      181 tcgaaattga aaggcggctt cggctgtcac ttatggatgg acccgcgtcg cattagctag
      241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc
      301 cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg
      361 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggcttt cgggtcgtaa
      421 aactctgttg ttagggaaga acaagtgcta gttgaataag ctggcacctt gacggtacct
      481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
      541 ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggtggtt tcttaagtct gatgtgaaag
      601 cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaga cttgagtgca gaagaggaaa
      661 gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatatg gaggaacacc agtggcgaag
      721 gcgactttct ggtctgtaac tgacactgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
      781 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgccct
      841 ttagtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
      901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
      961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaacc ctagagatag ggcttctcct
     1021 tcgggagcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
     1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc atcatttagt tgggcactct
     1141 aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc
     1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag
     1261 gtggagctaa tctcataaaa ccgttctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
     1321 gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
     1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaacct
     1441 ttttggagcc agccgcctaa ggtgggacng atgattggg
```

Bacillus thuringiensis strain *BDzJ* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN203621.1

LOCUS MN203621 1479 bp DNA linear BCT 27-JUL-2019
DEFINITION Bacillus thuringiensis strain BDzJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN203621
VERSION MN203621.1
SOURCE Bacillus thuringiensis
ORGANISM Bacillus thuringiensis; Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus;Bacillus cereus group.

AUTEURS **Aberkane, L.**, Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek, A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.

ORIGIN

```
        1 ctgctcagga tgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca agtcgagcga atggattaag
       61 agcttgctct tatgaagtta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcccata
      121 agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat aacattttga accgcatggt
      181 tcgaaattga aaggcggctt cggctgtcac ttatggatgg acccgcgtcg cattagctag
      241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc
      301 cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg
      361 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggcttt cgggtcgtaa
      421 aactctgttg ttagggaaga acaagtgcta gttgaataag ctggcacctt gacggtacct
      481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg
      541 ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggtggtt tcttaagtct gatgtgaaag
      601 cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaga cttgagtgca gaagaggaaa
      661 gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatatg gaggaacacc agtggcgaag
      721 gcgactttct ggtctgtaac tgacactgag gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
      781 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttagaggg tttccgccct
      841 ttagtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
      901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
      961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaacc ctagagatag ggcttctcct
     1021 tcgggagcag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
     1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc atcattaagt tgggcactct
     1141 aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc
     1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagagctgca agaccgcgag
     1261 gtggagctaa tctcataaaa ccgttctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
     1321 gaagctggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct
     1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt ggggtaacct
     1441 ttttggagcc agccgcctaa ggtgggacng atgattggg
```

Annexe 8

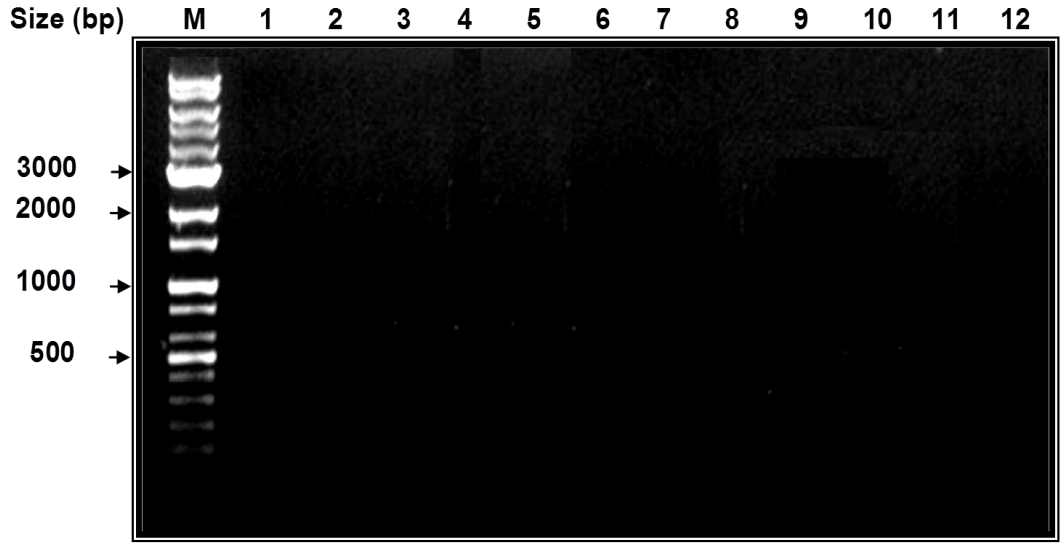


Figure I: Recherche par analyse PCR du gène codant pour la PS2 (**M:** Marker 1 kb Plus DNA Ladder from Invitrogen, France), **Colonne 1**: H_2O, **Colonne 2**: Souche de référence (*B. thuringiensis* serovar *berliner* 1915), **Colonne 3**: *BDzA*, **Colonne 4**: *BDzB*, **Colonne 5**: *BDzC*, **Colonne 6**: *BDzD*, **Colonne 7**: *BDzE*, **Colonne 8**: *BDzF*, **Colonne 9:** *BDzG*, **Colonne 10**: *BDzH*, **Colonne 11**: *BDzI*, et **Colonne 12**: *BDzJ*.

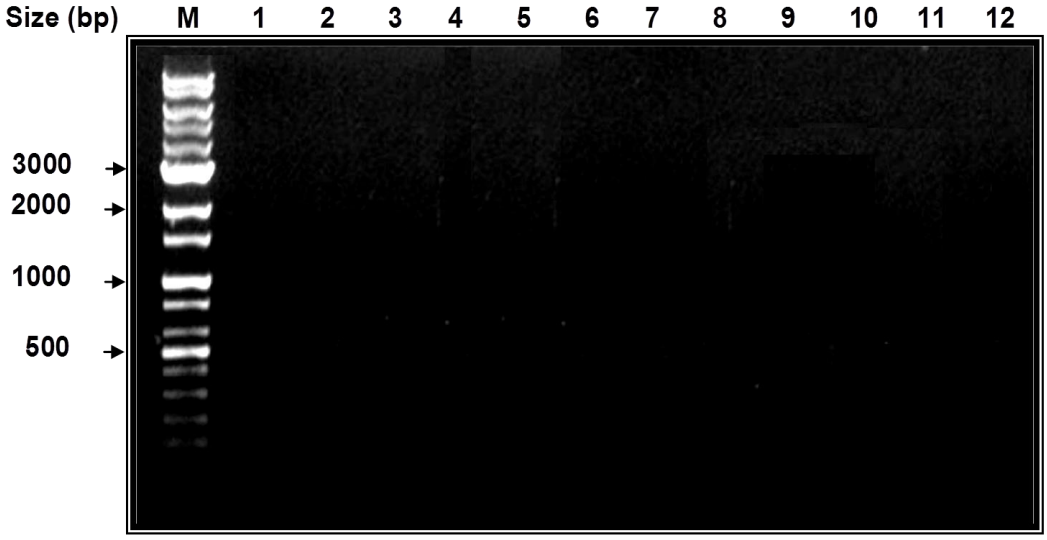


Figure II: Recherche par analyse PCR du gène codant pour la PS3 (**M:** Marker 1 kb Plus DNA Ladder from Invitrogen, France), **Colonne 1**: H_2O, **Colonne 2**: Souche de référence (*B. thuringiensis* serovar *berliner* 1915), **Colonne 3**: *BDzA*, **Colonne 4**: *BDzB*, **Colonne 5**: *BDzC*, **Colonne 6**: *BDzD*, **Colonne 7**: *BDzE*, **Colonne 8**: *BDzF*, **Colonne 9:** *BDzG*, **Colonne 10**: *BDzH*, **Colonne 11**: *BDzI*, et **Colonne 12**: *BDzJ*.

Annexe 8

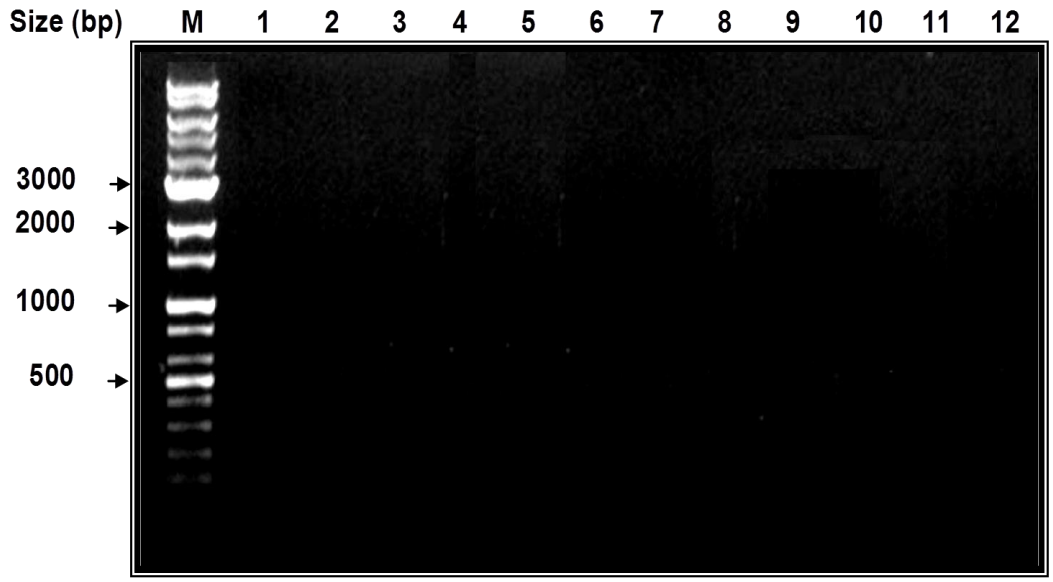


Figure III : Recherche par analyse PCR du gène codant pour la PS4 (**M:** Marker 1 kb Plus DNA Ladder from Invitrogen, France), **Colonne 1**: H_2O, **Colonne 2**: Souche de référence (*B. thuringiensis* serovar *berliner* 1915), **Colonne 3**: *BDzA*, **Colonne 4**: *BDzB*, **Colonne 5**: *BDzC*, **Colonne 6**: *BDzD*, **Colonne 7**: *BDzE*, **Colonne 8**: *BDzF*, **Colonne 9:** *BDzG*, **Colonne 10**: *BDzH*, **Colonne 11**: *BDzI*, et **Colonne 12**: *BDzJ*.

81-kDa parasporin-1 [*Bacillus thuringiensis*]

GenBank: QGJ15868.1

```
LOCUS       QGJ15868                723 aalinear   BCT 20-NOV-2019
DEFINITION  81-kDa parasporin-1 [Bacillus thuringiensis].
ACCESSION   QGJ15868
VERSION     QGJ15868.1
DBSOURCE    accession MN637834.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus thuringiensis
ORGANISM  Bacillus thuringiensis
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus
cereus group.
REFERENCE   1  (residues 1 to 723)
AUTEURS Aberkane, L., Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, LN, Ouafek,
A.,Bouslama, L., Grib, H., Nateche, F. et Djefal, A.
JOURNAL   Submitted (02-NOV-2019) Medical Applications Department, Nuclear
          Applications Division, Nuclear Research Center of Algiers
(CRNA),02Bd Frantz Fanon, Algiers, Algiers-Gare 16000, Algeria
FEATURES             Location/Qualifiers
source          1..723
                     /organism="Bacillus thuringiensis"
                     /strain="BDzG"
                     /isolation_source="soil"
                     /db_xref="taxon:1428"
                     /country="Algeria"
                     /collected_by="L. Aberkane"
                     /PCR_primers="fwd_name: ps1-orf-f, fwd_seq:
gggcacataaataaaattattg, rev_name: ps1-orf-r, rev_seq:
atataactaatgcttagtttac"
Protein         1..723
                     /product="81-kDa parasporin-1"
                     /name="toxin"
CDS             1..723
                     /gene="ps1"
                     /coded_by="MN637834.1:259..2430"
                     /note="Athlp"
                     /transl_table=11

ORIGIN
        1 mgpfsnyseqkypesnndqqiitksssfysdttnenaknyhpieqdilkftnqefsdnhy
       61 qhsdvsndinsmrntlckdlppetnmsirfnlrstvtvpsfsnqfdpikflhdieiaiqt
      121 gsfsaltqsnmnqggtdinpmlistffkvassllpfplsslgalasfyvtdsqtgamanl
      181 wrqmvdyvekridskildyhnfimgaelaalnaslkeyarvvkifendmnrmaeppstgv
      241 itqyrilndnfikyiaklqfstnqsdlqypvltlplraqacvmhlmllkdattsvwgqqi
      301 dsqqlngykaelirlikvytndvnttynqglelekakplnysdpeeylqagrpgisvlrs
      361 nfkevmkwnrvakykrgmamsalslaalfptfgpnypkqalkvvqfrqifapvigipggi
      421 tsqdhsgtfgsmrfdvktydqidalrrlmelyiqplksayfyiyesdwkvratyvndyig
      481 krgsntglawamwssdpsviytsalgaagyapnvvgvryshggsytkgmappntnayapf
      541 efkypgyklhsvsayglskapdtadsvmfgfrpvlleneanqlltdtalqipaeigisdv
      601 vpafgrteepingqdaiiiwesftsgfgftytvdspqkqkykiiyriannlsastvslty
      661 nnqtfftdilntsldpncvrgnygsytlvegpiiefsqgtnifklrsqkgefaidsiifs
      721 pvs
```

Annexe 10

Tableau I : Représentant le calcul des **IC_{20}, IC_{50} et IC_{80} (µg/ml)** des différentes fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules HEp2 déduites des courbes dose-réponse en utilisant le programme Origin 16.

Fractions	PM	IC20	SD	IC50	SD	IC80	SD
	(kDa)	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur
F14	81,84	58,99371	1,36495	23,17154	0,06822	9,10131	0,46159
F23	58,74	56,64941	1,34574	22,16854	0,06987	8,67518	0,45978
F24	56,62	26,11404	0,36878	2,33767	0,69673	0,20926	0,39302
F27	50,69	496,86032	0,90141	7,96907	0,65495	0,12781	0,38324
F32	42,16	63,3031	1,23467	17,16585	0,11005	4,65485	0,42038
F33	40,64	91,59591	0,9705	9,34333	0,32862	0,95308	0,40847
F34	39,17	63,9628	1,21546	16,4232	0,11879	4,21685	0,41856
F35	37,75	60,33419	1,26869	18,56479	0,09422	5,71237	0,42827
F36	36,39	43,43685	1,1478	14,05415	0,11461	4,54727	0,46091
F37	35,07	40,76862	1,14288	13,89555	0,11077	4,73615	0,47268
F38	33,8	49,80551	1,28908	19,45725	0,07523	7,60126	0,46169
F39	32,58	61,3465	1,29268	19,61899	0,08796	6,27427	0,43042
F40	31,4	41,60772	1,22786	16,89906	0,07973	6,86359	0,48337
F42	27,8	29,70917	0,58797	3,87234	0,62888	0,50473	0,53646

Annexe 10

Tableau II : Représentant le calcul des **IC_{20}, IC_{50} et IC_{80} (µg/ml)** des différentes fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules A549 déduite des courbes dose-réponse en utilisant le programme Origin 16.

Fractions	PM	IC20	SD	IC50	SD	IC80	SD
	(kDa)	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur
F14	81,84	25,58835	1,48345	21,65444	1,33555	18,32533	0,49553
F23	58,74	30,42118	1,4776	25,74428	1,41068	21,7864	0,53215
F24	56,62	21,91436	0,57444	18,54529	1,26823	15,69417	0,69631
F27	50,69	32,43629	0,33544	27,44959	1,43854	23,22954	1,13621
F32	42,16	37,2253	1,06228	31,50235	1,49834	26,65923	0,63592
F33	40,64	30,18275	0,6073	25,54251	1,40726	21,61565	1,84418
F34	39,17	40,75302	1,01963	34,48773	1,53766	29,18565	2,34899
F35	37,75	45,73946	1,17619	38,70756	1,5878	32,75673	0,56193
F36	36,39	37,22529	1,22856	31,50234	1,49834	26,65923	0,52785
F37	35,07	32,73369	1,28797	27,70127	1,4425	23,44253	0,60087
F38	33,8	34,31348	1,47493	29,03819	1,46297	24,57391	0,75233
F39	32,58	38,18813	1,216	32,31716	1,50943	27,34878	0,08378
F40	31,4	33,6977	1,53857	28,51708	1,45511	24,13291	0,06412
F42	27,8	22,83374	0,68036	19,32333	1,28608	16,35259	0,14697

Annexe 10

Tableau III : Représentant le calcul des **IC_{20}, IC_{50} et IC_{80} (µg/ml)** des différentes fractions protéiques (PS1-*BDzG*) envers les cellules Véro déduite des courbes dose-réponse en utilisant le programme Origin 16.

Fractions	PM	IC20	SD	IC50	SD	IC80	SD
	(kDa)	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur	Valeur
F14	81,84	69,67343	1,5092	32,29999	0,07713	14,97399	0,67037
F23	58,74	117,90849	1,40387	35,34374	0,12828	15,44749	0,39988
F24	56,62	249,70881	1,80239	63,44371	0,253	26,11919	0,60245
F27	50,69	145,35103	1,32426	38,09904	0,24213	16,44957	0,20478
F32	42,16	206,33524	1,3594	22,87687	0,17456	12,53641	0,26835
F33	40,64	40,4954	1,31355	26,58476	0,06888	19,46371	0,75611
F34	39,17	222,6524	1,19089	35,52008	0,20361	19,08183	0,21408
F35	37,75	97,64128	1,20407	35,99827	0,15199	18,62127	0,294
F36	36,39	42,80658	1,23228	27,07167	0,23935	16,89223	0,19776
F37	35,07	57,34096	1,31889	28,83959	0,09318	17,57379	0,5638
F38	33,8	138,43181	0,90131	29,90672	0,23424	14,58054	0,19064
F39	32,58	287,59515	1,43591	27,28406	0,21596	19,02061	0,23977
F40	31,4	100,22835	1,53237	34,06972	0,10349	11,58101	0,56142
F42	27,8	35,12248	1,06968	11,74027	0,13619	3,92438	0,52537

VALORISATIONS

In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian Bacillus thuringiensis *Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers*

Lila Aberkane, Assia Nacer-Khodja, Zahia Djenane, Lydia Neila Djouadi, Abdelhakim Ouafek, Lamjed Bouslama, Hocine Grib, et al.

Current Microbiology

ISSN 0343-8651

Curr Microbiol
DOI 10.1007/s00284-019-01841-2

Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Author's personal copy

Current Microbiology
https://doi.org/10.1007/s00284-019-01841-2

In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus thuringiensis* Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers

Lila Aberkane[1,4] · Assia Nacer-Khodja[1] · Zahia Djenane[2] · Lydia Neila Djouadi[2] · Abdelhakim Ouafek[1] · Lamjed Bouslama[3] · Hocine Grib[4] · Nabil Mameri[4] · Farida Nateche[2] · Assia Djefal[1]

Received: 1 August 2019 / Accepted: 4 December 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Parasporins (PS), a class of non-insecticidal and non-hemolytic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), are being explored as promising anti-cancer agents due to their specific toxicity to cancer cells. This work is considered as a first initiative aiming at investigating Algerian soil *Bt* isolates' activity and cytotoxic potential against cancer cells. A total of 48 *Bacillus* spp. were isolated from different sites in Algeria. Phenotypic and biochemical tests, *16S* rDNA molecular identification, and microscopic observation of crystal have confirmed the identification of *Bt* for ten strains. A screening for non-hemolytic crystalline proteins was performed. Extraction, purification, and activation of non-hemolytic proteins by chromatographic analysis yielded several polypeptides of different molecular weights. A purified PS1, with pro-protein of 81 kDa and several peptides with different molecular weights (18–58 kDa) after activation by trypsin, has been identified from the strain *BDzG*. The NH_2-terminal sequence deciphered in BLAST analysis showed homology to a *Bt* PS1 protein. Moreover, the screening of parasporin-1 (*PS1*) gene has also been performed. Cytocidal activity against human epithelial type 2 (HEp2) cells, considered to originate from a human laryngeal carcinoma, was observed with an IC_{50} equal to 2.33 µg/ml, while moderate cytotoxicity against adenocarcinomic human alveolar basal epithelial (A549) cells has been shown with IC_{50} equal to 18.54 µg/ml. No cytotoxicity against normal cells was noted. Fluorescence microscopy revealed a condensed or fragmented chromatin indicating the apoptotic death of HEp2 cells. Thus, *Bt* PS-producer isolated from Algerian soil might have a potential to join the arsenal of natural anti-cancer drugs with high therapeutic potential.

Introduction

More than 53,000 new cancer cases are annually detected causing more than 29,000 deaths in Algeria according to the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the World Health Organization (WHO) reports. Over the past 5 years, the number of cases has been about 127,306. For men, lung and laryngeal cancers take a prominent place in Algeria [1]. Conventional radiotherapy and chemotherapy have given very satisfactory results. However, two problems limiting their use have quickly emerged: (i) the toxicity toward healthy tissues and (ii) the appearance of cells resistance to the cytotoxic effect of anti-cancer agents.

Bacillus spp. strains are important producers of bioactive molecules that can be used in many fields including agriculture and environment [2], and in the development of new anti-cancer drugs [3]. *Bt* is a Gram-positive bacterium that is ubiquitous in various ecological habitats such as soil, sediments, stored products, dust, dead insects, phylloplane, and aquatic environments [4]. It produces a variety of toxic

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00284-019-01841-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Assia Djefal
a.djefal@crna.dz

1 Medical Applications Department, Nuclear Applications Division, Nuclear Research Center of Algiers (CRNA), 02 Bd Frantz Fanon, P.O. Box 399, 16000 Algiers-Gare, Algiers, Algeria

2 Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LCMB), Microbiology Team, Faculty of Biological Sciences, University of Sciences and Technology of Houari Boumediene (USTHB), P.O. Box 32, El Alia, 16111 Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

3 Laboratory of Bioactive Substances, Center of Biotechnology of Borj Cedria (CBBC), University of Tunis El Manar, P.O. Box 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia

4 Environmental Engineering Department, National Polytechnic School of Algiers (ENP), 10 Rue des Frères Oudek, Hacène Badi, PO Box 182, 16200 El Harrach, Algiers, Algeria

Published online: 16 December 2019

Author's personal copy

proteins in both vegetative and sporulated stages [5]. During the sporulation phase, *Bt* produced two types of parasporal toxins: crystal (*cry*) and cytolytic (*cyt*) [6]. When processed, some *cry* proteins exhibit specific insecticidal activities against lepidopteran, dipteran, or coleopteran larvae [7]. Mizuki et al. were the first scientists who attempted large-scale screening of *Bt* strains whose parasporal inclusion proteins are often non-hemolytical and non-insecticidal but cytocidal in human cancer [6, 8–10]. The findings of the former studies help in identifying another class of *cry* protein called parasporin (PS) [11]. Some of them affected a wide range of human cancer cells, while others acted on only a few specific cell types [12]. In accordance with the Committee of Parasporin Classification and Nomenclature, only six PS families (PS1–PS6) have been identified in Japan, Vietnam, India, Canada, and Iran [10, 13–17]. Later, the anti-cancer effects of these PS have been demonstrated on different cancer cell lines in several studies, PS1 [5, 18–22], PS2 [15, 23–25], PS3 [26], PS4 [27], PS5 [28], and PS6 [29]. However, *cyt* proteins exert in vitro a cytolytic and hemolytic activity on mammalian cell lines [13]. Accordingly, the current study focuses on the isolation of *Bt* strains from different geographical soil sites in Algeria, then on the screening and the identification of *Bt* strains whose inclusions are not hemolytic but specifically cytocidal toward cancer cells: human epithelial type 2 (HEp2) cells, a human laryngeal carcinoma, and adenocarcinomic human alveolar basal epithelial (A549) cells but not on normal cells: kidney epithelial cells extracted from an African green monkey (Vero).

Materials and Methods

Sampling, Bacterial Isolating, and Culturing

Different soil samples were collected from various locations distributed all over the Algerian territory. Soil samples were harvested at 10 cm depth and stored in sterile bags at 4 °C until use. Culturing conditions have been carried out as described by Djenane et al. [4].

Microscopic Identification of Isolates

Colonies with morphological features that are peculiar to the *Bacillus* spp. group (whitish, not bright, dry, rough, surface, and irregular border) were preselected and examined by means of a phase-contrast microscope (Leitz, Diaplan, Germany). Staining of the preselected colonies was performed using Coomassie Brilliant Blue G-250 solution [17, 30]. Colonies containing bacillary forms producing spores were selected as *Bacillus* spp. isolates and were differentiated as *Bt* isolates by their parasporal inclusions.

Biochemical and Biotyping Identification

Biochemical characterization was performed using Gram staining, catalase, and oxydase tests and analytical profile index (API) 20E and 50CH systems (bioMérieux, France) according to the manufacturer's instructions. Isolates' biochemical typing has been completed by four tests (Esculin utilization, lecithinase production, acid formation from sucrose, and salicin) as described by Martin and Travers [31].

Hemolytic Activity

Hemolytic activity was tested in blood of a healthy donor with solubilized proteins according to the protocol described by Mizuki et al. [6] and Ishii et al. [12]. The used human blood was gift from the Pasteur Institute of Algiers. *B. thuringiensis* serovar *berliner* 1715 and *B. thuringiensis* serovar *berliner* 1915 (DSM 350) were considered as positive controls.

16S rDNA Identification and Parasporin-1 Gene Screening

A colony DNA extraction was performed using Omega Biotech Mag-Bind Universal Pathogen Kit. The polymerase chain reaction (PCR) of the *16S* rDNA was performed using the universal primers *16S*-27F (5′-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3′) and *16S*-1492R (5′-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3′) [32]. The amplification process was performed in 25 µl reaction mixture containing 5 µl Mix HOTBIO-Amp 5× (at 12.5 mM $MgCl_2$), 1.5 µl Enhancer 10×, 1 µl of each primer (10 mM), and 2 µl of DNA template (200 ng). The PCR amplification was conducted as follows: 35 cycles, 96 °C for 20 s denaturation, 56 °C for 20 s primer annealing, and 72 °C for 90 s extension. PCR products were analyzed using the Qiagen QIAxcel® capillary electrophoresis system and an expected band of ~ 1.5 kb was observed. PCR products were purified using ExoSap-It kit (Thermo Fisher Scientific), diluted at 1/15, and then sequenced using the BigDyeV3.1 Dye Terminator Kit. The sequence reactions were purified with the BigDyeX terminator kit and analyzed on ABI 3730 XL 96-capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were verified and aligned using CHROMAS Pro software and *16S* gene contigs were analyzed using Blast-N tool (http://www.ncbi.nim.nih.gov). The PCR of parasporin coding *PS1* gene was performed using *PS1-BDzG20*-F (5′-GGGCACATAAATAAA ATTATTG-3′) and *PS1-BDzG21*-R (5′-ATATAACTAATG CTTAGTTTAC-3′) primers (Integrated DNA Technologies,

Author's personal copy

Inc. (IDT DNA Company, Belgium) as described by Mizuki et al. [8]. The amplification process was performed in 25 µl reaction mixture containing 5 µl Mix HOTSTART 5×, 1.5 µl Enhancer 10×, 1 µl of each primer, and 5 µl of DNA template (200 ng). The PCR amplification was conducted as follows: 35 cycles, 96 °C for 20 s denaturation, 58 °C for 20 s primer annealing, and 72 °C for 60 s extension. The PCR products were analyzed using 1% agarose gel containing 0.5 g/ml ethidium bromide in an horizontal gel electrophoresis units (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using Tarsons Midi Submarine Electrophoresis Unit. The electrophoretic migration was carried out during 40 min at 90 volts (Electrophoresis Power Supply Foto-Force 250, Consort E143) and the gel was visualized under an UVP Biodoc-IT UV Transilluminator imaging system. The expected size of ~ 2.7 kb (2694 bp) was estimated using molecular markers (1 kb Plus DNA Ladder from Invitrogen, France), suggesting the presence of *PS1* gene. The PCR product (~ 2.7 kb) was then cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA), leading to the pPS1-G plasmid (This study). The *E. coli* DH5α was used as a host strain. All recombinant clones of *E. coli* were grown in LB media with the addition of ampicillin (100 µg/ml), isopropyl-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) (0.67 mM), and X-gal (360 µg/ml) for screening. DNA electrophoresis, DNA purification, restriction, ligation, and transformation were all performed according to the method previously described by Sambrook et al. [33].

Protein extraction, Solubilization, and Cleavage

Protein extraction was based on separation in biphasic system [30]. Crystal purity was highlighted after staining with Coomassie Brilliant Blue solution under photonique microscope. Pellet was washed with cold distilled water and resuspended in solubilization buffer [50 mM carbonate buffer at pH 10, 10 mM LD-dithiothreitol (LD-DTT), and 1 mM EDTA] for 1 h at 37 °C with stirring at 140 rpm, and then centrifuged at 15,871×*g* at 4 °C [8, 34]. Supernatant pH was adjusted to pH 8 with HCl (1 N). Solubilized proteins were activated by trypsin (Sigma 1:250, St. Louis, MO, USA) for 30 min, at 14,650×*g* and 37 °C. Proteolysis was stopped by adding 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF).

Protein Purification and Analytical Methods

An additional purification by molecular exclusion chromatography analysis by Sephadex G-100 was carried out using Pharmacia LKB-UVicord SII (100 cm × 2 cm) (ALT, Connecticut, USA), pre-equilibrated with 50 mM carbonate buffer at pH 8. Proteins were separated by isocratic elution at 280 nm and a flow rate of 80 ml/h. Standard curve was made using proteins standards: bovine serum albumin (BSA) (66 kDa), *Rhizopus* protease (41 kDa), trypsin (27 kDa), and β-lactoglobulin (18.36 kDa). Protein concentration was estimated by Bradford's method using BSA as standard [35]. Absorbance was determined at a wavelength of 595 nm using T60 UV–visible spectrophotometer (PG instruments, Lutterworth, England). Determination of molecular weight of proteins was performed by electrophoresis technique according to Laemmli method [36] using a 10% separating gel and 5% stacking gel. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Bands of purified parasporin-1 (*BDzG*) protein were separated on SDS gels and transferred to a ProBlott membrane, and the NH_2-terminal sequence analysis was determined by automated Edman's degradation using Applied Biosystems Protein sequencer ABI Procise 492/610A.

Cytotoxicity Assay

100 µl of cell suspension containing 4×10^4 cells [HEp2 (ATCC® CCL23™), A549 (ATCC® CCL-185™), and Vero (ATCC® CCL-81™) cells purchased from ATCC, France] was seeded on each well of 96-well microtest plate and incubated at 37 °C in humidified 5% atmosphere for 24 h. Protein extract was tested on different cell lines at different concentrations, each one was repeated three times and each essay was repeated at least two times. Cytopathic effect (CPE) was monitored for morphological changes under a phase-contrast microscope (Bresser, Brignoles, France) at 24 h post-inoculation. Cytotoxicity activity was determined by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Absorbance was measured using a microplate reader (SYNERGY™ HT, BioTek® Instruments, Vermont, USA) at 540 nm. Survival rates of cells were calculated [37].

Cell Death Characterization

To assess type of cell death, acridine orange (AO) staining Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) was used to visualize nuclear changes and apoptotic body formation. Cells are viewed under a fluorescence microscope and counted to quantify apoptosis. Cells were seeded on coverslips placed in 6 multiwell plates at 10^5 cells/ml. Each well is filled with DMEM supplemented by 10% SVF. After incubating the cells at 37 °C for 24 h, cytotoxic protein was added at a known concentration. Cells were then stained with 0.12 ml/well of acridine orange (100 µg/ml) according to protocols proposed by Cho et al. [38] and Attari et al. [39]. After incubation for 5 min in dark at room temperature, cells were observed under fluorescence microscope LEICA DM 6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at ×40 magnification.

Author's personal copy

Statistical Analysis

Data were represented as mean values and standard deviations from the means (mean ± SD) of triplicates samples from two independent experiments and are analyzed using Biotek Gen.5 data analysis software program. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA method using Tukey means comparison program ($P \leq 0.05$ was considered a significant difference). Inhibitory concentration causing to 50% cellular death (IC_{50}) values was deduced from the dose–response curves using Origin 2016 program.

Results

Isolation, Phenotypical, and Biochemical Identification

Isolation of 48 strains of *Bacillus* spp. was carried out in different areas of Algerian territory. Global *Bt* index (ratio between colonies with parasporal body to the total number of *Bacillus* spp.) was 0.20. Algerian soil isolates showed a diversity of crystal shapes for ten strains. Microscopy observation showed a clear crystal shape as bipyramidal, geometrical, and spherical crystalline inclusions. The most abundant shape observed was geometrical. Biochemical tests confirmed the general characteristics of *Bt* strains as mentioned elsewhere [40–43]. All strains were negative for L-arabinose, D-xylose, galactose, sorbitol, rhamnose, dulcitol, inositol, lactose, inulin, raffinose, β-galactosidase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, sodium thiosulfate, urea, and indole and positive for ribose, glucose, fructose, maltose, trehalose, starch, arginine dihydrolase, gelatin, citrate, and acetone production. Biochemical biotyping results confirmed belonging of strains to only four different biotypes among the sixteen ones determined by Martin and Travers [31] such as *thuringiensis, sotto, kurstaki*, and *dendrolimus*.

16S rDNA Identification and Parasporin-1 Gene Screening

The phylogenetic analysis was assisted by Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software [44]. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor joining method with the Tamura and Nei distance correction model with 1000 bootstrap replications [45] (see dendrogram (Fig. 1) and verify that the isolated strains belong to the *Bt* group).

Genes coding for PS1 for the ten strains were positive only for strain *BDzG* and their genomic DNA amplified with the corresponding primers gave a band of the expected size (2694 bp), while other strains are negatives (Fig. 2). The *PS1* gene (GenBank accession number: MN637834) was cloned in *E. coli* DH5α and sequenced. It revealed an open reading frame (ORF) of 2169 bp encoding 723 amino-acids (Fig.

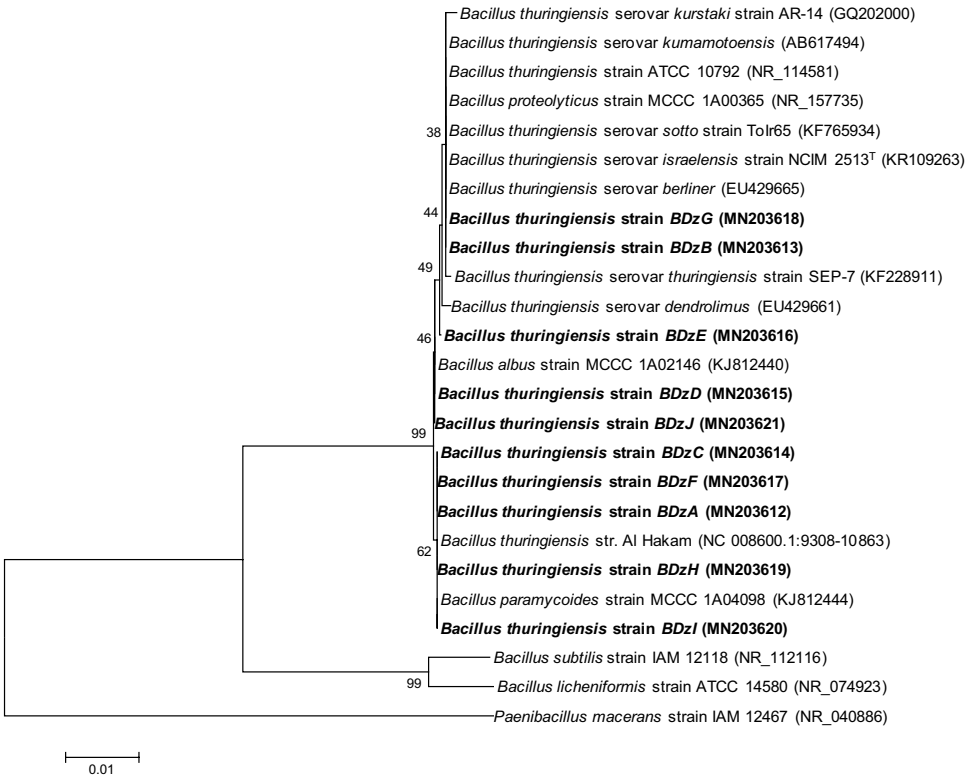


Fig. 1 Evolutionary relationships of *BDzA*, *BDzB*, *BDzC*, *BDzD, BDzE*, *BDzF*, *BDzG*, *BDzH*, *BDzI*, and *BDzJ* and other *Bacillus* species based on the *16S* rDNA gene. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method [45] and are in the units of the number of base substitutions per site. *Paenibacillus macerans* strain IAM 12,467 was included as an out group. Bootstrap values are indicated at the nodes and GenBank accession numbers are given in parentheses

Author's personal copy

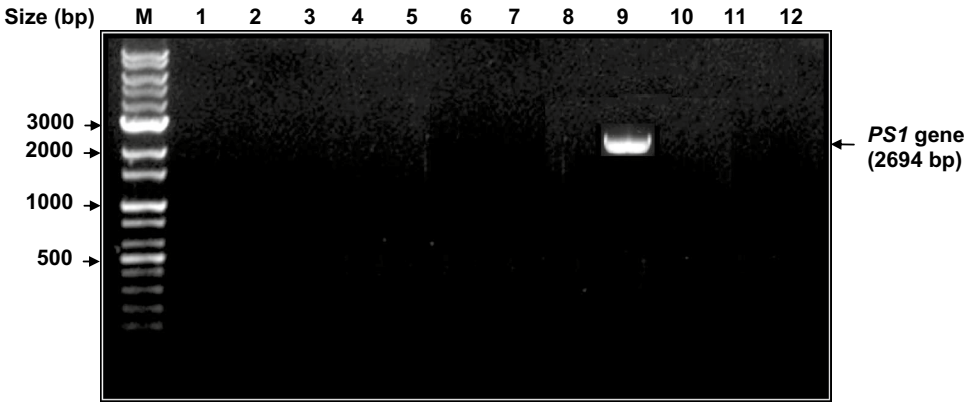


Fig. 2 PCR screening of *PS1* gene (M: Marker 1 kb Plus DNA Ladder from Invitrogen, France), Lane 1: H_2O, Lane 2: Reference strain (*B. thuringiensis* serovar *berliner* 1915), Lane 3: *BDzA*, Lane 4: *BDzB*, Lane 5: *BDzC*, Lane 6: *BDzD*, Lane7: *BDzE*, Lane 8: *BDzF*, Lane 9: *BDzG*, Lane 10: *BDzH*, Lane 11: *BDzI*, and Lane 12: *BDzJ*

S2, Supplementary material). This ORF was checked as the gene encoding PS1 (*BDzG*) protein, as though given by the Edman degradation mechanism, the deduced amino-acid sequence was noted to comprise the 21 NH_2-terminal amino-acid sequence of the purified PS1 proteins. The sequence of parasporin-1 contained the five conserved blocks commonly found in *Bt* Cry proteins [6].

Hemolytic Activity

Among the solubilized proteins that have been tested, only two of them produced by strains *BDzB* and *BDzG* did not show hemolytic activity (Absorbance of 0.2), whereas others exhibited more or less significant β-hemolysis ($0.2 \leq$ Absorbance ≤ 1).

Separation, Purification, Activation, and NH_2-Terminal Sequencing of the Parasporal Inclusion Protein *BDzG*

Separation by biphasic system clearly gave two phases: a spore-rich upper phase trapped by hexane (white) followed by an aqueous cell debris-rich phase and finally crystal-rich pellets. Protein purification by molecular exclusion chromatography revealed an 81 kDa pro-protein of the strain *BDzG* (suggesting PS1-producer strain) as well as separated peptide fractions of different molecular weight (MW) obtained after trypsin activation of this pro-protein. Figure 3 showed that SDS-PAGE analysis confirmed the MW of the purified PS1 protein of ~ 81 kDa and the fractions of activated trypsined proteins (~ 58 and ~ 18 kDa). The sequence determined for the first 21 NH_2-terminal amino-acid residues of *BDzG* protein, namely MGPFSNYSEQKYPESNNDQQI, showed uniformity, indicating that it was isolated in a pure form. This sequence was submitted to comparisons with the existing protein sequences in the GenBank non-redundant protein database and the Swiss-Prot database, using the BLASTP and tBlastn search programs, respectively. As illustrated in Table S1 (Supplementary material), the NH_2-terminal

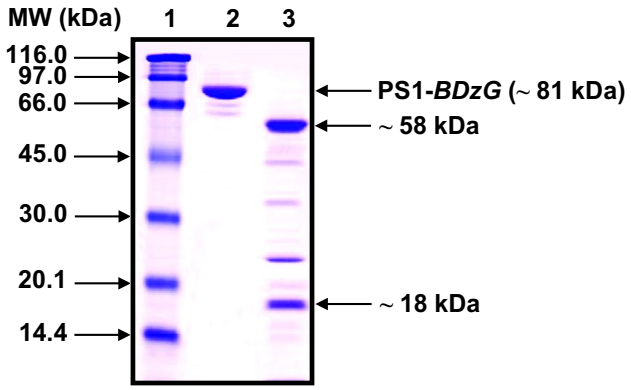


Fig. 3 10% SDS-PAGE analysis of solubilized native and activated parasporal inclusion proteins (50 µg) of *B. thuringiensis* isolate *BDzG*. Lane 1, Amersham LMW protein marker (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany). Lane 2, purified native parasporin-1 (PS1) inclusion protein. Lane 3, trypsin-treated inclusion PS1 protein with major bands at 58 and 18 kDa

sequence of *BDzG* was compared to other closely related PS sequences and noted to share greatest homology with *Bt* PS1, particularly those from *Bt* strain 64-1-94 (83% identity with PS1-*BDzG*). The sequence showed also homology with those reported for other *Bt* PS1, reaching 80.00, 77.78, and 70.00% identity with PS1-Aa1, PS1-Aa6, and Cry31-like 81-kDa protein from *Bt* strains 84-HS-1-11, M019, and B0195, respectively.

Cytotoxic Activity

Each fraction that was obtained after purification by molecular exclusion chromatography was tested against the various cell lines. Protein fractions causing cell death (≥50%) were selected and tested toward cell lines (HEp2, A549, and Vero). The MW of different protein fractions and their IC_{50} has been calculated and represented (Table S2, Supplementary material).

As shown in Figure 4, cell viability rates as a function of the different concentrations of each protein fractions showed

Author's personal copy

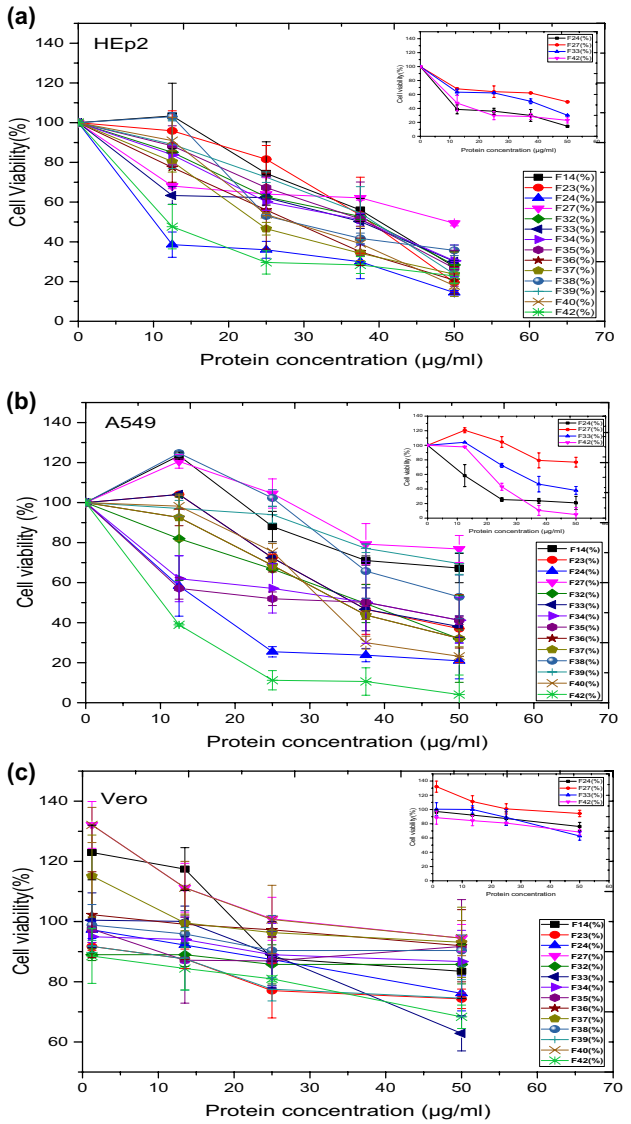


Fig. 4 Dose–response curves of *BDzG* protein fractions cytotoxic activity toward HEp2 (**a**), A549 (**b**), and Vero (**c**) cells. Cytotoxicity level assessed with MTT test at 24 h post-inoculum. Inset graph is dose–response curves of *BDzG* protein fractions with $IC_{50} < 10$ to HEp2 cells

a significant decrease ($P < 0.05$) that is inversely proportional to the protein concentration. In case of HEp2 cells, fraction F24 with MW of about 56.62 kDa has been found to possess the best cytotoxic activity with an IC_{50} of 2.33 µg/ml (Fig. 4a and Table S2, Supplementary material). Cytotoxic activity against A549 cells has not been sufficiently revealed (Fig. 4b). The majority of fractions have a cell viability ≥50%. Protein fractions that gave an IC_{50} less than 10 to HEp2 cells were tested against A549 cells and Vero cells. As shown in inset graph (Fig. 4b), the cytopathic effect of protein fractions was lower than that of HEp2, even at high concentrations. IC_{50} has been found around 19.32 µg/ml for fraction F42, while for fraction F24, it was about 18.54 µg/ml. On the other hand, it can be seen that almost all fractions did not affect normal Vero cells (Fig. 4c). A cell viability of more than 70% (some of which exceed 100%) has been found revealing increased cell proliferation in an environment without growth inhibition. The cythopathic effect of strain *BDzG* (PS1-producer) that was clearly observed in HEp 2 cell line has been compared with that of strain *BDzB* (non-PS-producer). Different morphological changes of HEp2 cells compared to control cells (treated only with solubilization solution) were observed under phase-contrast microscope (Fig. 5). During the first hours of contact of *BDzG* protein with HEp2, the cells became round and ballooned. The large number of observed dead cells increased with contact time (Fig. 5b). HEp2 cells have been affected by the cytopathic effect of both *BDzB* and *BDzG* proteins (Fig. 5a.B and a.C). A moderate cytocidal activity against A549 cells for *BDzG* has been shown, whereas for *BDzB* cell death was more important (Fig. 5a.E and a.F). An important difference in action of the two non-hemolytic strains (*BDzB* and *BDzG*) was noted in Vero cells, where *BDzB* possesses cytocidal activity while *BDzG* has not (Fig. 5a.H and a.I). In Fig. 6 fluorescence microscopy observation showed fragmented nuclei and condensed chromatin in HEp2 cells treated with cytotoxic protein fraction giving an IC_{50} of 2.33 µg/ml. Whereas, nuclei in cells control (not treated with cytotoxic protein fraction) remained in their original form with fluorescent green color.

Discussion

Among the variety of samples taken from various sites differently distributed over geographical areas of Algeria's territory, a total of 48 *Bacillus* spp. strains were isolated. The global *Bt* index was found to be about 0.20. Though it was found to be more important (0.41) in previous works conducted in the same country by Djenane et al. [4], this could be related to the number of analyzed samples. Crystal presence was confirmed for ten isolates only revealing thus a predominance of geometric crystal shape. A biochemical identification revealed similar biochemical characteristics in comparison with reference strains, confirming that they belong to *Bt.* This has been underpinned by several authors [40–43]. The four different biotypes found (*dendrolimus, thuringiensis, kurstaki*, and *sotto)* were unevenly represented; *dendrolimus* was the most present closely followed by *thuringiensis*. This was confirmed by Martin and Travers [31] who classified *dendrolimus* as the most abundant in Africa. However, *thuringiensis* was, for instance, found as the most abundant in Iranian soil [11]. Among the ten *Bt* that were identified by *16S* rDNA, two were found to be non-hemolytic suggesting that they are parasporin-producing.

Author's personal copy

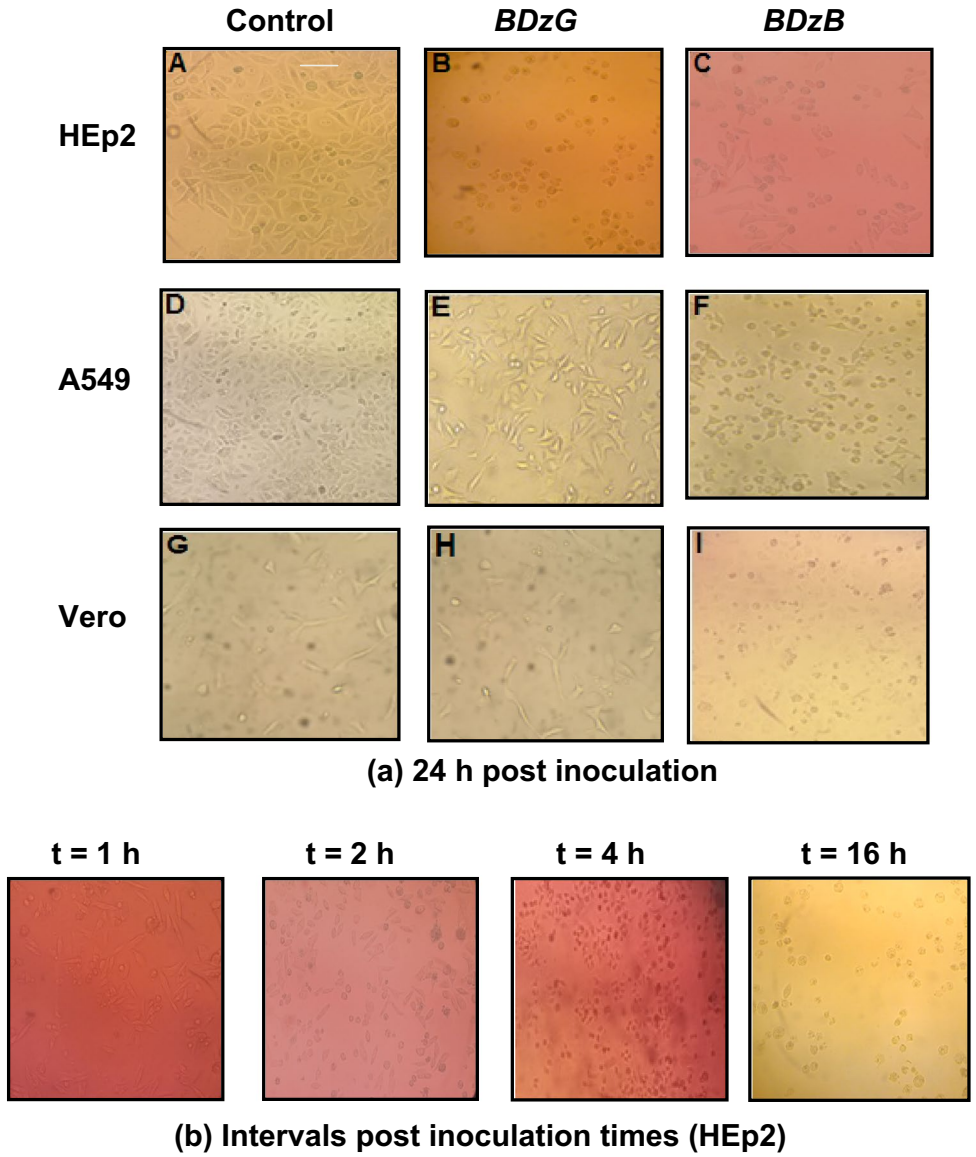


Fig. 5 Phase-contrast microscopic observation of cytopathic effect of activated inclusion protein. 24-h post-inoculation of *BDzG* (B, E, and H) and *BDzB* (C, F, and I) isolates and control "cells treated only with the solubilizing buffer" (A, D and G) (**a**). Different time intervals (1, 2, 4, and 16 h) of *BDzG* on HEp2 cell line (**b**)

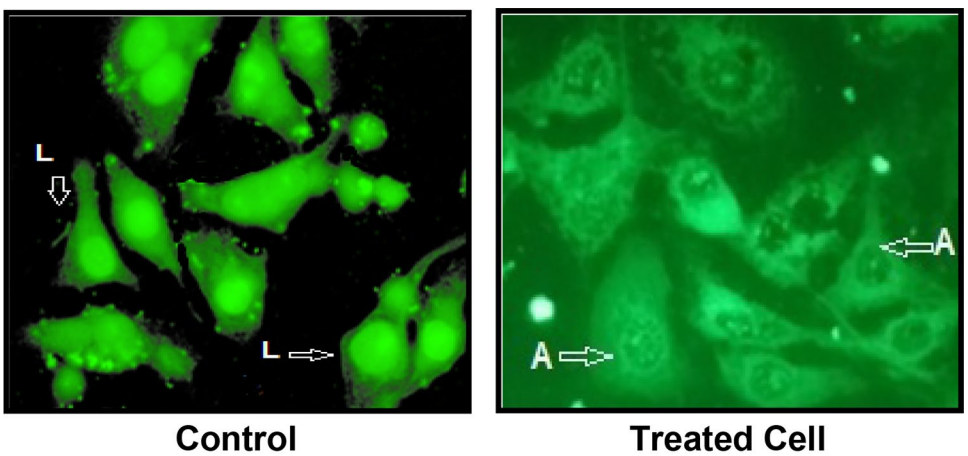


Fig. 6 Morphological changes of HEp2 cells after 24-h *BDzG* protein treatment. Cells stained with acridine orange: living cell **(L)** and apoptotic cells **(A)** (magnification at ×40)

Author's personal copy

Indeed, it was found that no hemolytic activity was observed for the PS1-producing strain [40]. Although the hemolytic parameter is important with respect to the presence or absence of parasporins, this does not exclude the possibility of the presence of PS2, PS3, and PS4 in hemolytic strains as demonstrated by Ichikawa et al. [41] and Nadarajah et al. [34]. The latter even showed that the studied strain (*Bt* 18) PS1-producer also had a low hemolytic activity. MW of *BDzG* strain protein was found to be similar to that of PS1 protein (A1190); polypeptides obtained after activation by trypsin as well as the active form (58 and 18 kDa) would closely resemble to those of PS1Aa1 (56 and 15 kDa) [19]. The slight difference would be probably due to the difference in the trypsin action. The PCR screening of *PS1* gene proved the presence of the *PS1* gene only for the strain *BDzG* at the expected size of 2694 bp, while other strains as well as our reference strains did not show the expected band. Taking this result into consideration, we could suggest that the *BDzG* strain could be a PS1-producer strain, considering the similarity of the molecular weights of its native protein and its active fractions with strain A1190. The cytotoxicity tests of the activated *BDz*G protein showed that F24 fraction, as upper band (MW 56.62 kDa), giving an IC_{50} of 2.33 ± 0.69 µg/ml, exhibited the best cytotoxic activity toward cancer cells particularly HEp2. Nadarajah et al. had demonstrated that the upper band of eluted fractions maintained discriminative cytotoxic activity against CEM-SS cells [34]. This has been also confirmed by several authors [7, 8, 19]. Fraction F42 (MW ~ 27.8 kDa) would be that of trypsin used for protein activation, as confirmed by SDS-PAGE electrophoresis. Cytotoxicity tests against cancerous A549 cells had revealed a weak cytotoxic effect ($IC_{50} > 10$) even on normal Vero cells. These results are in agreement with those found by Katayama et al. [19]. The selective action toward cell lines is probably due to the difference in membrane receptors that are specific to each cell line. This suggests that specific receptors are involved in the toxicity of PS. However, the no-cytotoxic activity of the PS toward normal cells (Vero) could lead us to conclude that they lack them. The result of cytopathic effect had confirmed that the cytocidal mode of action of the parasporin-1 (*BDzG*) is based on membrane receptors while the cytocidal activity of the toxin from *BDzB* is non-specific because it acts on both healthy and cancerous cells. This could suggest that the toxin from *BDzB* has a cytolytic action.

Fluorescence staining has revealed an apoptotic effect of the molecule. AO dye possessing different ability to penetrate cells revealed typical morphology with alteration in the size and shape of cells and appearance of apoptotic bodies easily identifiable. A large number of HEp2 cells in programmed death phase were found, while in control cells, these structures were very rare, nucleus was found with a clear condensation. The elimination of this type of cell by apoptosis is a natural cancer prevention measure. Apoptosis thus makes it possible to get rid of damaged or highly muting cells in order to avoid the emergence of a pathological state (inflammation, cancer) that can threaten tissues or even the entire body. In their study, Katayama et al. [20] suggested that PS1 could cause an increase in Ca^{2+} influxes and would not be a porogenic toxin. The mode of induced cell death would most likely be apoptosis. PS1's selective apoptotic potential on cancerous cells and not on healthy cells confirms that it belongs to a privileged class of anti-cancer cytotoxic protein. Future work should focus on both identification and characterization of the molecule that is potentially responsible for PS1's selective cytotoxic activity. This study also confirmed that similarly as in Japan [19], India [46], Vietnam [10], Canada [15], Iran [11], and Saudi Arabia [18], PS-producer *Bt* was also found in North Africa in particular in Algerian soil. The latter could even be rich in them.

Acknowledgements The authors would like to express their thanks and gratitude to Mr. A. Adjerad for the statistical part assistance. Special thanks are also due to Mr. A.S. Moulla for constructively proofreading and language polishing services. This work is part of a Doctoral Thesis in Environmental Engineering by Mrs Lila Aberkane at the National Polytechnic School of Algiers (ENP, Algeria).

Funding This study was financially supported by Nuclear Research Center of Algiers (CRNA). The funding entity had no contribution in the study design and data collection, analysis, and interpretation as well as the manuscript writing.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval Ethical clearance and approval for the study was obtained from the Ethical Committee in Human Clinical Research [Mustapha PACHA University Hospital Centre of Algiers (CHUMA) and Pasteur Institute of Algiers (IPA), Algeria].

References

1. International Agency for Research on Cancer (CIRC/OMS2018) (2018) Le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018. Communiqué de presse n°263. https://www.iarc.fr/wpcontent/uploads/2018/09/pr263_F.pdf. Accessed 12 Sept 2018
2. Abderrahmani A, Tapi A, Nateche F, Chollet M, Leclère V, Wathelet B, Hacene H, Jacques P (2011) Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes; involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. Appl Microbiol Biotechnol 92(3):571–581. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3453-6
3. Ferdous UT, Shishir MA, Khan SN, Hoq MM (2018) *Bacillus* spp: attractive sources of anti-cancer and anti-proliferative biomolecules. Microb Bioact 1(1):033–045. https://doi.org/10.25163/microbbioacts.11005B0408130818

Author's personal copy

4. Djenane Z, Nateche F, Ameziane M, Gomis-Cebolla J, El-Aichar F, Khorf H, Ferré J (2017) Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. Toxins 9(4):139. https://doi.org/10.3390/toxins9040139
5. Uemori A, Ohgushi A, Yasuteke K, Maeda M, Misuki E, Ohba M (2008) Parasporin-1Ab, a novel *Bacillus thuringiensis* cytotoxin preferentially active on human cells in vitro. Anticancer Res 28:91–96
6. 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. J Appl Microbiol 86(3):477–486. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x
7. Jung YC, Mizuki E, Akao T, Cote JC (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. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03260.x
8. Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clin Diagn Lab Immunol 7(4):624–634. https://doi.org/10.1128/CDLI.7.4.625-634.2000
9. Ohba M, Mizuki E, Uemori A (2009) Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res 29(1):427–433
10. Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, Mizuki E, Yu YM (2006) Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. Can J Microbiol 52(4):365–372. https://doi.org/10.1139/w05-134
11. Moazamian E, Bahador N, Azapira N, Rasouli M (2018) Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against Human colon (HCT-116) and blood (CCRF-CEM) cancer cell lines. Curr Microbiol 75(8):1090–1098. https://doi.org/10.10007/s00284-018-1479-z
12. Ishii T, Ohba M (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* environmental isolates showing larvicidal activity specific for mosquitoes. J Gen Microbiol 139(11):2849–2854. https://doi.org/10.1099/00221287-139-11-2849
13. Abirami P, Poornima K, Suguna P, Saranya V, Selvanayagam P, Shenbagarathai R (2016) Phenotypic characterization of indigenous *Bacillus thuringiensis* strain (BT LDC 501) expressing cancer cell killing protein. J Exp Biol Agric Sci 4(2):232–241
14. Abirami P, Poornima K, Binuramesh C, Suguna P, Saranya V, Selvanayagam P, Shenbagarathai R (2016) Screening and characterization of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain producing parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines. Ann Microbiol 66(3):1167–1178. https://doi.org/10.1007/s13213-016-1204-8
15. Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Coté JC, Sirois M (2015) Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4R2 strain induces caspaces activation and apoptosis in human cancer cells. PLoS ONE 10(8):e0135106. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135106
16. Kim HS, Yamasashita S, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Park YS, Mizuki E, Ohba M (2000) In vitro cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. J Appl Microbiol 89(1):16–23. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01087.x
17. Lenina NK, Naveenkumar A, Sozhavendan AE, Balakrishnan N, Balasubramani V, Udayasuriyan V (2014) Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. 3 Biotech 4(5):545–551. https://doi.org/10.1007/s13205-013-0190-9
18. Aboul-Soud Mourad MAM, Al-Amri MZ, Kumar A, Al-Sheikh YA, Ashour AE, El-Kersh TA (2019) Specific cytotoxic effects of parasporal crystal proteins isolated from native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* strains against cervical cancer cells. Molecules 24:506. https://doi.org/10.3390/molecules24030506
19. Katayama H, Yokota H, Akao T, Nakamura O, Ohba M, Mekada E, Mizuki E (2005) Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to Human cells from non-insecticidal parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*. J Biochem 137:17–25. https://doi.org/10.1093/jb/mvi003
20. 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*, unduces Ca^{2+} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in toxin-sensitive cells. J Biol Chem 282(10):7742–7752. https://doi.org/10.1074/jbc.M611382200
21. Kuroda S, Begum A, Saga M, Hirao A, Mizuki E, Sakai H, Hayakawa T (2013) Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. Curr Microbiol 66(5):475–480. https://doi.org/10.1007/s00284-013-0301-1
22. Wong SYR (2010) *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins and their effect on human cancer cells: on overview. leJSME 4(2):3–9
23. Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, Misuki E, Akao T, Ohba M (2004) A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. J Biol Chem 279(20):21282–21286. https://doi.org/10.1074/jbc.M401881200
24. Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusada Y, Matsuoy Y, Katayama H, Okumura S, Akao T, Mizuki E, Kuge O, Sasaguri Y, Ohba M, Ito A (2006) Cytocidal action of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. J Biol Chem 281:26350–26360. https://doi.org/10.1074/jbc.M602589200
25. Oktay MK, Şahin B, Güneş H (2018) Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains for cytotoxicity against human cancer cell lines. J Environ Biol 39:958–965
26. Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E et al (2005) Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytocidal activity on limited human cancer cells. J Biochem 138(6):663–672. https://doi.org/10.1093/jb/mvi177
27. Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, Mizuki E (2011) Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Biochem Biophys Acta 1808(6):1476–1482. https://doi.org/10.1016/J.bbamem.2010.11.003
28. Ekino K, Okumura S, Ishikawa T, Kitada S, Saitoh H, Akao T, Oka T, Nomura Y, Ohba M, Shin T, Mizuki E (2014) Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 strain. Toxins 6(6):1882–1895. https://doi.org/10.3390/toxins6061882
29. 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. Biosci Biotechnol Mol Biochem 74(3):494–498. https://doi.org/10.1271/bbb.90615
30. Rahbani MJ, Salameh D, Kallassy AM, Chamy L, Brandam C, Lteif R (2014) A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. J Microbiol Methods 107:147–149. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.003
31. Martin PAW, Travers RS (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol 55(10):2437–2442
32. Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Wiley, New York, pp 115–175

Author's personal copy

33. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 23–38
34. Nadarajah VD, TingD Chan KK, Mohamed SM, Kanakeswary K, Lee HL (2008) Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. South East Asian J Trop Med Public Health 39(2):235–245. https://doi.org/10.3390/molecules24030506
35. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72(1,2):248–254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999
36. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0
37. Barnabe M (2017) Cell viability assays: MTT assay application and protocol. https://blog.quartzy.com/2017/05/01/cell-viability-assays-mtt-protocol. Accessed 1 May 2017
38. Cho KS, Lee EH, Choi JS, Joo CK (1999) Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. IOVS 40(5):911–919
39. Attari F, Sepehri H, Delph L, Goliei B (2009) Apoptotic and necrotic effects of pectic acid on rat pituitary GH3/B6 tumor cells. Iran Biomed J 13(4):163–170
40. Ichikawa M, Uemori A, Ogushi A, Yasutake K (2007) Phenotypic and morphometric characterization of *Bacillus thuringiensis* parasporin-1 producers: a comparison with insecticidal cry protein producers. J Fac Agric Kyushu Univ 52(2):307–313
41. Ichikawa M, Uemori A, Yasutake K, Kagoshima K, Mizukin E, Ohba M (2008) Failure to phenotypically discriminate between non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strains with anticancer parasporins (PS2, PS3, and PS4) and *Bacillus thuringiensis* strains that produce insecticidal cry proteins. Appl Entomol Zool 43(3):421–426. https://doi.org/10.1303/aez.2008.421
42. Logan NA, Carman JA, Melling J, Berkeley RCW (1985) Identification of *Bacillus anthracis* by API tests. J Med Microbiol 20(1):75–85. https://doi.org/10.1099/00222615-20-1-75
43. Logan NA, Berkeley RCW (1984) Identification of *Bacillus* strains using API system. J Gen Microbiol 130(7):1871–1882
44. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30(12):2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
45. Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 10(3):512–526. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
46. Chubicka T, Girija D, Deepa K, Salini D, Meera N, Raghavamenon AC, Divya MK, Babu TDA (2018) Parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. J Biosci 43(2):407–416. https://doi.org/10.1007/s12038-018-9759-0

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.