



**HAL**  
open science

## Vecteur recombinant pour la production et la sécrétion de séquences d'acides aminés d'intérêt par les bactéries propioniques et ses applications.

Gwénaél Jan, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel, Hélène Falentin

### ► To cite this version:

Gwénaél Jan, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel, Hélène Falentin. Vecteur recombinant pour la production et la sécrétion de séquences d'acides aminés d'intérêt par les bactéries propioniques et ses applications.. France, N° de brevet: FR 2960001 (A1), WO 2011141558 (A1). 2010, 35 p. hal-01454437

**HAL Id: hal-01454437**

**<https://hal.science/hal-01454437>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

2 960 001

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

10 53750

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/74 (2006.01), C 12 N 1/20, C 12 P 21/02,  
A 61 K 35/74, 31/711, 47/42, A 61 P 37/08, 37/06, 31/00, 3/04,  
9/12, 35/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12.05.10.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 18.11.11 Bulletin 11/46.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : UNIVERSITE DE RENNES 1 — FR,  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) — FR et INSTI-  
TUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : JAN GWENael, DIMANCHE-BOI-  
TREL MARIE-THERESE et FALENTIN HELENE.

⑦3 Titulaire(s) : UNIVERSITE DE RENNES 1, INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM), INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET REGIMBEAU.

⑤4 VECTEUR RECOMBINANT POUR LA PRODUCTION ET LA SECRETION DE SEQUENCES D'ACIDES AMINES  
D'INTERET PAR LES BACTERIES PROPIONIQUES ET SES APPLICATIONS.

⑤7 La présente invention concerne un vecteur recombi-  
nant pour l'expression et la sécrétion, par une bactérie pro-  
pionique, d'une ou plusieurs séquences d'acides aminés  
d'intérêt, ledit vecteur comprenant au moins :

- sous le contrôle d'au moins un promoteur approprié,
- au moins une séquence nucléotidique codant un pep-  
tide signal de bactérie propionique et, en fusion traduction-  
nelle avec celle-ci,
- une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant la  
ou lesdites séquences d'acides aminés d'intérêt.

L'invention s'intéresse également aux utilisations d'un  
tel vecteur dans le domaine pharmaceutique ou pour la pro-  
duction à grande échelle de peptides ou protéines d'intérêt.

FR 2 960 001 - A1



**VECTEUR RECOMBINANT POUR LA PRODUCTION ET LA SECRETION DE**  
**SEQUENCES D'ACIDES AMINES D'INTERET PAR LES BACTERIES**  
**PROPIONIQUES ET SES APPLICATIONS**

5

La présente invention se rapporte au domaine du génie génétique notamment applicable dans l'industrie pharmaceutique, chimique, agro-alimentaire, cosmétique, etc.

10 Plus précisément, la présente invention concerne un vecteur recombinant pour l'expression et la sécrétion, par une bactérie propionique, d'une ou plusieurs séquences d'acides aminés d'intérêt, ledit vecteur comprenant au moins :

- sous le contrôle d'au moins un promoteur approprié,
- au moins une séquence nucléotidique codant un peptide signal de bactérie propionique et, en fusion traductionnelle avec celle-ci,
- 15 - une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant la ou lesdites séquences d'acides aminés d'intérêt.

L'invention s'intéresse également aux utilisations d'un tel vecteur dans le domaine pharmaceutique ou pour la production à grande échelle de peptides ou protéines dont l'activité présente un intérêt dans des industries aussi diverses  
20 que la pharmacie, la chimie, l'agro-alimentaire, la cosmétique, etc.

Il existe à ce jour un grand nombre de méthodes et moyens pour la production à grande échelle de peptides et/ou protéines. A la synthèse chimique à façon traditionnelle, guère adaptée à la production à grande échelle de protéines pouvant compter plusieurs dizaines d'acides aminés, on préfère  
25 généralement la synthèse *in vivo*, c'est-à-dire dans des systèmes biologiques vivants. De nombreuses sociétés commerciales en ont d'ailleurs fait leur activité principale, en France et ailleurs, et proposent ainsi d'utiliser des technologies basées sur le génie génétique et la biotechnologie, pour fournir des quantités industrielles de peptides et/ou protéines, de préférence actifs et purifiés. En  
30 fonction des besoins, il est actuellement possible de recourir à divers systèmes vivants tels que des bactéries (e.g., *Escherichia coli*), des levures (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), des cellules d'insectes (baculovirus, Sf9, Sf21, etc.), des cellules de plantes, des cellules de mammifères (e.g., CHO, HEK, COS, etc.).

Pour autant, il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de système vivant « parfait », c'est-à-dire un système qui soit d'application universelle (notamment quelles que soient la protéine à exprimer et la quantité à produire), à la fois simple à mettre en œuvre, performant, fiable et d'un coût abordable.

5 La présente invention vise précisément à pallier ces lacunes en proposant pour la première fois d'utiliser des bactéries propioniques en tant que systèmes vivants pour la production et la sécrétion de peptides et protéines recombinants.

10 Les bactéries propioniques (BP) et, plus particulièrement, les bactéries propioniques laitières (BPL) (notamment *Propionibacterium freudenreichii*) possèdent un métabolisme particulier qui repose sur la conversion anaérobie de sucres ou d'acide lactique en acides gras à chaînes courtes (ou AGCC), tels que le propionate, l'acétate et le butyrate. Ces bactéries sont utilisées principalement comme levain d'affinage des fromages à pâte pressée cuite. Jusqu'à présent,  
15 peu d'équipes scientifiques ou de laboratoires de recherche-développement se sont intéressés à ces bactéries. On leur connaît quelques applications probiotiques (formulation Propiofidus<sup>®</sup> commercialisée par les Laboratoires Standa, France). Elles sont en effet capables de moduler l'écosystème complexe du côlon en termes de flore microbienne (Bougle et al., 1999) et d'activités  
20 enzymatiques (Zarate et al., 2000).

En particulier, les Inventeurs ont récemment cloné et séquencé le génome de la bactérie probiotique anaérobie firmicute *Propionibacterium freudenreichii* (données des Inventeurs non publiées). Cette bactérie possède  
25 notamment des propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses coliques. Entre autres propriétés notables, elle adhère aux colonocytes et n'a pas d'effet toxique sur les cellules saines.

Bien qu'étant de croissance assez lente, les BP présentent l'avantage considérable d'être naturellement capables de sécréter les peptides et protéines dans le milieu extracellulaire, facilitant ainsi leur récupération sans dénaturation  
30 et sans détérioration des cellules productrices que l'on peut donc ainsi avantageusement recycler. Ce sont des bactéries très robustes, qui s'adaptent à des milieux particuliers (tels que des milieux à base de lait ou dérivés du lait (e.g., le lactosérum), des milieux contenant de la mélasse, éventuellement hostiles à la croissance et au développement d'autres systèmes vivants

(présence d'acide lactique, de sel, etc. dans le milieu) et présentent une bonne tolérance vis-à-vis des variations, changements ou perturbations des conditions environnementales susceptibles de survenir au cours d'une culture à grande échelle. On pourrait de plus les qualifier d' « anti-fongiques naturels » parce  
5 qu'elles produisent naturellement des métabolites (par exemple, du propionate) qui inhibent le développement de champignons contaminants. Elles sont en outre capables de produire des protéines recombinantes de taille significative (par exemple, des protéines de plus de 500 acides aminés) et peuvent même produire simultanément plusieurs protéines différentes (par exemple, plus d'une  
10 dizaine de protéines différentes).

Les BP sont donc tout à fait appropriées pour servir d' « usines » vivantes pour la production à grande échelle de peptides et protéines recombinants d'intérêt, notamment dans le cadre de procédés ou d'applications *in vitro* ou *ex vivo*.

15 Mais leur utilité ne s'arrête pas là. En effet, chez les mammifères, y compris l'homme, ces bactéries sont naturellement capables de cibler l'intestin où leur temps de survie peut atteindre 2 semaines environ alors que celui des bactéries lactiques notamment, qui sont pourtant des hôtes naturels de cet écosystème, n'est que de 2 ou 3 jours en moyenne. Ainsi, les BP peuvent  
20 également servir d'outil d'adressage ou de ciblage spécifique *in vivo*, pour la délivrance colique de peptides et/ou protéines d'intérêt, notamment d'intérêt thérapeutique.

Ainsi, un objet de la présente invention concerne un vecteur recombinant pour l'expression et la sécrétion, par une bactérie propionique, d'une ou plusieurs  
25 séquences d'acides aminés d'intérêt, comprenant au moins :

- sous le contrôle d'au moins un promoteur approprié,
- au moins une séquence nucléotidique codant un peptide signal de bactérie propionique et, en fusion traductionnelle avec celle-ci,
- une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant la ou lesdites séquences  
30 d'acides aminés d'intérêt.

Dans le cadre de l'invention, les termes « vecteur », « vecteur plasmidique » et « plasmide » sont équivalents et sont utilisés conformément à l'acception usuelle dans le domaine de la biologie moléculaire, du génie génétique et de la microbiologie. Très brièvement, il s'agit d'une molécule d'ADN,

non virale, hébergée par une cellule hôte, distincte de l'ADN chromosomique naturel de ladite cellule hôte et capable de réplication autonome. Le choix du vecteur et, plus particulièrement, de l'origine de réplication qu'il porte dépend donc de la cellule hôte qui l'hébergera. En fonction du type de cellules hôtes, 5 plusieurs copies d'un vecteur et/ou plusieurs vecteurs différents peuvent être hébergés simultanément. Un vecteur selon l'invention peut éventuellement être porté par (ou « intégré sur » ou « inséré dans ») le chromosome de la cellule hôte.

Un « vecteur recombinant » est un plasmide obtenu par des techniques 10 classiques de biologie moléculaire et génie génétique, et dans lequel une ou plusieurs séquences nucléotidiques exogènes ont été insérées (ou clonées). Pour simplifier, on parlera dans ce qui suit de « vecteur », étant entendu que ledit vecteur est recombinant.

Ici, une « cellule hôte » est une BP, de préférence une BPL, de 15 préférence encore une BPL choisie parmi les espèces *Propionibacterium freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* et *P. acidipropionici*. De manière encore préférée, une cellule hôte conforme à l'invention est *P. freudenreichii*, plus particulièrement *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ou *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Une cellule hôte préférée entre toutes est *P. freudenreichii* 20 subsp. *shermanii*.

Au sens de la présente invention, une « séquence d'acides aminés » est choisie parmi les peptides et les protéines, leurs fragments, analogues et dérivés, ainsi que leurs combinaisons. Une « séquence d'acides aminés » peut donc être, en fonction de sa taille, un peptide ou une protéine. On parle 25 typiquement de « peptide » pour une séquence comptant jusqu'à 50 acides aminés environ, et de « protéine » ou « polypeptide » pour une séquence de plus de 50 acides aminés environ.

Un « fragment » de peptide ou de protéine est un peptide ou une protéine de plus petite taille, dont la séquence en acides aminés est incluse dans celle du 30 peptide ou de la protéine initial(e). Un « fragment » d'une protéine pourra par exemple être un peptide.

On entend par « analogue », n'importe quelle version modifiée d'un composé initial, ici une protéine ou un peptide, ladite version modifiée pouvant être naturelle ou synthétique, et dans laquelle un ou plusieurs atomes, tels que

des atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, ou des hétéroatomes tels que l'azote, le soufre ou un halogène, ont été ajoutés ou supprimés de la structure du composé initial, de manière à obtenir un nouveau composé moléculaire.

Un « dérivé » au sens de l'invention est n'importe quel composé qui  
5 présente une ressemblance ou un motif structural en commun avec un composé de référence (ici, une protéine ou un peptide). Entrent également dans cette définition, d'une part les composés qui, seuls ou avec d'autres composés, peuvent être des précurseurs ou des produits intermédiaires dans la synthèse  
10 d'un composé de référence, moyennant une ou plusieurs réactions chimiques, et d'autre part les composés qui peuvent être formés à partir dudit composé de référence, seul ou avec d'autres composés, via une ou plusieurs réactions chimiques. Sont ainsi couverts par le terme « dérivé », au moins les hydrolysats, notamment trypsiques, de protéines et/ou peptides, les fractions d'hydrolysats, ainsi que les mélanges d'hydrolysats et/ou de fractions d'hydrolysats. Sont  
15 également couverts par cette définition, les peptidomimétiques ou les pseudo-peptides, qui sont des petites molécules qui miment les propriétés bioactives d'un peptide de référence (Patch et al., 2002).

De plus, les termes « analogue » et « dérivé » d'un peptide ou d'une protéine couvrent par exemple un peptide ou une protéine glycosylé(e) ou  
20 phosphorylé(e) ou encore ayant subi n'importe quel greffage de groupement chimique.

Pour simplifier, on parlera dans ce qui suit de « protéine » au sens large, ce terme générique couvrant les peptides et les protéines, leurs fragments, analogues et dérivés, ainsi que leurs combinaisons.

25 Une « séquence nucléotidique » ou un « acide nucléique » selon l'invention est conforme à l'acception usuelle dans le domaine de la biologie. Ces deux expressions couvrent indifféremment les ADN et les ARN, les premiers pouvant être par exemple génomiques, plasmidiques, recombinants, complémentaires (ADNc), et les seconds, messagers (ARNm), ribosomiaux  
30 (ARNr), de transfert (ARNt). De manière préférée, les séquences nucléotidiques et acides nucléiques de l'invention sont des ADN.

Par commodité, on parlera d' « un » vecteur, d' « une » protéine, d' « une » séquence de nucléotides ou d'acides aminés, etc., étant entendu

« un/une » ou « le/la » couvrent également la mise en œuvre de plusieurs vecteurs, protéines, séquences, etc.

Le vecteur recombinant objet de la présente invention permet d'« exprimer » une protéine. Il porte en effet une séquence nucléotidique qui est  
5 transcrite puis traduite dans la cellule hôte, pour donner la protéine en question. Il s'agit donc d'un vecteur d'« expression » ou de « production » ou encore de « synthèse » de ladite protéine.

Le vecteur recombinant objet de la présente invention permet en outre de « sécréter » une protéine. Ainsi, la protéine qui est exprimée à partir dudit  
10 vecteur est transportée vers l'extérieur de la cellule hôte. Les termes « sécrétion », « transport vers l'extérieur de la cellule hôte », « export », « externalisation » sont ici équivalents et signifient que la protéine est exprimée puis est exposée au milieu extracellulaire. Sous réserve de cette exposition, elle peut éventuellement rester ancrée à la membrane de la cellule hôte. Cependant,  
15 de préférence, la protéine exprimée par la cellule hôte est « libérée » (ou « délivrée » ou « relarguée ») dans le milieu extracellulaire.

Le « milieu extracellulaire » est, comme son nom l'indique, le milieu environnant dans lequel se trouve la BP. Il est ici entendu que les expressions « milieu extracellulaire », « milieu extérieur », « milieu externe », « milieu  
20 environnant » et « environnement » sont synonymes. Pour simplifier, on pourra parler dans ce qui suit de « milieu ». Dans des modes de réalisation de la présente invention, la BP est cultivée *in vitro* ou *ex vivo* (utilisation de la BP comme « usine » de production de protéines d'intérêt). Dans ce cas, le milieu extracellulaire est le milieu de culture. Ce peut également être le surnageant de  
25 culture après séparation de la biomasse (par exemple, après centrifugation et séparation des culots cellulaires). Dans d'autres modes de réalisation, la BP hébergeant le vecteur recombinant est administrée à un mammifère, en particulier à l'homme, pour une expression et une délivrance *in situ* de la protéine (utilisation de la BP hébergeant ledit vecteur comme outil de ciblage spécifique  
30 pour une délivrance colique de ladite protéine). Dans ce cas, le milieu extracellulaire est l'écosystème du mammifère, plus particulièrement son intestin, plus particulièrement encore son côlon.

Le vecteur recombinant selon la présente invention comprend au moins un promoteur approprié pour l'expression d'une protéine chez une BP. Un



« promoteur approprié » peut être constitutif et/ou inductible ; il est de préférence inductible. On utilisera de préférence un promoteur d'origine propionique tel que le promoteur de la protéine PF963 de *P. freudenreichii*, mis en oeuvre par les Inventeurs dans les exemples ci-dessous. On utilisera de manière encore  
5 préférée des promoteurs propioniques forts. Il pourra être avantageux d'utiliser un promoteur assurant une expression constitutive « de base » qui pourra être renforcée par une expression induite dans des conditions particulières (par exemple, des conditions de stress digestif). Par exemple, la protéine BCCP, naturellement très fortement exprimée par *P. freudenreichii* en conditions  
10 standard, l'est encore plus en présence de bile ou sels biliaires (Hervé et al., 2007). Le promoteur de la protéine BCCP est donc un promoteur approprié au sens de l'invention. Avantageusement, le vecteur selon l'invention pourra contenir au moins deux promoteurs appropriés tels que définis ci-avant, voire plus, qui seront situés de préférence à la chaîne (mais pas nécessairement  
15 accolés les uns aux autres), afin d'augmenter le niveau d'expression de la protéine (effet « booster d'expression »). Par exemple, on pourra utiliser à la fois les promoteurs des protéines PF963 et BCCP.

Le vecteur recombinant selon la présente invention comprend au moins une séquence nucléotidique codant un peptide signal de BP pour la sécrétion  
20 d'une protéine d'intérêt. De préférence, on utilise un peptide signal d'une BP choisie parmi les BPL et les BP dites « cutanées » (ou BPC). Entre autres exemples, on peut citer les BPL suivantes : *Propionibacterium freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* et *P. acidipropionici*. On peut également citer les BPC suivantes : *P. acnes*, *P. granulosum*, *P. avidum* et *P. propionicum*. De manière  
25 encore préférée, on utilisera un peptide signal d'une BP choisie parmi les espèces suivantes : *Propionibacterium freudenreichii*, plus particulièrement les sous-espèces *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* et *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, et *Propionibacterium acnes*, ladite BP étant préférentiellement *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Plus préférentiellement, on choisira une  
30 séquence nucléotidique codant un peptide signal parmi les séquences suivantes :

- les séquences SEQ ID n° 1 à 18 (voir Tableau I infra) ;
- leurs séquences complémentaires ;

- les séquences similaires à au moins 80% à celles-ci ou à leurs séquences complémentaires ; et
- les séquences hybridables en conditions strictes à au moins 80% avec celles-ci ou avec leurs séquences complémentaires.

5 On trouvera dans le tableau I suivant, les séquences nucléotidiques (« en nts ») susmentionnées, ainsi que les séquences d'acides aminés (« AA ») correspondantes, identifiées suite au séquençage par les Inventeurs du génome de *P. freudenreichii*.

10

Tableau I

Protéine identifiée	Peptide signal putatif	Séquence en nts SEQ ID n°	Séquence d'AA SEQ ID n°
PF#1058	MSKTLRSRIASVASVAALAGSITVIAGQNASA-DS Atgtcaaagacactctctcggatcgcatccgtcgctcggttg Ccgcgctcgccgagcatcaccgcatcgccggcagaa cggtccgacagc	1	19
PF#1328	MKNGLKTLIGGVGIATLAVGGVGTIAI-DN GtgaagAACGGTCTCAAGACCCTGCTCATTGGGAGTCGG CctcgacccctgCGGTGGCGGCTCGGAATGCCATCG CAGACAAT	2	20
PF#1347	MRSTTTKAFAGVAVLALALAGCGSNSGSSTKSA-DS Atgcgatccaccacgacgaaggcgttgcgggtgctgctgctggcgt GgcgcttctggctgCGGCTCGAATCGGGCTGCTCACCAGTCGGCGC ACAGC	3	21
PF#146	MLTRKRVAAGAAATLSLTAFLAGLPASA-AT AtgctcactcgcaagagagtggtgacgCGGAGCTGCCGCC AccctgtccctcagcgcttgcCGGTCAGCCCGCAGCG CGCCACC	4	22
PF#1885	MGFRVGRRPLIGAVLAGSMATLVGCSTSGSGSGA-SS Atgggattcagggttgccgctgctcccctcctcggggcagttctcggggtc Gatggcaactcgtgggctgtccacctcgggtagcggcagtgaggcctc CAGC	5	23
PF#190	MQALQGRRRSRRVMAAAVAALTAMTVLPSQLNAVA-AP Atgcaggccctccaaggaaggcggctcagcaggggatggcggcgc GgtagcagccctcaccgatgaccgtgctccctccagctcaacgCGGTG CTGACCC	6	24
PF#2074	MSTGRMKFIKLAVPVIVACCLTPMAALA-DV Atgtccactggccgcatgaagtcatcaagctggcagttcctg tcatcgttgctgctgctgacgccaatggctgccttagctgatgtg	7	25
PF#241	MAMRARHGVVRLGLVCLTALAVFGTANVSGQVAVMA-EG Atggcgatgagggacgctcagggcgtcctcggctggtctgctcaccgc attggcggtctcggcagcgaatgctcgggtcaggttgcgggtgatggctgagggc	8	26
PF#2732	MNQUALSTMRLKIGDSTKRIRIFFVMAVAITLLA-GR Tgaaccaggccctgctcagatgctcctgaagatcggcgactccacc Aagcgcatcggatctctcgtctgatggcctggcgatcaccctgctc GCGGGACGG	9	27
PF#279	MRRRTTIAALAAVLSFSPLAAQA-AP Atgcgagctgcaccacgattgcagccctcgtg Cgtcttgagttcagtcctcggccgcccaggccg CACCC	10	28
PF#2818	MPSHAVRETRANKLRRFLRPTVAQGVLGIAFCLVAAVGVVQI-RS AtgcctagtcatcggtcgggagacgCGGGCGAAAGTTGCGCGGTCCTCGGGCC	11	29

	Accggtgcccaggggcgtgctcggtatcgcttctgctctggtggccgccgctggcggtgca gatccgctcc		
PF#2932	MSRIQLPRLSRIAIAAASAALIGTSFIAPATAFA-AP Atgtcacggattcaactccccggctgagccggattgcatcgagc Agcagctccgctgcccctgatggcaccagctcatgccccggcca cggccttgccgcgccc	12	30
PF#3042	MKRRTLLGLGIMGLSVPLAACS-SK Ctagccgaccttctggccttctgctggcaggctgctc ggggatcgtgacccccatcaggaggcggccttctcatt	13	31
PF#3412	MVTGGNDMPKRITWPGISALSALIAGMLLAPLVAA-DG Ttagtggtgggacgaggaggagtgaggttcgatgacgtcgagggtgggtgc Ggtggcggggcgggtgatggttcggtgcccgtgctcctggcggtccagggtg atggccagggt	14	32
PF#3427	MAMVMASLAMFGASRASA-AD Tcagccagttggtgcccgccttggcgtcgg cggcgtgggatacacgcggaactggggccc	15	33
PF#527	MFISRFRRAAAVGLAAVTALSATACSGSSSSSSSSSA-SS Atgttcattcgcctcctcgtcgtgcccgtgcccctggccgc Cgtcacccgattgtccgccactgcctgtagcggttcctcgtcgtcgtc cagctcatcgcgagctcg	16	34
PF#876	MKSATRRPLTRWIVAFVVLVLIAGSVGLHASG-AL Atgaagtccgcgacgcgaccccctgacgcgctgattgtgcctcctg Ggggtggtggtgctggtcatgcccgggtcgggtgggctgcatgctccg gtgccctg	17	35
PF#963	MNPFVKARVAITSTLVAGSLATASLVFAPLAQA-DY Gtgaatccctcgtcaagacggcgcgctggctatcacctcgacgc Tgggtggcaggctcgtcgcactgccagcctcgtgttgaccact gcacaggccgattac	18	36

Encore plus préférentiellement, on choisira une séquence nucléotidique codant un peptide signal parmi les séquences suivantes :

- la séquence SEQ ID n° 18 codant le peptide signal de la protéine PF963 de *P. freudenreichii* (Tableau I ci-dessus) ;
- 5 - sa séquence complémentaire de celle-ci ;
- les séquences similaires à au moins 80% à celle-ci ou à la séquence complémentaire de celle-ci ; et
- les séquences hybridables en conditions strictes à au moins 80% avec celle-ci
- 10 ou avec la séquence complémentaire de celle-ci.

Par « séquence nucléotidique complémentaire » d'une séquence nucléotidique de référence, on entend désigner n'importe quel ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la séquence de référence, et dont l'orientation est inversée (la séquence complémentaire est donc une séquence antiparallèle). Deux séquences nucléotidiques « complémentaires » sont donc

15 telles que chaque base de l'une est appariée avec la base complémentaire de l'autre, l'orientation des deux séquences étant inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U dans le cas des ARN), et C et G.

Par « séquence nucléotidique similaire » ou « séquence nucléotidique homologue » à une séquence nucléotidique de référence, on entend ici désigner une séquence nucléotidique présentant un pourcentage d'identité avec la séquence nucléotidique de référence d'au moins 80 % environ, de préférence  
5 d'au moins 85% environ, de préférence encore d'au moins 90 % environ, de manière encore préférée d'au moins 95 % environ, de manière encore davantage préférée d'au moins 98% environ, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences nucléotidiques pouvant être réparties au hasard et sur toute leur longueur. Des séquences similaires peuvent ainsi  
10 inclure des variations liées à des mutations par rapport à la séquence de référence, lesdites mutations correspondant notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au moins un nucléotide. Les séquences similaires peuvent également inclure des variations liées à la dégénérescence du code génétique.

15 En particulier, les séquences « similaires à au moins X% environ » à une séquence nucléotidique de référence, codant un peptide signal de BP, désignent des variants de cette séquence, lesdits variants ayant, sur toute leur longueur, au moins X% environ de bases identiques à celles de la séquence de référence. Les bases identiques peuvent être consécutives, en tout ou en partie seulement. Les  
20 variants ainsi envisagés peuvent être de même longueur que la séquence nucléotidique de référence, ou d'une longueur différente, dès lors qu'elle agit comme peptide signal chez une BP. En effet, il est connu de l'homme du métier que les produits d'expression de séquences nucléotidiques présentant un certain niveau de similitude (au moins X% environ) peuvent néanmoins, compte tenu de  
25 la dégénérescence du code génétique d'une part, et de l'utilisation préférentielle de certains codons en fonction des organismes hôtes (bactéries, levures...) d'autre part, remplir une même fonction. Ces produits d'expression peuvent eux-mêmes être identiques ou similaires. Ici, ces produits d'expression sont des peptides signaux fonctionnels chez les BP.

30 La définition ci-dessus peut être élargie à des séquences en acides aminés, ou séquences peptidiques/protéiques, similaires à au moins X% environ à une séquence en acides aminés de référence. L'on considère en ce cas des variants protéiques ayant, sur toute leur longueur, au moins X% environ d'acides

aminés similaires à ceux de la séquence de référence. Là encore, les acides aminés similaires peuvent être consécutifs, en tout ou en partie seulement. Les variants peptidiques/protéiques peuvent être de même longueur ou de longueur différente, étant entendu que, de préférence, la fonction biologique de la séquence en acides aminés de référence est conservée.

L'on entend ici par « acides aminés similaires », des acides aminés possédant la même réactivité au niveau de leur chaîne latérale. Ainsi, une polarité et des propriétés d'ionisation comparables ont permis de définir des groupes d'acides aminés similaires, connus de l'homme du métier. Par exemple, il est d'usage de classer au sein d'un même groupe, les acides aminés aliphatiques que sont la glycine, l'alanine, la valine, la leucine et l'isoleucine. De même, sont similaires les acides aminés dicarboxyliques, acide aspartique et acide glutamique. Egalement, la sérine et la thréonine appartiennent à un même groupe en ce qu'elles portent toutes deux un groupement alcool estérifiable. On peut encore citer la lysine, l'arginine et l'histidine comme étant des acides aminés basiques similaires, etc.

Dans toutes les définitions ci-dessus, « X » vaut 80. En particulier, « X » vaut 85, de préférence 90, de manière encore préférée 95 et de manière encore plus préférée 98.

On entend par « séquence hybridable en conditions strictes » avec une séquence nucléotidique de référence, une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions de température et de force ionique appropriées pour maintenir l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. Les « conditions strictes d'hybridation » obéissent à la définition classique connue de l'homme du métier (Sambrook et Russel, 2001). Des « conditions strictes d'hybridation » sont, par exemple, des conditions permettant l'hybridation spécifique de deux séquences nucléotidiques simple brin, et ce, après au moins une étape de lavage telle que décrite ci-dessous. L'étape d'hybridation peut notamment être réalisée à environ 65°C, pendant 12h dans une solution comprenant du SSC 6X, du SDS 0,5%, une solution de Denhardt 5X et 100 µg d'ADN non spécifique (par exemple de l'ADN de sperme de saumon), ou dans une quelconque autre solution de force ionique équivalente. L'étape suivante, comprenant au moins un lavage, est par exemple effectuée à environ 65°C, dans une solution comprenant du SSC à au plus 0,2X et du SDS à au plus 0,1%, ou

dans une quelconque autre solution de force ionique équivalente. Les paramètres définissant les conditions d'hybridation dépendent de la température  $T_m$  à laquelle 50% des brins appariés se séparent. S'agissant des séquences de plus de 30 bases, la température  $T_m$  est calculée suivant la formule :  $T_m = 81,5 + 0,41 \times [\% \text{ G+C}] + 16,6 \times \text{Log}(\text{concentration en cations}) - 0,63 \times [\% \text{ formamide}] - (600/\text{nombre de bases})$ . Pour les séquences de moins de 30 bases, la température  $T_m$  est définie par la relation suivante :  $T_m = 4 \times (\text{nombre de G+C}) + 2 \times (\text{nombre de A+T})$ . Les conditions d'hybridation peuvent donc être adaptées par l'homme du métier selon la taille des séquences mises en jeu, leur teneur en GC, et d'autres paramètres, comme indiqué notamment dans les protocoles décrits dans Sambrook et Russel (2001).

De préférence, on choisira un peptide signal parmi :

- les séquences SEQ ID n° 19 à 36 (Tableau I supra) et 45 à 57 (voir Tableau II infra) ;
- les séquences similaires à au moins 80% à celles-ci ; et
- leurs analogues et dérivés.

De préférence encore, ledit peptide signal sera choisi parmi :

- la séquence SEQ ID n° 36 correspondant au peptide signal de la protéine PF963 de *P. freudenreichii* (Tableau I ci-dessus) ;
- les séquences similaires à au moins 80% à celle-ci ; et
- ses analogues et dérivés.

On trouvera dans le tableau II suivant, les séquences d'acides aminés susmentionnées, identifiées par les Inventeurs à partir de la séquence génomique de *P. acnes*, accessible à partir des bases de données (souche *P. acnes* KPA171202 ; n° d'accès : NCBI : NC\_006085 ; GenBank : AEO17283).

Tableau II

N° d'accès de la séquence protéique	Séquence putative du peptide signal	SEQ ID N°	Fonction associée	Protéine homologue chez <i>P. freudenreichii</i>
PPA2239	MSKVVASAIA GALSLTSAGG LTMVQA	45		PF1328
PPA1840	mrkaivtpva vlavlvmlt gcgqknqsgg	46		PF1347
PPA1786	mastprrrwa wvlllvvasl vivgvyrka	47		PF1885
PPA2198	mssmkglslv latsfmlsfs pgssfa	48		PF2074
PPA0721	mehrygasqv sgsaprrrg vafaaitgai llgtvasvdp gaqa	49		PF241
PPA2198	mssmkglslv latsfmlsfs pgssfas	50		PF3412
PPA0257	mphsdqptsk rvmsaprrm pgwvpvtvgi avvvivvvav ivslrs	51		PF876
AAA51650	mfgtprsrft ltasalsama laasptvtda ia	52	hyaluronidase	
CAA67627	mkinarfavm aasvavlmaa apiaqa	53	triacylglycérol lipase	
AAT83976	mypvhlplrn esefsfrahn hggtvpsrft rrsvlatgav alpmtaaca	54	lipoprotéine	
AAT83859	mrhmrlial slaglmtlsa cgedvaa	55	protéine de liaison à un peptide	
AAT83771	mnrtlkvaav gaiailclaa csdpgsdsaq s	56	protéine sécrétée de liaison à un sucre	
AAT83059	mekssfaaan mtimsepttp tsqa	57	protéase sécrétée	

Un vecteur recombinant particulièrement préféré est obtenu par insertion de la ou des séquences nucléotidiques codant la ou les protéines d'intérêt dans le vecteur pFB4 (contenu dans la souche recombinante *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France) le 15 avril 2010 et enregistrée sous le n° I-4297).

Dans le vecteur recombinant selon l'invention, le peptide signal de BP est « fusionné traductionnellement » à la ou aux protéines d'intérêt, condition indispensable pour que celle(s)-ci puisse(nt) être sécrétée(s) par la cellule hôte.

On observera qu'un peptide signal pourra être fusionné traductionnellement avec plusieurs séquences d'acides aminés à la chaîne, permettant par exemple d'exprimer et sécréter une protéine chimère.

Alternativement ou additionnellement, un même vecteur pourra éventuellement porter plusieurs fusions traductionnelles peptide signal / protéine d'intérêt, sous le contrôle d'un ou plusieurs promoteurs. Le ou les promoteurs en question pourront contrôler la transcription d'une seule ou de plusieurs de ces fusions traductionnelles.

De préférence, la ou les séquences d'acides aminés d'intérêt (ou protéines d'intérêt) qui seront exprimées à partir du vecteur recombinant selon la présente invention possèdent une activité biologique d'intérêt.

Les termes et expressions « activité », « fonction », « activité biologique », « fonction biologique », « bioactivité », « activité (biologique) d'intérêt » et « fonction (biologique) d'intérêt » sont équivalents et répondent à l'acception usuelle dans le domaine technique de l'invention. En particulier, la protéine qui sera exprimée à partir du vecteur selon la présente invention est « fonctionnelle » ou « active » ou « bioactive », c'est-à-dire qu'elle est apte à remplir sa fonction biologique naturelle, laquelle est indépendante (d'un point de vue qualitatif et/ou quantitatif) de modifications post-traductionnelles non réalisables par une BP.

N'importe quelle protéine dont l'activité biologique présente un intérêt pour l'industrie, est ainsi concernée par l'objet de l'invention, pour autant que ladite activité ne dépende pas de modifications post-traductionnelles non réalisables par une BP. L'utilité principale de l'invention est de permettre de produire une protéine d'intérêt. Une autre utilité de l'invention est de permettre de recycler des déchets organiques ou des produits secondaires résiduels de l'industrie. Ainsi, par exemple, le lactosérum et la mélasse qui sont produits en tant que résidus non exploités par une industrie, pourraient être recyclés comme substrats pour la culture de BP recombinantes capables de synthétiser des protéines d'intérêt.

Avantageusement, la protéine d'intérêt, c'est-à-dire celle qui est exprimée et sécrétée à partir du vecteur selon l'invention, possède une activité d'intérêt médical telle qu'une activité pro-apoptotique, anti-inflammatoire, immunomodulatrice ou de médiation chimique. La protéine d'intérêt est notamment choisie parmi les cytokines, chimiokines, hormones peptidiques, neurotransmetteurs, peptides agissant dans les processus d'inflammation, sur la satiété, sur la tension artérielle, etc.



Dans un mode de réalisation préféré, le vecteur recombinant selon la présente invention permet d'exprimer et sécréter la protéine pro-apoptotique TRAIL (pour « TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand », également appelé TNSF10, TL2, CD253 et Apo-2L), une cytokine de la famille du TNF. En particulier, la séquence d'acides aminés d'intérêt est celle du domaine extracellulaire C-terminal actif de TRAIL, de préférence la séquence allant des acides aminés 114 à 281 de TRAIL (n° d'accès de la séquence de TRAIL dans GenBank : U37518 ; Uniparc : UPI0000001629).

D'après la littérature, TRAIL est un agent anticancéreux à fort potentiel car il induit la mort de nombreuses cellules tumorales, indépendamment de p53 et de la Pgp180 (ou MDR, Multi Drug Resistance). TRAIL inhibe aussi la croissance de tumeurs coliques xénotransplantées chez la souris nude (Ashkenazi et al., 1999). De manière très intéressante, TRAIL a peu d'effet cytotoxique sur la plupart des tissus normaux (Ashkenazi et al., 1999), dont l'épithélium colique humain (Sträter et al., 2002).

D'autres équipes ont très récemment exprimé le domaine extracellulaire C-terminal actif de TRAIL chez des bactéries telles que *Salmonella typhimurium* (Ganai et al., 2009), *Bifidobacterium longum* (Hu et al., 2009) et *E. coli* (Zhang et al., 2010). Dans ces travaux, les salmonelles, les bifidobactéries et les colibacilles sont proposés comme vecteurs de délivrance systémique de TRAIL dans des modèles de cancers.

Or, les BP présentent des avantages majeurs par rapport à d'autres bactéries telles que les salmonelles, les bifidobactéries et les colibacilles.

D'abord, les BPL permettent une délivrance locale car elles ciblent les cellules épithéliales coliques et ont un métabolisme fermentaire actif dans le côlon de l'homme (Herve et al, 2007), ce qui permet une délivrance site-spécifique de TRAIL.

Ensuite, les BPL ont, par elles-mêmes, des propriétés pro-apoptotiques. On a récemment démontré *in vitro* que les BPL, par les AGCC issus de leur métabolisme fermentaire, induisent l'apoptose de deux lignées cellulaires d'adénocarcinome colique humain (Caco2 et HT29) (Jan et al., 2002). Cet effet est directement lié à la libération de propionate par ces bactéries et à leur action sur les mitochondries des cellules cancéreuses. On a également montré qu'à pH extracellulaire (pH<sub>e</sub>) établi entre 6 et 7.5, les AGCC (propionate et acétate)

induisent une mort apoptotique alors qu'à  $pH_e = 5.5$ , ils induisent une mort  
nécrotique dans les cellules cancéreuses coliques humaines HT29 (Lan et al.,  
Apoptosis, 2007). *In vivo*, ces bactéries de qualité alimentaire (GRAS) s'adaptent  
et survivent dans le tractus digestif de l'animal et de l'homme avec une efficacité  
5 qui, bien que souche-dépendante, dépasse celle d'autres probiotiques (Herve et  
al., 2007). De plus, elles expriment dans l'intestin des activités enzymatiques  
caractéristiques de leur métabolisme fermentaire en produisant une  
augmentation des concentrations en AGCC (Lan et al., Br. J. Nutr., 2007) et  
induisent une augmentation de l'apoptose dans la muqueuse colique de rats  
10 traités à la 1,2-diméthylhydrazine (Lan et al., 2008). Les Inventeurs ont en outre  
pu démontrer une action synergique avec TRAIL *in vitro* comme l'illustrent les  
Exemples ci-dessous.

Un vecteur recombinant particulièrement préféré est le vecteur  
pFB4:TRAIL, dans lequel la séquence d'acides aminés d'intérêt est la séquence  
15 allant des acides aminés 114 à 281 du domaine extracellulaire C-terminal de  
TRAIL. Ce vecteur est hébergé par la souche-type CIP103027 de *P.*  
*freudenreichii* subsp. *shermanii*, déposée le 13 août 2009 sous le numéro I-4213  
auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM,  
Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France).

20 Un autre objet de la présente invention concerne une bactérie  
propionique recombinante comprenant au moins un vecteur recombinant tel que  
défini précédemment.

Avantageusement, le vecteur recombinant sera porté par le chromosome  
de la bactérie selon l'invention. On pourra par exemple intégrer le vecteur dans le  
25 chromosome de la cellule-hôte par recombinaison homologue.

Une bactérie particulièrement préférée est la souche-type CIP103027 de  
*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, déposée auprès de la CNCM le 13 août 2009  
sous le numéro I-4213.

30 Si la protéine à sécréter se prête à un tel usage (par exemple un peptide  
coupe-faim), la bactérie selon l'invention pourra être utilisée comme aliment ou  
complément alimentaire de type probiotique pour les mammifères, en particulier  
l'homme. Avantageusement, la bactérie sera intégrée dans l'alimentation du  
mammifère sous la forme d'un produit laitier fermenté (e.g., lait fermenté,  
lactosérum fermenté, fromage).

La présente invention vise également un vecteur recombinant ou une bactérie propionique recombinante tel(le) que défini(e) ci-dessus, pour son utilisation comme médicament.

Un autre objet de la présente invention se rapporte à un médicament (ou  
5 une composition pharmaceutique) comprenant une quantité efficace d'au moins :  
- un vecteur selon l'invention ; et/ou  
- une bactérie selon l'invention,  
et au moins un support (ou véhicule) pharmaceutiquement acceptable.

Dans ce médicament, le vecteur et/ou la bactérie servent  
10 avantageusement d'agent(s) thérapeutique(s). Un médicament selon l'invention  
peut être fabriqué de manière conventionnelle. Un médicament conforme à  
l'invention peut en outre comprendre un ou plusieurs excipients ou adjuvants  
acceptables d'un point de vue pharmaceutique tels que des diluants, adjuvants,  
agents anti-mousse, stabilisants, dispersants, colorants, conservateurs, etc. On  
15 pourra utiliser des excipients ou adjuvants inertes de sorte que, dans les  
médicaments objets de l'invention, les seuls agents thérapeutiques seront le  
vecteur et/ou la bactérie. Néanmoins, le médicament objet de la présente  
invention pourra comprendre un ou plusieurs autres agents actifs du point de vue  
thérapeutique ou prophylactique, en sus du vecteur et/ou de la bactérie.  
20 Avantageusement, l'association de plusieurs agents thérapeutiques, dont au  
moins le vecteur et/ou la bactérie, aura une action thérapeutique ou  
prophylactique meilleure que lorsque le vecteur et/ou la bactérie sont les seuls  
agents thérapeutiques présents dans le médicament. Cette action meilleure  
pourra être, *inter alia* :

- 25
- un meilleur effet dose ;
  - un effet thérapeutique ou prophylactique plus stable ou plus durable dans le temps ;
  - une meilleure administrabilité du médicament ;
  - une synergie d'action entre au moins deux agents thérapeutiques
- 30 présents dans le médicament.

De préférence, un médicament conforme à la présente invention est destiné à prévenir et/ou traiter au moins une maladie choisie parmi les allergies, l'hypertension (e.g., la protéine d'intérêt a une activité hypotensive), l'obésité (e.g., la protéine d'intérêt a une activité coupe-faim), les cancers colorectaux

(e.g., la protéine d'intérêt a une activité pro-apoptotique) et les maladies coliques inflammatoires, notamment la maladie de Crohn (la protéine d'intérêt est alors avantageusement une cytokine anti-inflammatoire, par exemple IL-10), etc. Alternativement, un médicament de l'invention est destiné à prévenir au moins  
5 une infection microbienne, par exemple une infection virale, bactérienne, fongique, parasitaire... Dans ce cas, la protéine d'intérêt sera par exemple un antigène ou un épitope. Ainsi, ledit médicament sera avantageusement un vaccin, auquel cas le support pharmaceutiquement acceptable pourra être un adjuvant d'immunité.

10 Les différents moyens de la présente invention (vecteur, bactérie, médicament) tels que décrits ci-dessus sont de préférence administrés à un mammifère, pour une sécrétion de la ou des protéines d'intérêt dans l'intestin grêle et/ou le côlon, de préférence le côlon, de ce dernier.

Le terme « mammifère » doit être compris dans son sens habituel. Des  
15 exemples de mammifères sont les bovins ; porcins ; caprins ; ovins ; équins ; les rongeurs tels que souris, rats, hamsters ; les félins ; les canins ; y compris les animaux domestiques tels que les chats, chiens. Un mammifère préféré au sens de l'invention est l'homme.

Les moyens de l'invention (vecteur, bactérie, médicament) peuvent être  
20 administrés par n'importe quelle voie conventionnelle appropriée, notamment choisie parmi les voies orale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse et intra-trachéale. On préférera une administration par voie orale, le médicament se présentant alors sous la forme de comprimés, gélules (e.g., à base de gélatine, gastro-protectrices), capsules, poudres à usage direct ou poudres à diluer (e.g.,  
25 lyophilisats), sirops, gels, etc. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois espacées d'un certain intervalle de temps. La voie d'administration et le dosage appropriés peuvent varier en fonction de divers paramètres, tels que le sujet à traiter et/ou la protéine d'intérêt.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement thérapeutique  
30 ou prophylactique, dans laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur et/ou d'une bactérie et/ou d'un médicament selon l'invention à un sujet ayant besoin d'un tel traitement.

Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'un vecteur et/ou d'une bactérie conforme(s) à la description précédente, pour produire et

sécréter, de préférence dans le milieu extracellulaire, une ou plusieurs protéines d'intérêt.

La présente invention vise en outre un procédé de production et sécrétion dans le milieu extracellulaire, par une bactérie selon l'invention, d'au moins une

5 séquence d'acides aminés d'intérêt, ledit procédé comprenant au moins :

- la culture de ladite bactérie dans des conditions appropriées ;

- la récupération du milieu de culture contenant ladite séquence d'acides aminés d'intérêt (puisque celle-ci est sécrétée dans le milieu de culture par la bactérie) ;

et

10 - facultativement, la purification de ladite séquence d'acides aminés d'intérêt.

De préférence, le procédé selon l'invention permet de produire et sécréter des protéines à grande échelle, c'est-à-dire à l'échelle industrielle (les dispositifs de mise en œuvre étant alors des usines de production de protéines).

Les « conditions appropriées » (en termes de composition du milieu de culture, température, temps, aération, agitation, etc.) pour la culture des BP sont

15 connues de l'homme du métier (voir notamment les documents US 2009/312,425 au nom de Meiji Dairies Corp. et CN 101045910 au nom de Nanjing University of Technology). Encore une fois, ce sont des bactéries robustes, capables de croître sur des substrats particuliers tels que le lactosérum ou la mélasse et de

20 s'adapter à des conditions de culture non-standard, inapplicables à bon nombre d'autres bactéries.

La purification des protéines fait appel aux connaissances générales de l'homme du métier et peut être réalisée sans aucune difficulté à l'aide de techniques classiques.

25 L'invention s'étend également à des produits pharmaceutiques contenant au moins une BP, de préférence non recombinante, et au moins une protéine d'intérêt comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en prophylaxie ou thérapie chez les mammifères.

Les produits pharmaceutiques selon l'invention peuvent comprendre la

30 protéine en tant que telle, ou une séquence nucléotidique codant cette protéine, ladite séquence nucléotidique étant éventuellement portée par un vecteur d'expression approprié.

Par exemple, des produits pharmaceutiques conformes à la présente invention sont destinés à prévenir et/ou traiter au moins une maladie choisie

parmi les allergies, l'hypertension (e.g., la protéine d'intérêt a une activité hypotensive), l'obésité (e.g., la protéine d'intérêt a une activité coupe-faim), les cancers colorectaux (e.g., la protéine d'intérêt a une activité pro-apoptotique) et les maladies coliques inflammatoires, notamment la maladie de Crohn (la protéine d'intérêt est alors avantageusement une cytokine anti-inflammatoire, par exemple IL-10), etc. Alternativement, ils peuvent être destinés à prévenir au moins une infection microbienne, par exemple une infection virale, bactérienne, fongique, parasitaire... Dans ce cas, la protéine d'intérêt sera par exemple un antigène ou un épitope.

10           Avantageusement, pour une thérapie anticancéreuse, en particulier pour le traitement des cancers colorectaux, les produits pharmaceutiques selon la présente invention comprennent de préférence :

- au moins une BP non recombinante telle que *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, et
- 15           - au moins la protéine TRAIL ou la séquence allant des acides aminés 114 à 281 du domaine extracellulaire C-terminal de TRAIL.

Dans ces produits pharmaceutiques, la BP pourra être administrée sous la forme d'un probiotique qui sera ajouté dans l'alimentation du mammifère et qui servira, par exemple, d'adjuvant d'une chimiothérapie à base de TRAIL.

20           Alternativement, toujours pour une thérapie anticancéreuse, en particulier pour le traitement des cancers colorectaux, les produits pharmaceutiques selon la présente invention comprennent :

- un surnageant de culture d'une BP non recombinante telle que *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, ledit surnageant ayant éventuellement subi un ou plusieurs traitements conventionnels appropriés pour en améliorer l'innocuité et/ou la conservation et/ou les propriétés physico-chimiques etc., et
- 25           - au moins la protéine TRAIL ou la séquence allant des acides aminés 114 à 281 du domaine extracellulaire C-terminal de TRAIL.

30           Comme l'illustrent les Exemples ci-dessous, les Inventeurs ont en effet pu montrer une synergie d'action pro-apoptotique sur des cellules cancéreuses coliques HT29, entre d'une part les BP et/ou leurs surnageants de culture (contenant des AGCC, en particulier le propionate et/ou l'acétate) et d'autre part TRAIL.

Alternativement encore et toujours pour une thérapie anticancéreuse, en particulier pour le traitement des cancers colorectaux, les produits pharmaceutiques selon la présente invention comprennent :

- 5 - un ou plusieurs AGCC, notamment du propionate et/ou de l'acétate, avantageusement obtenus à partir du surnageant de culture d'une ou plusieurs BP non recombinantes telles que *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, et
- 10 - au moins la protéine TRAIL ou la séquence allant des acides aminés 114 à 281 du domaine extracellulaire C-terminal de TRAIL.

La présente invention est illustrée par les figures suivantes :

- Figure 1 : Représentation graphique illustrant la synergie observée *in vitro* entre TRAIL et les métabolites de *P. freudenreichii*. Les cellules cancéreuses coliques HT29 ont été traitées par des doses sub-létales de TRAIL (25, 50 et 100 ng/ml). Des doses variées d'AGCC (propionate/acétate, Fig. 1A) ou de surnageant de *P. freudenreichii* (Fig. 1B) ont été utilisées en co-traitement. La viabilité des cellules HT29 a été déterminée après 24 heures de traitement.

20 - Figure 2 : Identification de la protéine sécrétée majoritaire chez *P. freudenreichii*, PF963. A : suivi de la croissance de deux souches de *P. freudenreichii*, l'une autolytique ( $\square$ ) et l'autre non-lytique ( $\circ$ ). B et C : analyse électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines sécrétées par une souche de *P. freudenreichii* lytique (B) et non-lytique (C). La protéine PF963 a été identifiée par spectrométrie de masse.

25 - Figure 3 : Schéma détaillant la stratégie de clonage pour obtenir le plasmide pFB4:TRAIL (déposé à la CNCM le 13/08/2009 sous le numéro I-4213). A : la région promotrice et le peptide signal de la protéine PF963 de *P. freudenreichii* ont été amplifiés par PCR avec introduction (mutagenèse par PCR) des sites de restriction *Nde1* et *Hind3*. La partie extracellulaire active de TRAIL (résidus 114 à 30 281) a été amplifiée par PCR avec introduction des sites de restriction *Hind3* et *Pst1*. B et C : les deux produits de PCR ont été purifiés et liés afin d'obtenir le produit de ligature PS-TRAIL. D : le plasmide pK705 a été ouvert par digestion à l'aide des deux enzymes *Nde1* et *Pst1*. Le produit de ligature PS-TRAIL a été

introduit dans le plasmide ouvert. Le nouveau plasmide pFB4 comporte un promoteur et un peptide signal permettant la sécrétion d'une protéine hétérologue chez *P. freudenreichii*. Les flèches et les ciseaux représentent respectivement les amorces de PCR et les sites de restriction.

- 5 - Figure 4 : Carte du plasmide pFB4:TRAIL (déposé à la CNCM le 13/08/2009 sous le numéro I-4213).
- Figure 5 : Séquence de la protéine de fusion codée par le plasmide pFB4:TRAIL. Dans cette séquence, la région soulignée correspond à la séquence signal de la protéine PF963 et la région en gras à la séquence du
- 10 domaine extracellulaire de TRAIL (résidus 114 à 281).
- Figure 6 : Détection par Western Blot de la protéine de fusion codée par le plasmide pFB4:TRAIL. Les échantillons déposés étaient des surnageants de cultures de *P. freudenreichii* CIP103027 sauvage (1) ou portant le plasmide pFB4:TRAIL (2 & 3). Comme contrôle positif, une solution de TRAIL SuperKiller
- 15 (Alexis Biochemicals, Coger, France) a été déposée (4). Le Western Blot a été révélé à l'aide d'un anticorps commercial "PAb to TRAIL" (Alexis Biochemicals).

Les Exemples non-limitatifs suivants, qui font référence aux figures ci-dessus, illustrent des modes de réalisation et avantages de la présente invention.

20

## EXEMPLES

### **I- Induction de la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose par *Propionibacterium freudenreichii*.**

- 25 Au cours d'études préliminaires, les Inventeurs ont montré que certaines souches sélectionnées de *P. freudenreichii* survivent aux stress subis lors du transit intestinal chez l'homme (Herve et al., 2007), ainsi que chez le rat (Lan et al., 2007, Br. J. Nutr.), expriment les gènes codant pour les enzymes du métabolisme fermentaire et produisent des acides gras à courte chaîne
- 30 (AGCC), propionate et acétate, *in situ* dans le côlon (Lan et al., 2007, Br. J. Nutr.)

Par ailleurs, cette bactérie induit *in vitro* l'apoptose de cellules d'adénocarcinomes coliques humains, via ces AGCC qui agissent sur les



mitochondries des cellules cancéreuses (Jan et al., 2002). La voie mitochondriale d'induction de l'apoptose a clairement été identifiée dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée des cellules HT29 par les bactéries propioniques laitières (Jan et al., 2002 ; Lan et al., 2007, Apoptosis).

5 Ces AGCC provoquent l'ouverture du pore mitochondrial PTP (pour « Permeability Transition Pore »), la dépolarisation des mitochondries, la fuite de protéines mitochondriales pro-apoptotiques et l'activation des caspases effectrices.

Une telle induction d'apoptose a ensuite été recherchée *in vivo* dans un

10 modèle de rat à flore digestive humaine. Ces rats ont été traités, ou non, par le carcinogène diméthylhydrazine (DMH) dans le but de provoquer l'apparition de colonocytes endommagés, susceptibles d'évoluer vers un cancer colique. Ces rats ont reçu par gavage, ou non, la bactérie *P. freudenreichii*. L'apoptose et la prolifération des colonocytes ont été quantifiées par analyse anatomo-

15 pathologiques de coupes histologiques de côlon. L'administration de *P. freudenreichii* n'a pas eu d'effet sur ces paramètres chez les rats sains. En revanche, une augmentation significative de l'apoptose a été observée chez les rats traités par la DMH (Lan et al., 2008). Il apparaît donc qu'une apoptose spécifique des cellules cancéreuses peut être induite par les bactéries

20 propioniques laitières.

## **II- Induction de la voie extrinsèque de l'apoptose par TRAIL *via* les récepteurs de mort, synergie avec *Propionibacterium freudenreichii*.**

Le ligand TRAIL est une cytokine capable d'induire l'apoptose de cellules

25 cancéreuses coliques humaines en se fixant sur les récepteurs de mort. TRAIL induit donc une voie apoptotique différente aux niveaux cellulaire et moléculaire et potentialise l'action d'autres molécules pro-apoptotiques utilisées en chimiothérapie du cancer (Lacour et al., 2001 ; Lacour et al., 2003 ; Meurette et al., 2005 ; Meurette et al., 2006). La mort cellulaire induite

30 par TRAIL ou par les AGCC est favorisée par un environnement acide (Meurette et al., 2007 ; Lan et al., 2007, Apoptosis).

Par des tests de viabilité (Fig. 1), ainsi que par des méthodes *in vitro* de quantification d'apoptose (marquage au Hoechst et activité des caspases – données non montrées), les Inventeurs ont montré un effet pro-apoptotique synergique de la cytokine TRAIL en association avec le mélange  
5 propionate/acétate ou le surnageant de culture de propionibactéries dans les cellules cancéreuses coliques humaines HT29 (Fig. 1). Plus précisément, la viabilité illustrée à la Figure 1 a été déterminée à l'aide du test de cytotoxicité suivant. Les cellules cancéreuses coliques humaines HT29 (ATCC, Biovalley) ont été cultivées en plaques 96 puits (30000 cellules/puits) pendant 24  
10 heures. Puis, elles ont été traitées par TRAIL (0, 25, 50 et 100 ng/ml) (TRAIL super killer, Alexis Biochemicals, Coger, France) en présence de concentrations croissantes de propionate/acétate (7,5/3,5; 15/7,5; 30/15; 60/30 mmol) ou de surnageant bactérien (bactéries *P. freudenreichii*) (1/6, 1/4, 1/2, pur). A la fin du traitement (24 heures), le milieu a été éliminé et les  
15 cellules adhérentes ont été lavées trois fois par du PBS 1X (100 µL/puits) et fixées à l'éthanol 99 % (100 µL/puits) pendant 30 minutes. Après avoir éliminé l'éthanol, les cellules fixées ont été séchées à l'air puis colorées pendant 30 minutes avec du bleu de méthylène (dilué dans du tampon borate 1X). Après  
20 trois lavages dans l'eau et séchage (environ 30 minutes), 100 µL d'acide chlorhydrique HCL (0.1N) ont été ajoutés dans les puits puis les plaques ont été analysées au spectrophotomètre à longueur d'onde de 620 nm (iEMS Reader MF; Lab-systems, Helsinki, Finlande).

La Figure 1 montre que des doses sub-létales de TRAIL (25, 50 et 100 ng/ml) n'induisent pas significativement la mort des cellules pendant la durée du  
25 traitement. De plus, les doses les plus faibles d'AGCC induisent, seules, peu ou pas de mort cellulaire, mais induisent une mort massive en présence de TRAIL (Fig. 1A et B). Ces résultats démontrent une synergie d'action pro-apoptotique sur des cellules cancéreuses coliques humaines, entre les métabolites AGCC produits par les BP et TRAIL.

30

**III- Mise au point d'une bactérie propionique recombinante dans le but d'induire les deux voies apoptotiques, intrinsèque et extrinsèque.**

### 3-1- Résumé

Les Inventeurs ont cherché à faire produire à une bactérie, inoffensive pour les cellules saines, des inducteurs des deux voies apoptotiques. Ces inducteurs sont les AGCC produits par *P. freudenreichii* pour la voie intrinsèque et TRAIL pour la voie extrinsèque. Les bactéries propioniques présentant un tropisme positif pour la muqueuse colique, cette bactérie recombinate sera non seulement susceptible de produire TRAIL *in situ* dans le côlon, mais également de vectoriser AGCC et TRAIL vers les cellules épithéliales coliques.

10 Dans ce but, une bactérie propionique recombinate exprimant TRAIL fusionné à un peptide signal de sécrétion a été développée pour une production *in situ* dans des modèles expérimentaux de cancer colique.

Brièvement, la protéine majeure, sécrétée par *P. freudenreichii* pendant sa croissance, et en absence de lyse, baptisée PF963, a été identifiée. La procédure expérimentale (e.g., électrophorèse, trypsinolyse, nano-LC et MS/MS) qui a conduit à l'identification de PF963 est similaire à celle qui avait précédemment permis aux Inventeurs d'identifier GAPDH (Tarze et al., 2007). Très brièvement, le surnageant de la souche non-lytique de *P. freudenreichii* a été analysé par électrophorèse. Le fragment de gel contenant la protéine majeure sécrétée a été prélevé, rincé puis soumis à une protéolyse trypsique « in gel ». Les peptides résultants ont été séparés par nano-LC puis analysés en spectrométrie de masse en tandem MS/MS.

PF963 est une enzyme sécrétée *via* la machinerie de la voie « sec » qui reconnaît et clive un peptide signal (PS). Par génie génétique, ce PS a été fusionné à la partie C-terminale, extracellulaire et active, de TRAIL. Cette construction a été réalisée dans *E. coli* sur un plasmide de clonage. La fusion ainsi obtenue a été introduite dans un vecteur d'expression pK705 précédemment mis au point pour le clonage et l'expression de gènes chez les bactéries propioniques laitières et efficace chez *P. freudenreichii* (Kiatpapan et al., 2000) afin d'exprimer la protéine de fusion. Son expression et son adressage extracellulaire ont ensuite été analysés par western-blot.

D'après la Figure 2A, le suivi de la croissance de *P. freudenreichii* montre que certaines souches se lysent (□) et d'autres pas (○). Dans ce dernier cas, la protéine PF963 est sécrétée dans le milieu (Fig. 2C) sans fuite des protéines cytoplasmique comme dans le cas de la lyse bactérienne spontanée (Fig. 2B).

5 La partie amont du gène PF963, comportant le promoteur et le peptide signal, a été amplifiée par PCR et fusionnée avec la partie C-terminale de TRAIL (Fig. 3A à 3C). L'étape suivante a consisté en son introduction dans un plasmide d'expression de *P. freudenreichii* (Fig. 3D).

10 *3-2- Description de l'obtention de la souche Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii CIP103027 (TL34) portant le plasmide pFB4 :TRAIL*

3-2-1 – Identification de la protéine PF963 sécrétée par *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*.

15 Afin d'identifier une protéine sécrétée, un criblage de souches a été réalisé sur la base de l'aptitude à l'autolyse. En effet, il est connu que certaines souches de cette bactérie mettent en œuvre un suicide cellulaire programmé, l'autolyse. Dans ce cas, les protéines cytoplasmiques sont libérées dans le milieu environnant. En revanche, d'autres souches, dont la souche CIP103027, ne subissent pas d'autolyse et mettent au contraire en œuvre une réaction de

20 tolérance vis-à-vis de divers stress, nommée « starvation-induced multi-tolerance response ». Ces souches, non-lytiques, ne libèrent donc *a priori* que des protéines activement sécrétées et non pas libérées accidentellement. La Figure 2A montre l'évolution de la population bactérienne pour une souche autolytique

25 (□) et pour une souche non-lytique (○) de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. La figure 2C montre l'analyse électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines sécrétées par une souche non-lytique, CIP103027. Cette analyse révèle quelques protéines sécrétées, dont la protéine PF963, identifiée dans le surnageant de culture de toutes les souches non-lytiques testées. Cette protéine

30 a été découpée d'un gel SDS-PAGE préparatif et soumise à une digestion par la trypsine. Les peptides résultants ont été analysés par spectrométrie de masse de type electrospray/MS/MS sur un appareil hybride triple quadrupole-temps de vol

(QSTAR®XL, Applied Biosystem) selon une procédure standard du laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'œuf et décrite dans Tarze et al. (2007).

Par cette analyse, les Inventeurs ont identifié la protéine PF963, peptidase de la paroi bactérienne, sécrétée, appartenant à la famille de  
5 NlpC/P60. La séquence complète de la protéine PF963 (SEQ ID n°36 ; Tableau I) a pu être déduite après détermination de la séquence complète du génome de la souche CIP103027 par les Inventeurs.

3-2-2 – Fusion de la partie N-terminale de la protéine P963 avec la partie C-  
10 terminale de TRAIL

La présence d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale de PF963 indique que cette enzyme est sécrétée *via* la voie de sécrétion Sec. Ce peptide signal a pour séquence la séquence SEQ ID n°36. Des amorces de PCR ont été conçues pour amplifier la séquence d'ADN correspondant au promoteur et au peptide signal de  
15 la protéine PF963 (Figure 3). Un autre couple d'amorces a été conçu pour amplifier la séquence de la cytokine humaine TRAIL. Seule la séquence extracellulaire active Val<sup>114</sup>-Gly<sup>281</sup> a été amplifiée. Les séquences d'amorce sont indiquées dans le tableau III ci-dessous.

20

Tableau III

Amorce PCR	Séquence	Tm (°C)	Nucléotides totaux	Nucléotides s'hybridant à la matrice
P963Fw	ATACATATGCCACCGTGAGCTGCACCT (SEQ ID n°38)	70	27	18
P963Rv	GCAAGCTTTCGGCCTGTGCAAGTGGTG (SEQ ID n°39)	71	27	19
TRAILFw	GCAAGCTTAGTGAGAGAAAAGAGGTCCTCAGAGAGTAG (SEQ ID n°40)	70	37	28
TRAILRev	ACTGCAGTTAGCCAACCTAAAAAGCCCCGAAAAAACTGG (SEQ ID n°41)	70	39	32

La construction résultant de la fusion entre 1) le promoteur et le peptide signal de  
25 PF963 et 2) la séquence Val<sup>114</sup>-Gly<sup>281</sup> de TRAIL a été introduite dans le vecteur

de clonage pPK705 (Kiatpapan et al., 2000). Le nouveau plasmide d'expression pFB4:TRAIL est présenté sur la Figure 4.

### 3-2-3 – Vérification de la construction génétique

- 5 La séquence du plasmide pFB4:TRAIL a été vérifiée (SEQ ID n°42). La portion qui correspond à la protéine de fusion va des nucléotides 8451 à 9070. Cette portion est traduite sur la figure 5 (SEQ ID n°43) : la séquence correspondant au peptide signal de la protéine PF963 apparaît soulignée, la séquence Val<sup>114</sup>-Gly<sup>281</sup> de TRAIL apparaît en gras.
- 10 La protéine de fusion possède une séquence de 205 résidus aminoacides correspondant à une masse de 23190 Da et un point isoélectrique de 9.08. L'élimination du peptide signal conduirait à une séquence de 171 résidus aminoacides correspondant à une masse de 19822 Da et un point isoélectrique de 8.60.
- 15 L'expression et la sécrétion de la protéine de fusion a été vérifiée par Western Blot à l'aide d'un anticorps polyclonal commercial anti-TRAIL (Pab to TRAIL, Alexis Biochemicals). Cet anticorps reconnaît la forme monomérique (31 kDa) ainsi que la forme dimérique (63 kDa) de TRAIL dans la préparation TRAIL Super Killer (Fig. 6 ; piste 4). Dans le surnageant des deux clones de la souche transformée *P. freudenreichii* portant le plasmide, une protéine de 22 kDa,
- 20 correspondant à la taille attendue, a été détectée par cet anticorps. Cette protéine était absente du surnageant de la souche sauvage.

### **IV- Autres modes de réalisation de l'invention.**

- 25 Dans les exemples ci-dessus, les Inventeurs ont mis en œuvre un peptide signal de *P. freudenreichii*.  
Avantageusement, on mettra en œuvre la présente invention à l'aide d'un ou plusieurs des peptides signaux de *P. freudenreichii* listés dans le Tableau I supra.
- 30 Bien entendu, l'objet de la présente invention peut être généralisé à l'utilisation de n'importe quel peptide signal de bactérie propionique. Les moyens et méthodes décrits dans le détail ci-dessus pour obtenir un vecteur recombinant permettant l'expression et la sécrétion dans le milieu extracellulaire d'une ou

plusieurs séquences d'acides aminés d'intérêt (notamment, la séquence Val<sup>114</sup>-Gly<sup>281</sup> de TRAIL), sont en effet adaptés à l'utilisation de n'importe quel peptide signal de bactérie propionique.

5 A titre d'exemple, on pourra construire un vecteur recombinant conforme à la présente invention en utilisant un peptide signal choisi parmi les peptides signaux de *Propionibacterium acnes*, dont le génome est accessible dans les bases de données. Le Tableau II ci-dessus donne des exemples de séquences de peptides signaux putatifs chez *P. acnes*.

10 Afin d'identifier d'autres peptides signaux applicables à la présente invention, on pourra notamment procéder à des alignements de séquences et ainsi rechercher des séquences de *Propionibacterium sp.*, homologues (par exemple, avec un % d'homologie d'au moins 80% environ, de préférence d'au moins 85%, 90%, 95% ou 98% environ) à des séquences de peptides signaux d'une bactérie propionique que l'on prendra comme référence (une bactérie propionique de  
15 référence pourra être *P. freudenreichii* ou *P. acnes*), ou bien rechercher les protéines sécrétées par une bactérie propionique donnée et identifier les éventuels peptides signaux correspondants. Les outils informatiques actuels permettent d'identifier sans difficultés des séquences de peptides signaux putatifs au sein de séquences protéiques ou génomiques (par exemple, le  
20 logiciel SignalP 3.0 ; Center for Biological Sequence Analysis, CBS ; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Emanuelsson et al., 2007).

## REFERENCES

- Jan et al. 2002. *Cell Death Differ.* 9:179-188.
- Herve et al. 2007. *Int J Food Microbiol.* 113:303-314.
- Lan et al. 2007. *Apoptosis.* 12:573-591.
- 5 Lan et al. 2007. *Br J Nutr.* 97:714-724.
- Lan et al. 2008. *Br. J Nutr* 1-9.
- Lacour et al. 2001. *Cancer Res.* 61:1645-1651.
- 10 Lacour et al. 2003. *Oncogene.* 22: 1807-1816.
- Meurette et al. 2005. *Clin. Cancer Res.* 11 : 3075-3083.
- Meurette et al. 2006. *Ann N Y Acad Sci.* 1090: 209-216.
- 15 Meurette et al. 2007. *Cancer Res.* 67: 218-226.
- Kiatpapan et al. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4688-4695.
- Tarze et al. 2007. *Oncogene* 26:2606-2620.
- Ganai et al. 2009. *British Journal of Cancer.* 101, 1683-1691.
- 20 Hu et al. 2009. *Cancer Gene Therapy.* 16, 655-663.
- Patch J.A. & Barron A.E., 2002. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6(6), 872-877. Review.
- Ashkenazi A et al. 1999. *J. Clin. Invest.* 104, 155-162.
- Sträter J. et al. 2002. *Gastroenterology.* 122, 659-666.
- 25 Sambrook et Russel (2001) *Molecular Cloning: A laboratory Manual (3rd Ed.)* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Emanuelsson et al. 2007. *Nature Protocols* 2, 953-971.
- 30 Bougle et al. 1999. *Scand. J. Gastroenterol.* 34, 144-148.
- Zarate et al. 2000. *J. Food Prot.* 63, 1214-1221.
- Zhang et al. 2010. *Cancer Gene Therapy* 17, 334-343



## REVENDEICATIONS

1. Vecteur recombinant pour l'expression et la sécrétion, par une bactérie propionique, d'une ou plusieurs séquences d'acides aminés d'intérêt,  
5 comprenant au moins :
  - sous le contrôle d'au moins un promoteur approprié,
  - au moins une séquence nucléotidique codant un peptide signal de bactérie propionique et, en fusion traductionnelle avec celle-ci,
  - une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant la ou lesdites séquences  
10 d'acides aminés d'intérêt.
  
2. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou lesdites séquences d'acides aminés d'intérêt possèdent une activité biologique d'intérêt médical choisie parmi les activités pro-apoptotiques, anti-inflammatoires,  
15 immunomodulatrices et de médiateurs chimiques.
  
3. Vecteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite séquence d'acides aminés d'intérêt est celle de la protéine pro-apoptotique TRAIL ou du domaine extracellulaire C-terminal de TRAIL, de préférence la séquence allant  
20 des acides aminés 114 à 281 de TRAIL.
  
4. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit peptide signal d'origine propionique est un peptide signal d'une bactérie propionique choisie parmi *Propionibacterium freudenreichii*, plus  
25 particulièrement *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* et *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, et *Propionibacterium acnes*, ladite bactérie propionique étant préférentiellement *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*.
  
5. Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit peptide  
30 signal est choisi parmi :
  - les séquences SEQ ID n° 19 à 36 et 45 à 57 ;
  - les séquences similaires à au moins 80% à celles-ci ; et
  - leurs analogues et dérivés.

6. Bactérie propionique recombinante comprenant au moins un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Bactérie selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est une  
5 bactérie propionique laitière choisie parmi les espèces *Propionibacterium freudenreichii*, plus particulièrement *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ou *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* et *P. acidipropionici*.

8. Bactérie selon la revendication 7, déposée le 13 août 2009 sous le  
10 numéro I-4213 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France).

9. Médicament comprenant une quantité efficace d'au moins un vecteur  
15 selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et/ou d'au moins une bactérie selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, et au moins un support pharmaceutiquement acceptable.

10. Procédé de production et sécrétion dans le milieu extracellulaire, par une  
20 bactérie propionique selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, d'au moins une séquence d'acides aminés d'intérêt, ledit procédé comprenant au moins :

- la culture de ladite bactérie dans des conditions appropriées ;
- la récupération du milieu de culture contenant ladite séquence d'acides aminés  
25 d'intérêt ; et
- facultativement, la purification de ladite séquence d'acides aminés d'intérêt.

Fig. 1

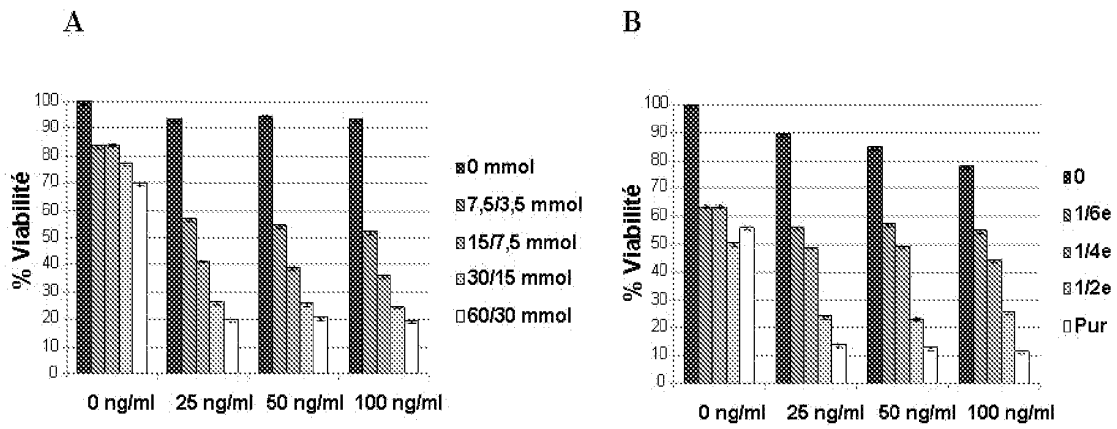


Fig. 2

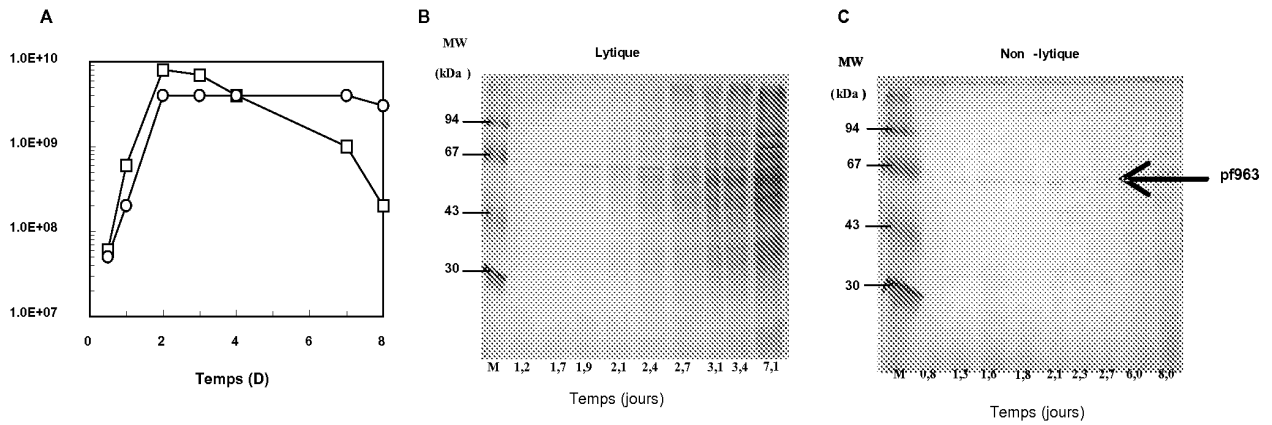


Fig. 3

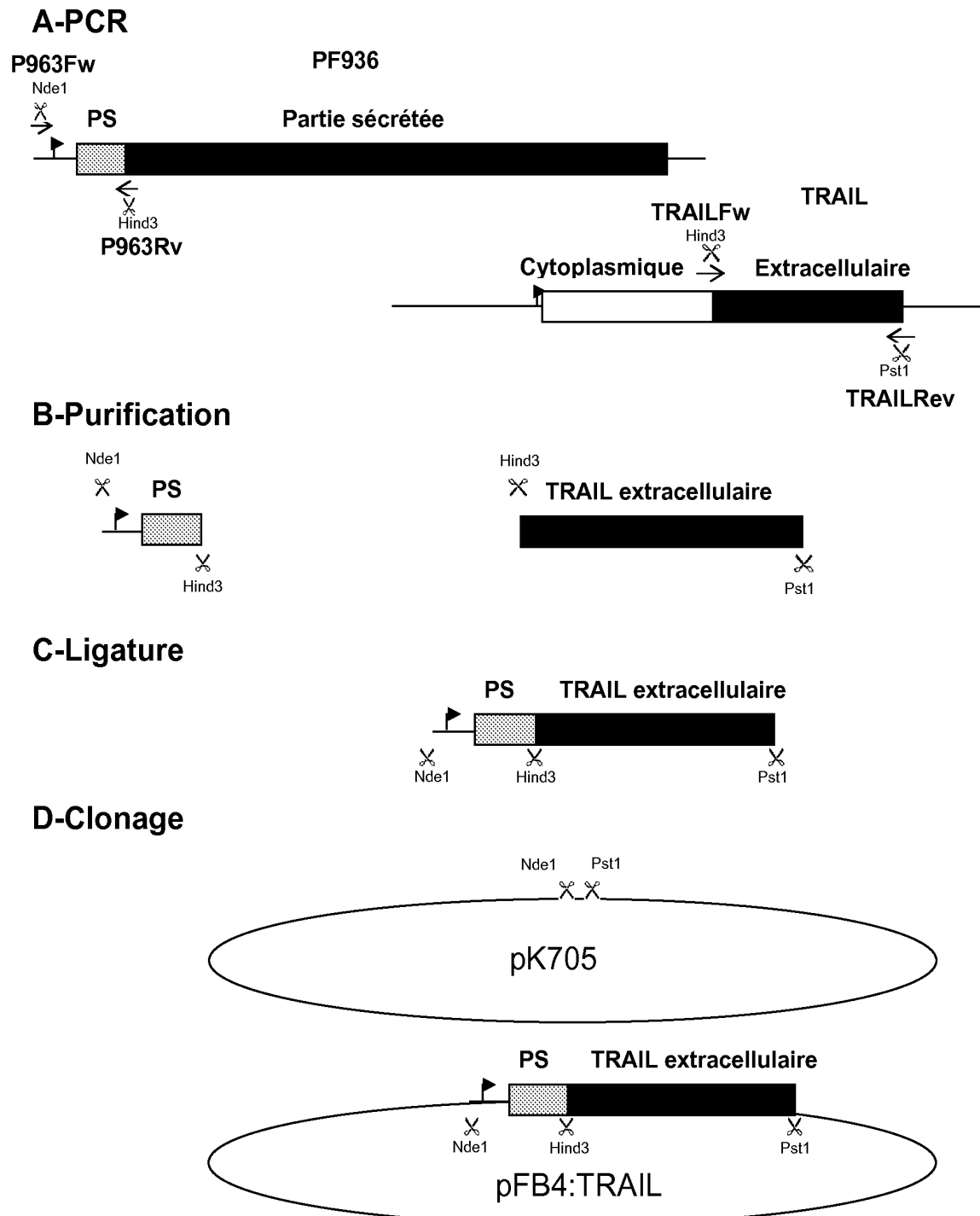


Fig. 4

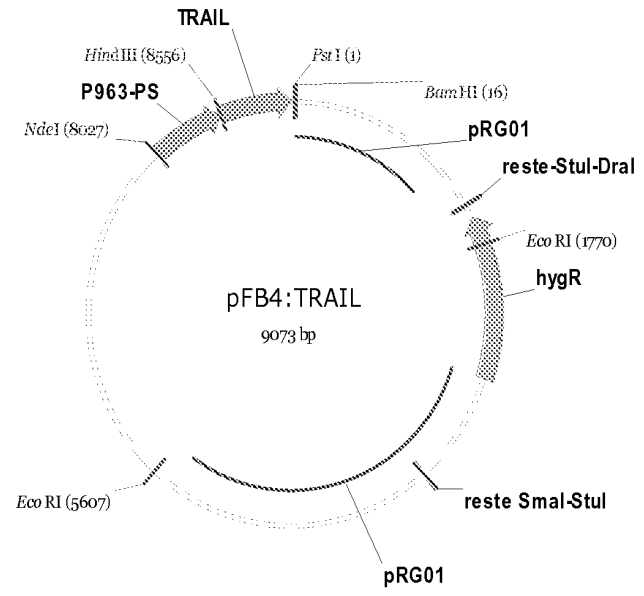


Fig. 6

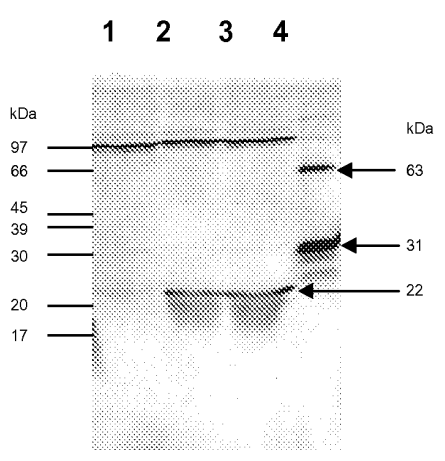


Fig. 5

DNA: GTGAATCCCTTCGTCAAGACGGCGCGCTGGCTATCACCTCGACGCTGGTG

+1: M N P F V K T A R V A I T S T L V

DNA: GCAGGCTCGCTCGCCACTGCCAGCCTCGTGTTTGCACCACTTGCACAGGCC

+1: A G S L A T A S L V F A P L A Q A

DNA: GAAAGCTTAGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAGAGTAGCAGCTCACATAACT

+1: E S L V R E R G P Q R V A A H I T

DNA: GGGACCAGAGGAAGAAGCAACACATTGTCTTCTCCAAACTCCAAGAATGAA

+1: G T R G R S N T L S S P N S K N E

DNA: AAGGCTCTGGGCCGAAAATAAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCAT

+1: K A L G R K I N S W E S S R S G H

DNA: TCATTCTGAGCAACTTGCACCTGAGGAATGGTGAAGTGGTCATCCATGAA

+1: S F L S N L H L R N G E L V I H E

DNA: AAAGGGTTTTACTACATCTATTCCCAAACATACTTTCGATTTTCAGGAGGAA

+1: K G F Y Y I Y S Q T Y F R F Q E E

DNA: ATAAAAGAAAACACAAAGAACGACAAACAAATGGTCCAATATATTTACAAA

+1: I K E N T K N D K Q M V Q Y I Y K

DNA: TACACAAGTTATCCTGACCCTATATTTGTTGATGAAAAGTCTAGAAATAGT

+1: Y T S Y P D P I L L M K S A R N S

DNA: TGTTGGTCTAAAGATGCAGAATATGGACTCTATTCCATCTATCAAGGGGGA

+1: C W S K D A E Y G L Y S I Y Q G G

DNA: ATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAATTTTTGTTTCTGTAACAAATGAG

+1: I F E L K E N D R I F V S V T N E

DNA: CACTTGATAGACATGGACCATGAAGCCAGTTTTTTCGGGGCCTTTTTAGTT

+1: H L I D M D H E A S F F G A F L V

DNA: GGCTAACTGCA

+1: G \* L

## SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE DE RENNES I  
 INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE  
 (INSERM)

<120> Vecteur recombinant pour la production et la sécrétion de  
 séquences d'acides aminés d'intérêt par les bactéries  
 propioniques et ses applications

<130> 244959D27981

<160> 57

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 99  
 <212> DNA  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 1  
 atgtcaaaga cactctctcg gatcgcatcc gtcgcttcgg ttgccgcgct cgccggcagc 60  
 atcacccgtca tcgccgggca gaacgcgtcc gccgacagc 99

<210> 2  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 2  
 gtgaagaacg gtctcaagac cctgctcatt ggtggagtcg gcatcgcgac ccttgccggtc 60  
 ggcggcgctcg gaactgccat cgcagacaat 90

<210> 3  
 <211> 105

<212> DNA

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 3

atgcgatcca ccacgacgaa ggcgtttgcc ggtgctgctg tgctggcgct ggcgcttgct 60

ggctgcggct cgaattcggg ctctccacc aagtggccg acagc 105

<210> 4

<211> 93

<212> DNA

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 4

atgctcactc gcaagagagt ggttcagcg ggagctgccg ccaccctgtc cctcacggcg 60

tttgccgggt tgcagcccgc cagcgccgc acc 93

<210> 5

<211> 108

<212> DNA

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 5

atgggattca gggttggccg tcgtcccctc atcggggcag ttctcgccg gtcgatggca 60

acactcgtgg gctgttccac ctccggtagc ggcagtggag cctccagc 108

<210> 6

<211> 111

<212> DNA

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 6

atgcaggccc tccaaggaag gcgccgtca cgacgggtga tggcggccgc ggtagcagcc 60

ctcaccgcca tgaccgtget gccctcccag ctcaacgccg ttgetgcacc c 111



<210> 7  
<211> 90  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 7  
atgtccactg gccgcatgaa gttcatcaag ctggcagttc ctgtcatcgt tgccctgctgc 60  
  
ttgacgcaaa tggctgcctt agctgatgtg 90

<210> 8  
<211> 114  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 8  
atggcgatga gggcacgtca cggcgtcgtc cggtttggtc tggctctgtct caccgcattg 60  
  
gcggtcttcg gcacggcaaa tgtgtcgggt caggttgccg tgatggctga gggc 114

<210> 9  
<211> 108  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 9  
ttgaaccagg cctgtcgcac gatgcgcctg aagatcggcg actccaccaa gcgcatccgg 60  
  
atctttcttcg tcgtgatggc cgtggcgatc acctgctcg cgggacgg 108

<210> 10  
<211> 75  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 10  
atgcgacgtc gcaccacgat tgcagccctc gctgctgtct tgagtttcag tcccctggcc 60  
  
gcccaggccg caccc 75

<210> 11  
<211> 132  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 11  
atgcctagtc atgcggtgcg ggagacgcgg gcgaacaagt tgcgccggtt cctgcggccc 60  
  
accgttgccc agggcgtgct cggatcgcg ttctgcctcg tggccgccgt cggcgtggtg 120  
  
cagatccgct cc 132

<210> 12  
<211> 111  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 12  
atgtcacgga ttcaactccc cggctgagc cggattgcga tcgcagcagc agcttccgct 60  
  
gccctgatcg gcaccagctt catcgccccg gccacggcct ttgccgcgcc g 111

<210> 13  
<211> 75  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 13  
ctagccgacc ttctcggcct tgctggccag gtcgtcgggg atcgtgacc ccatcagggga 60  
  
ggcggccttc tcatt 75

<210> 14  
<211> 120  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 14  
ttagttggtg gggacgagga gggagtggag ttogatgacg tcgagggtgg gtgcggtggc 60  
  
ggggcgggtg atggtttcgg tgccggtgtg tccttgggcg gtccaggtga tggccaggt 120

<210> 15  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 15  
tcagccagtt ggtgccggcc ttggcgtcgg cggcgtggga tacacggga actgggcgcc 60

<210> 16  
<211> 114  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 16  
atgttcattt cgcgcttcg tcgtgcggct gcggtcggcc tggccgccgt caccgcattg 60  
  
tccgccactg cctgtagegg ttctcgtcg tcgtccagct catccgcgag ctcg 114

<210> 17  
<211> 108  
<212> DNA  
<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 17  
atgaagtcgg cgacgcgacg cccgctgacg cgctggattg tcgccttcgg ggtggtggtg 60

gtgctggtca tcgccgggtc ggtggggctg catgcctccg gtgccctg 108

<210> 18

<211> 108

<212> DNA

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 18

gtgaatccct tcgtcaagac ggcgcgctg gctatcacct cgacgctggt ggcaggctcg 60

ctcgccactg ccagcctcgt gtttgacca cttgcacagg ccgattac 108

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 19

Met Ser Lys Thr Leu Ser Arg Ile Ala Ser Val Ala Ser Val Ala Ala

1                    5                    10                    15

Leu Ala Gly Ser Ile Thr Val Ile Ala Gly Gln Asn Ala Ser Ala Asp

20                    25                    30

Ser

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 20

Met Lys Asn Gly Leu Lys Thr Leu Leu Ile Gly Gly Val Gly Ile Ala  
 1                   5                   10                   15

Thr Leu Ala Val Gly Gly Val Gly Thr Ala Ile Ala Asp Asn  
                   20                   25                   30

<210> 21

<211> 35

<212> PRT

<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 21

Met Arg Ser Thr Thr Thr Lys Ala Phe Ala Gly Val Ala Val Leu Ala  
 1                   5                   10                   15

Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Ser Asn Ser Gly Ser Ser Thr Lys Ser  
                   20                   25                   30

Ala Asp Ser  
                   35

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 22

Met Leu Thr Arg Lys Arg Val Val Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Leu  
 1                   5                   10                   15

Ser Leu Thr Ala Phe Ala Gly Leu Gln Pro Ala Ser Ala Ala Thr  
                   20                   25                   30

<210> 23  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 23

Met Gly Phe Arg Val Gly Arg Arg Pro Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala  
 1                   5                   10                   15

Gly Ser Met Ala Thr Leu Val Gly Cys Ser Thr Ser Gly Ser Gly Ser  
                   20                   25                   30

Gly Ala Ser Ser  
                   35

<210> 24  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 24

Met Gln Ala Leu Gln Gly Arg Arg Arg Ser Arg Arg Val Met Ala Ala  
 1                   5                   10                   15

Ala Val Ala Ala Leu Thr Ala Met Thr Val Leu Pro Ser Gln Leu Asn  
                   20                   25                   30

Ala Val Ala Ala Pro  
                   35

<210> 25  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 25

Met Ser Thr Gly Arg Met Lys Phe Ile Lys Leu Ala Val Pro Val Ile  
1                   5                   10                   15

Val Ala Cys Cys Leu Thr Pro Met Ala Ala Leu Ala Asp Val  
                  20                   25                   30

<210> 26  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 26

Met Ala Met Arg Ala Arg His Gly Val Val Arg Leu Gly Leu Val Cys  
1                   5                   10                   15

Leu Thr Ala Leu Ala Val Phe Gly Thr Ala Asn Val Ser Gly Gln Val  
                  20                   25                   30

Ala Val Met Ala Glu Gly  
                  35

<210> 27  
<211> 36  
<212> PRT  
<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 27

Met Asn Gln Ala Leu Ser Thr Met Arg Leu Lys Ile Gly Asp Ser Thr  
 1                   5                   10                   15

Lys Arg Ile Arg Ile Phe Phe Val Val Met Ala Val Ala Ile Thr Leu  
                   20                   25                   30

Leu Ala Gly Arg  
                   35

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 28

Met Arg Arg Arg Thr Thr Ile Ala Ala Leu Ala Ala Val Leu Ser Phe  
 1                   5                   10                   15

Ser Pro Leu Ala Ala Gln Ala Ala Pro  
                   20                   25

<210> 29

<211> 44

<212> PRT

<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 29

Met Pro Ser His Ala Val Arg Glu Thr Arg Ala Asn Lys Leu Arg Arg  
 1                   5                   10                   15

Phe Leu Arg Pro Thr Val Ala Gln Gly Val Leu Gly Ile Ala Phe Cys



20

25

30

Leu Val Ala Ala Val Gly Val Val Gln Ile Arg Ser

35

40

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Propionibacterium freudenreichii

&lt;400&gt; 30

Met Ser Arg Ile Gln Leu Pro Arg Leu Ser Arg Ile Ala Ile Ala Ala

1

5

10

15

Ala Ala Ser Ala Ala Leu Ile Gly Thr Ser Phe Ile Ala Pro Ala Thr

20

25

30

Ala Phe Ala Ala Pro

35

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Propionibacterium freudenreichii

&lt;400&gt; 31

Met Lys Arg Arg Thr Leu Leu Gly Thr Leu Gly Ile Met Gly Leu Ser

1

5

10

15

Val Pro Leu Ala Ala Cys Ser Ser Lys

20

25

<210> 32  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 32

Met Val Thr Gly Gly Asn Asp Met Pro Ser Lys Arg Ile Thr Thr Trp  
 1                   5                   10                   15

Pro Gly Ile Ser Ala Leu Ser Ala Leu Ile Ala Gly Met Leu Leu Ala  
                   20                   25                   30

Pro Leu Pro Val Ala Ala Asp Gly  
                   35                   40

<210> 33  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 33

Met Ala Met Val Met Ala Ser Leu Ala Met Phe Gly Ala Ser Arg Ala  
 1                   5                   10                   15

Ser Ala Ala Asp  
                   20

<210> 34  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 34

Met Phe Ile Ser Arg Phe Arg Arg Ala Ala Ala Val Gly Leu Ala Ala  
 1                   5                   10                   15

Val Thr Ala Leu Ser Ala Thr Ala Cys Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser  
                   20                   25                   30

Ser Ser Ser Ala Ser Ser  
                   35

<210> 35

<211> 36

<212> PRT

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 35

Met Lys Ser Ala Thr Arg Arg Pro Leu Thr Arg Trp Ile Val Ala Phe  
 1                   5                   10                   15

Gly Val Val Leu Val Leu Val Ile Ala Gly Ser Val Gly Leu His Ala  
                   20                   25                   30

Ser Gly Ala Leu  
                   35

<210> 36

<211> 36

<212> PRT

<213> *Propionibacterium freudenreichii*

<400> 36

Met Asn Pro Phe Val Lys Thr Ala Arg Val Ala Ile Thr Ser Thr Leu  
 1                    5                    10                    15

Val Ala Gly Ser Leu Ala Thr Ala Ser Leu Val Phe Ala Pro Leu Ala  
                   20                    25                    30

Gln Ala Asp Tyr  
                   35

<210> 37

<211> 572

<212> PRT

<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 37

Met Asn Pro Phe Val Lys Thr Ala Arg Val Ala Ile Thr Ser Thr Leu  
 1                    5                    10                    15

Val Ala Gly Ser Leu Ala Thr Ala Ser Leu Val Phe Ala Pro Leu Ala  
                   20                    25                    30

Gln Ala Asp Tyr Ser Pro Leu Ala Ala Thr Ala Thr Val Asn Val Arg  
                   35                    40                    45

Gln Gly Pro Asp Thr Ser Ser Ser Val Leu Ala Thr Leu Ser Ser Gly  
                   50                    55                    60

Asp Thr Val Thr Gln Arg Gly Ala Glu Gln Asp Gly Trp Leu Pro Ile  
 65                    70                    75                    80

Thr Tyr Asn Gly Ala Asn Ala Trp Ile Gln Ala Gln Tyr Val Ala Ser

				85					90						95				
Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Gln	Lys	Asp	Gln	Ile	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr				
			100					105					110						
Ala	Asp	Ala	Tyr	Val	Arg	Thr	Ala	Ala	Asn	Ala	Asn	Ala	Trp	Val	Leu				
			115					120					125						
Gly	Thr	Ala	His	Thr	Gly	Asp	Lys	Val	Gly	Ile	Thr	Gly	Gln	Ala	Ser				
	130						135				140								
Gly	Asp	Tyr	Thr	Pro	Val	Asn	Phe	Tyr	Gly	Arg	Ala	Gly	Trp	Ile	Ala				
145					150					155						160			
Thr	Lys	Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Ala	Ser	Val	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile				
					165					170					175				
Thr	Thr	Ala	Ile	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	Trp	Val	Arg	Gly	Gly	Glu	Ser				
			180						185						190				
Thr	Ala	Ala	Gln	Ser	Ile	Gly	Met	Leu	Tyr	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Asp				
			195					200						205					
Val	Thr	Gly	Asp	Pro	Val	Gly	Gly	Trp	Val	Pro	Ile	Asn	Phe	Asn	Gly				
	210						215					220							
Lys	Thr	Ala	Phe	Val	Ala	Ala	Asn	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Thr	Asp	Pro				
225						230					235				240				
Thr	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Thr	Lys	Thr	Asp	Val	Thr	Asn	Lys	Asp	Thr				

	245		250		255
Ala Thr Ser Thr Gly Thr Asp Ser Ser Thr Ala Gly Gly Ser Thr Ala	260		265		270
Thr Thr Pro Thr Thr Thr Ala Pro Thr Thr Thr Ala Pro Ala Thr Lys	275		280		285
Pro Thr Thr Thr Pro Pro Ala Thr Thr Gln Ala Ala Ala Ser Thr Lys	290		295		300
Tyr Thr Thr Ala Asp Val Asn Val Arg Val Gly Pro Gly Ile Asp Gln	305		310		315
					320
Gln Pro Val Thr Val Leu Lys Glu Asn Ser Gln Val Ala Ala Thr Gly		325		330	
					335
Lys Thr Ser Gly Asp Trp Thr Glu Val Ser Tyr Asp Gly Ala Ser Arg		340		345	
					350
Trp Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Asp Thr Lys Gln Ala Glu Ala Pro		355		360	
					365
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Asp Pro Thr Pro Ala Gly Pro Thr Gly Ser		370		375	
					380
Arg Trp Thr Thr Ala Ala Leu Asn Ala Tyr Gly Ser Ser Thr Gln Pro		385		390	
					395
					400
Lys Pro Ala Thr Thr Val Val Pro Glu Gly Thr Gln Val Glu Leu Thr					

```

                405                   410                   415
Gly Lys Gln Ala Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Thr Trp Asn Gly Thr Thr
               420                   425                   430
Tyr Trp Ser Ala Thr Glu Tyr Leu Gly Thr Asn Ala Pro Ala Thr Asn
               435                   440                   445
Thr Ser Ala Asn Thr Ala Lys Pro Gly Ala Asn Ala Val Glu Thr Ala
               450                   455                   460
Ile Asn Phe Ala Met Ser Lys Leu Gly Gly Pro Tyr Val Trp Gly Gly
465                   470                   475                   480
Thr Gly Pro Val Gly Tyr Asp Cys Ser Gly Leu Met Gln Ala Ala Tyr
               485                   490                   495
Ala Ala Ala Gly Val Thr Leu Pro Arg Val Thr Trp Asp Gln Val Asn
               500                   505                   510
Ala Gly Lys Gln Val Ser Val Gly Asp Leu Gln Pro Gly Asp Leu Val
               515                   520                   525
Phe Phe Tyr Asp Asn Gly His Val Gly Met Tyr Ile Gly Asn Gly Asn
               530                   535                   540
Ile Val Asn Ala Leu Asn Glu Asp Ala Gly Ile Val Val Thr Pro Ile
545                   550                   555                   560
Ser Tyr Met Pro Ile Ser Ala Ala Val Arg Ile Ala
```

565

570

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce P963Fw

&lt;400&gt; 38

atacatatgc caccgtgagc tgcacct

27

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce P963Rv

&lt;400&gt; 39

gcaagctttc ggcctgtgca agtgggtg

27

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce TRAILFw

&lt;400&gt; 40

gcaagcttag tgagagaaag agtcctcag agagtag

37

&lt;210&gt; 41



<211> 39  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>

<223> Amorçe TRAILRv

<400> 41

actgcagtta gccactaaa aaggccccga aaaaactgg 39

<210> 42

<211> 9073

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Séquence du plasmide pFB4:TRAIL

<400> 42

ggtcgactct agagggatcc ggcggaactt cacgtcctgg cggaggagt ggcgggcgcg 60

ttccagcgt tctccagca cggatgatcc ggctccaga cgtcacgct caccctgctc 120

caggtgccgg gtcaccgtca ccgtccgcac cggccgggcc tcggcctggg cggcccggcg 180

ttcctcactg gcccgttcc ggcaatcgtc ggaacaccac acccggggcc gaccccgcc 240

accgtgggcc tccaccggcg ccccgcagtg gggacacgcc cgcagcgcc acgcatctc 300

atccaaggcc atcaccgggt cggaatccat acccgaaacc atatcgtccg gacgatgaac 360

tgcgccagac agctaagaat gcacgaggtg tgtctccgat tctcaggaaa cgctcagcat 420

tttccgagac gttcggcgca cgacacacc cccacaagaa ccgaccgcc cagcatccgc 480

cgacacgtcg atccgcacc gcgatgggct ggccgaggcc gactacgacc gctagtcagc 540

acctgcgctg atctaccgtc gccctgaccg actctcccg cgggattgtc gccggccgct 600

gccagcatgg acctgcggcc cgcgccctc gccctgcaac tcgagggagg cggggccgtc 660  
cacccccac accaccccga caccgtgatg cgcccatgtc gcctaacggg ttgcccgacc 720  
tccccgacat caagaaaacc tgacaccgtc gccgcaagcg ctacactgac tactagtagt 780  
caggaggtgc gtgatgacca tcgccacatc ggtgaaactc tccgaagaga ccggccgcaa 840  
actcgatgaa ctagcccggg ccaccgggcg atccaagtcc tactacctgc gcgaggccat 900  
cgaggaccac atcgaccaga tgggccacga ctacgccatc gcccgactcg ccgacgacgt 960  
gcgagccggc cgggcccga cctacagcgc cgacgaagtg gaccagatcc ttggcctgga 1020  
cgattgagta caccgacccc gccgtcaaag cactgcgcaa actcgaccga gcccaggccc 1080  
gccgcatcac cgcctacata cgtgagctca ccggcctgga cgatccccac caacgcggga 1140  
aaggaaaata aaaaagggga cctctagggt cccaattaa ttagtaatat aatctattaa 1200  
aggtcattca aaaggctatc caccgatca attcccctgc tcgcgaggc tgggtgccaa 1260  
gctctcgggt aacatcaagg cccgatcctt ggagcccttg ccctcccga cgatgatcgt 1320  
gccgtgatcg aaatccagat ccttgaccg cagttgcaaa ccctcactga tccgtaatgt 1380  
gagttagctc actcattagg caccccaggc tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt 1440  
gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc 1500  
caagctgtgg cgtacaccgt cgcctcggtc ggcccgtaga gattggcgat cccgaccgca 1560  
gcaccaccga gaacgtcccc gacgtggccg accagcccgt catcgtcaac gcctgaccgc 1620  
ggtgcggaca ggccgtgtcg cgaccggccg tgcggaatta agccggcccg taccctgtga 1680  
atagaggtcc gctgtgacac aagaatccct gttacttctc gaccgtattg attcggatga 1740  
ttcctacgcy agcctgcgga acgaccagga attctgggag ccgctggccc gccgagccct 1800

ggaggagctc gggctgcccg tgccgccggt gctgcgggtg cccggcgaga gcaccaacct 1860  
cgtactggtc ggcgagcccc acccggatgat caagctgttc ggcgagcact ggtgcgggtcc 1920  
ggagagcctc gcgtcggagt cggaggcgta cgcggctctg gcggacgccc cggtgccggt 1980  
gccccgcctc ctcgcccgcg gcgagctgcg gcccgacc ggagcctggc cgtggcccta 2040  
cctggtgatg agccgatga ccggcaccac ctggcgggtcc gcgatggacg gcacgaccga 2100  
ccggaacgcg ctgctcgccc tggcccgca actcggccgg gtgctcgcc ggctgcacag 2160  
ggtgccgctg accggaaca ccgtgctcac cccccattcc gaggtcttcc cggaactgct 2220  
gcgggaacgc cgcgcggcga ccgtcgagga ccaccgccc tggggctacc tctcgccccg 2280  
gctgctggac gcctggagg actggctgcc ggacgtggac acgtgctgg ccggcccgca 2340  
accccggttc gtccacggcg acctgcacgg gaccaacatc ttcgtggacc tggcccgac 2400  
cgaggtcacc gggatcgctg acttcaccga cgtctatgcg ggagactccc gctacagcct 2460  
ggtgcaactg catctcaacg ccttccgggg cgaccgag atcctggccg cgctgctega 2520  
cggggcgcag tggaagcgga ccgaggactt cggccgcaa ctgctgcct tcaccttct 2580  
gcacgacttc gaggtgttcg aggagacccc gctggatctc tccggcttca ccgatccgga 2640  
ggaactggcg cagttcctct gggggccgcc ggacaccgcc cccgggcct gacgccccg 2700  
gcctaccgt gacacgcaac cccgcaccct cggccaagac gtcacacacc acccgcccc 2760  
ccgagcactg aggatgtcaa ctgcccag cggcctgcc ggccgtctta cgggttgtct 2820  
tggcgggcg ggtgtctttg ccctggcca gcagccccac gatctccgc agcgtgtcgg 2880  
cggtgggcgc gtcccgggc gctgacgct ccgctccgc cctggcctgc tcggctgect 2940  
gcgcccgate ctccggcg gcggcctgct ccctcgctc ggccagctcg ccggtcaggg 3000

cctcgacccg ggctgcacc tgccccaggc ggcctccgc ctctgctgc acctgctcgg 3060  
cccgggectc cgcttggtcc cgggccgctt cggcctcggc ccggtgctga tccgccaggg 3120  
ccgcctcggc caccgctteg gcctgcccatt ccaccgctg ctcgccccga gccccgaact 3180  
cctcgcgggc cgcatactc gcctgacgcc acgcccggc ccacaccaga cccaacggct 3240  
ccgacagatc cggcggggcc ggcgtctgga ccgacgccga gacgtcgcgc aggaaccccg 3300  
ccgcagcgtc ggtggagcac cccgcctccg ccttcaacga ccgcaccgtc acccgccgac 3360  
ccgcaccgct caaccgcgca taggccgccc ccaaccttga ccattcgac tccatgacct 3420  
accctccat tctgtaccct gtacctgtc ctaggtacgt tctaatgta cctcaccgga 3480  
tgcagaacct gcaaccccc tcacactccc cctgcacggg gccgcccc tgcaaccccg 3540  
ctgccgcgcc cgctcctgcg tcgcggcctt gccctgccc aacgccggc cggcgggcag 3600  
cccaccagag gctctgtgag acgtcggcgc ccccgccac ctaccctaaa gaccaaccgg 3660  
ccgtggaaac gtctgtgagg agcctttag gagttcccag gacaagccag caaggccggg 3720  
cctgacggcc cggaaaggaa gtcgctgcgc tctacgaag aagcccctct ggggaccccc 3780  
agaccccgga actatctgat ttggttagc ggcgtacttc cgtcataccg gaatttatgg 3840  
catgctgtgg tcatggcgac gacgacggtc gatgagcagt gggagcaggt gtggctgccc 3900  
cgctggcccc tggcctccga cgacctgga cggggcatct accggatggc ccgcccctcg 3960  
gcgctggggg tccgatacat cgaggtcaac cccaagcca tcagcaacct cctcgtggtc 4020  
gactgcgacc accccgacgc tgccatgcgc gccgtctggg accgccacga ctggctgccc 4080  
aacgccatcg tcgagaacct cgacaacggc cacgccacg ccgtgtggc cctggaagca 4140  
gcatccccgc gcaccgagta cggccaccgc aagccatcg cctacgccgc cgccgtcacc 4200

gagggcctgc gccgatccgt cgacggagac gcctcctacg ccggcctgat caccaagaac 4260  
cccgaacacc ccgcctggaa caccacctgg tgcaccgacc acctctaccg gctggccgag 4320  
ctcgacaccc acctggatgc cgccggcctc atgcccgcce cctcctggcg acgcacccgc 4380  
cggcgcaacc ccgtcggcct gggccgcaac tgcgccatct tcgagaccgc ccgcacctgg 4440  
gcctaccgcg acgcccgcg catccgaaa cgccacgaat acccgaccgc cgaggactcg 4500  
gccgacctgc acgccgtcat cgctccacc gtcgaggcgc tcaacgccg ctacagcgaa 4560  
cccctgccgg ccgcgaggc cgccggcatc gccgccagca tccaccgatg gatcaccac 4620  
cgtttctacg gctggatcga ctcccacacc gtcaacgagg ccactttctc caccatccag 4680  
agctacagag gacacaagg agccggcaag gctcgtctc gtgcccgcg tgctgcttct 4740  
atcaccgatt gggaggcatg atggctgacg tccagcaccg cgtgaagcgt cggggcacgg 4800  
cccgcgaggc cgcagaacgt gtagggcct ccatccgaac cgcccagcg tggacctca 4860  
tccccgtga ggaatggatc actcagaagg ccgtcgagcg tgaggagatc cgggcctaca 4920  
agtacgacga ggggcacacg tggggcgaga cctcgcgcca cttcgggatc gcgaagacca 4980  
ccgcccagga gcgggcccgg cgggctcgaa gggagcgggc ggccgaagcg gagaaggctg 5040  
ccgaggaggc cgaggccgcg ctgctccga cactcttcga gggccaggag caaggttctg 5100  
catgagcaac cccgagtcct cgggtagacc gtctggcccg acgttaagca tggctgaagc 5160  
ggcccgtgcc tgtggggttt cagtgtccac ggtgaggcgt caccgtgatg ccctggtggc 5220  
ccacggtgct acccgatcag acgctcatg ggtgataccc ctatcagcgt tgatttcatg 5280  
cggtttgatg ccccgggtga cccccctga tgccccgtca cccaataacg tggcgccctgc 5340  
catgacgtcc cacggtgacg cccccctgac gggggaagtc caagagctgc gcgagcgact 5400

ggccaacgct gagcatcgag ccgagctagc agtagagggt ggggacgacg tctcggcgac 5460  
tccggagaac accaagtcag ggtctcatga gtgtgcgata gcttgagctg tctaccaatc 5520  
tggatatagc tatatcggtc gtttgtgtct gattcgccag tgagccaacg gcgggggcca 5580  
cacgcggtgg cgaaaccccc tggcagaatt cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt 5640  
gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag 5700  
cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt 5760  
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaataaat cggccaacgc gcggggagag 5820  
gcggtttgcg tattgggccc tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 5880  
ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat 5940  
caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaggcc aggaaccgta 6000  
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 6060  
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 6120  
cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 6180  
ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca 6240  
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 6300  
accgctgccc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cacgacttat 6360  
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 6420  
cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct 6480  
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 6540  
aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 6600

aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggAACGAAA 6660

actcacgtta agggattttg gtcAtgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 6720

tAAAttaaaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggTctgaca 6780

gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 6840

tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 6900

ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa 6960

accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggTctgc aactttatcc gcctccatcc 7020

agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 7080

acgttgttgc cattgctaca ggcAtcgtgg tgtcacgctc gtcgTttggt atggcttcat 7140

tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg tgcaaaaag 7200

cggtagctc cttcggTcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 7260

tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 7320

ctgtgactgg tgagtactca accaagtcAt tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 7380

gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 7440

tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 7500

ccagttogat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca 7560

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaggga ataaggcgca 7620

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 7680

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaataaa caaatagggg 7740

ttccgcgcac atttccccga aaagtccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga 7800

cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgctg ttcggtgatg 7860  
acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg 7920  
atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgtcggggct 7980  
ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg ccaccgtgag 8040  
ctgcacctga atcagctgag aatgccctga accctcaaac ccgcaccctg aacctcaacc 8100  
ttgcgttgaa cccgaggggt gcggggttga cgcgcacccc gaccactgca ccccgcgggg 8160  
cgcccctgtg acgaccatgg tctgattcac gcctgaaatc actccccgcc ggggtggaga 8220  
accacgtcaa cgcggccgtg gatcacatcg ggcgtcgaaa aacaaccccc catttcccca 8280  
accctcaacc tgatcctgca ctgttgcgg gtttgcctgag agccgcctaa gctgccgcac 8340  
gttgcctcag ttggggcgtg gcctgctgca tacggggccg ggaaagacgc ctcacctggg 8400  
atgacgcgga ccattggaca cggcctttcc ggccgcggga aggaccagac gtgaatccct 8460  
tcgtcaagac ggcgcgcgtg gctatcacct cgacgctggt ggcaggctcg ctcgccactg 8520  
ccagcctcgt gtttgcacca cttgcacagg ccgaaagctt agtgagagaa agaggctctc 8580  
agagagtagc agctcacata actgggacca gaggaagaag caacacattg tcttctccaa 8640  
actccaagaa tgaaaaggct ctgggccgca aaataaactc ctgggaatca tcaaggagtg 8700  
ggcattcatt cctgagcaac ttgcacttga ggaatggtga actggtcatc catgaaaaag 8760  
ggttttacta catctattcc caaacatact ttogatttca ggaggaaata aaagaaaaca 8820  
caaagaacga caaacaatg gtccaatata tttacaata cacaagtat cctgacccta 8880  
tattggtgat gaaaagtgct agaaatagtt gttggtctaa agatgcagaa tatggactct 8940  
attccatcta tcaaggggga atatttgagc ttaaggaaaa tgacagaatt tttgtttctg 9000



taacaaatga gcacttgata gacatggacc atgaagccag ttttttcggg gccttttttag 9060

ttggctaact gca 9073

<210> 43

<211> 205

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> séquence protéine de fusion codée par pFB4:TRAIL

<400> 43

Met Asn Pro Phe Val Lys Thr Ala Arg Val Ala Ile Thr Ser Thr Leu  
1                   5                   10                   15

Val Ala Gly Ser Leu Ala Thr Ala Ser Leu Val Phe Ala Pro Leu Ala  
                  20                   25                   30

Gln Ala Glu Ser Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala  
                  35                   40                   45

His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn  
                  50                   55                   60

Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser  
65                   70                   75                   80

Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly  
                  85                   90                   95

Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr

100	105	110
Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys		
115	120	125
Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile		
130	135	140
Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu		
145	150	155
160		
Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu		
165	170	175
Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met		
180	185	190
Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly		
195	200	205

<210> 44

<211> 1719

<212> DNA

<213> Propionibacterium freudenreichii

<400> 44

gtgaatccct tcgtcaagac ggcgcgctg gctatcacct cgacgctggt ggcaggctcg 60

ctcgccactg ccagcctcgt gttgacacca cttgcacagg ccgattactc cccccttgcg 120

gccaccgcca cggatgaatgt gcgccagggc cccgacacct ccagctcggg gctggcgacg 180

ctctcgtcgg gtgacacggg caccacagcg ggagccgaac aggacggctg gctgccgatc 240

acctacaacg gcgccaacgc gtggatccag gcgcagtagc tggcctccac cacggccgcc 300

accagaagg accagatctc caccgccgag ctacaggccg atgcctatgt gcgcaccgcg 360

gccaatgoga acgcctgggt gttgggcacg gcccacaccg gcgacaaggt gggcatcacc 420

ggccaggcca ggggcgacta cacgccggtg aacttctacg gccgcgccg ttggatcgcc 480

accaagctgc tcagcgcggc cgacgcctcg gtgacatcga tcaagatcac caccgccatc 540

tcgagcgact acctgtgggt gcgtggtggc gagagcaccg cggcccagtc catcggcatg 600

ctctaccggg gtgaccgggt ggacgtgacc ggggatcccc tcggcgggtg ggtgccgate 660

aacttcaacg gcaagaccgc cttcgtggcc gcgaactact cgcgctatct cactgatccc 720

accgtggtca cgctgtcgac gaagaccgac gtcaccaaca aggacacggc cacctcgacg 780

ggcaccgatt cctcgacggc cggcggctcg accgccacca ccccgaccac cacggcgcca 840

accaccaccg ctctgcaac caagccgacg accacgcccc cggccacgac gcaggccgct 900

gcgtccacga agtacacgac ggccgacgtc aacgtgcgcg tgggaccggg catcgaccag 960

cagccggtga cgggtgctca ggagaactcg caggtggccg ccaccggcaa gacaagtggc 1020

gactggaccg aggtcagcta cgacggcgcc tcgcgctgga tcagcagcca gtacctctcg 1080

gacaccaagc aggccgaggc acccgccccg gcacctgcgc ccgatccgac gcccgccggc 1140

cccaccggaa gccggtggac cacggcgcca ctgaacgcct atggcagctc caccagccc 1200

aagccggcca ccacggtggt gcccgagggc acccaggtgg aactgaccg caagcaggcc 1260

gatggacgct cggagtacac gtggaacggc acgacctatt ggtcggccac cgaatactc 1320

ggcaccaatg cgccggccac gaacacctca gcgaacaccg ccaagccggg cgccaacgcg 1380

gtggagacgg cgatcaactt cgcgatgctg aagctcgggtg gccctatgt ctggggcggc 1440

accggtccgg tgggctatga ctgctccgga ctgatgcagg ccgcgtacgc ggcgcccgcc 1500  
 gtcaccctgc cgcgcgtcac ctgggaccag gtgaatgccg gcaagcaggt gtcggtcggc 1560  
 gacctgcage cgggcgacct ggtgttcttc tatgacaacg gccacgtggg catgtacatc 1620  
 ggcaacggca acatcgtcaa cgcctcaac gaggacgccg gcatcgtggt gaccccgatc 1680  
 agctatatgc cgatctcggc tgccgtccgg atcgctga 1719

<210> 45  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 45

Met Ser Lys Val Val Ala Ser Ala Ile Ala Gly Ala Leu Ser Leu Thr  
 1                    5                    10                    15

Ser Ala Gly Gly Leu Thr Met Val Gln Ala  
                   20                    25

<210> 46  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 46

Met Arg Lys Ala Ile Val Thr Pro Val Ala Val Leu Ala Val Leu Val  
 1                    5                    10                    15

Met Ala Leu Thr Gly Cys Gly Gln Lys Asn Gln Ser Gly Gly  
                   20                    25                    30

<210> 47  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 47

Met Ala Ser Thr Pro Arg Arg Arg Trp Ala Trp Val Leu Leu Leu Val  
 1                   5                   10                   15

Val Ala Ser Leu Val Ile Val Gly Val Tyr Arg Lys Ala  
                   20                   25

<210> 48  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 48

Met Ser Ser Met Lys Gly Leu Ser Leu Val Leu Ala Thr Ser Phe Met  
 1                   5                   10                   15

Leu Ser Phe Ser Pro Gly Ser Ser Phe Ala  
                   20                   25

<210> 49  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 49

Met Glu His Arg Tyr Gly Ala Ser Gln Val Ser Gly Ser Ala Pro Arg

1                    5                    10                    15

Arg Gly Arg Gly Val Ala Phe Ala Ala Ile Thr Gly Ala Ile Leu Leu

                  20                    25                    30

Gly Thr Val Ala Ser Val Asp Pro Gly Ala Gln Ala

                  35                    40

<210> 50

<211> 27

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<400> 50

Met Ser Ser Met Lys Gly Leu Ser Leu Val Leu Ala Thr Ser Phe Met

1                    5                    10                    15

Leu Ser Phe Ser Pro Gly Ser Ser Phe Ala Ser

                  20                    25

<210> 51

<211> 47

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<400> 51

Met Pro His Ser Asp Gln Pro Thr Ser Lys Arg Val Met Ser Ala Pro

1                    5                    10                    15

Arg Arg Arg Met Pro Gly Trp Val Pro Val Thr Val Gly Ile Ala Val

                  20                    25                    30

Val Val Ile Val Val Val Ala Val Ile Val Ser Ser Leu Arg Ser  
 35 40 45

<210> 52  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 52

Met Phe Gly Thr Pro Ser Arg Arg Thr Phe Leu Thr Ala Ser Ala Leu  
 1 5 10 15

Ser Ala Met Ala Leu Ala Ala Ser Pro Thr Val Thr Asp Ala Ile Ala  
 20 25 30

<210> 53  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 53

Met Lys Ile Asn Ala Arg Phe Ala Val Met Ala Ala Ser Val Ala Val  
 1 5 10 15

Leu Met Ala Ala Ala Pro Ile Ala Gln Ala  
 20 25

<210> 54  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Propionibacterium acnes

<400> 54

Met Tyr Pro Val His Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ser Glu Phe Ser Phe  
 1                   5                   10                   15

Arg Ala His Asn His Gly Gly Thr Val Pro Ser Arg Leu Thr Arg Arg  
                   20                   25                   30

Ser Val Leu Ala Thr Gly Ala Val Ala Leu Pro Met Thr Ala Ala Ala  
                   35                   40                   45

Cys Ala  
       50

<210> 55

<211> 27

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<400> 55

Met Arg His Met Arg Pro Leu Ile Ala Leu Ser Leu Ala Gly Leu Met  
 1                   5                   10                   15

Thr Leu Ser Ala Cys Gly Glu Asp Val Ala Ala  
                   20                   25

<210> 56

<211> 31

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<400> 56



Met Asn Arg Thr Leu Lys Val Ala Ala Val Gly Ala Ile Ala Ile Leu  
1                   5                   10                   15

Cys Leu Ala Ala Cys Ser Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ala Gln Ser  
                  20                   25                   30

<210> 57

<211> 24

<212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

<400> 57

Met Glu Lys Ser Ser Phe Ala Ala Ala Asn Met Thr Ile Met Ser Glu  
1                   5                   10                   15

Pro Thr Thr Pro Thr Ser Gln Ala  
                  20



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 741393  
FR 1053750

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DHERBECOURT J ET AL: "Identification of a Secreted Lipolytic Esterase in Propionibacterium freudenreichii, a Ripening Process Bacterium Involved in Emmental Cheese Lipolysis", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 76, no. 4, février 2010 (2010-02), pages 1181-1188, XP002612901, * page 1183 * * page 1187 - page 1188 * -----	1,4-7	C12N 15/74 C12N 1/20 C12P 21/02 A61K 35/74 A61K 31/711 A61K 47/42 A61P 37/08 A61P 37/06 A61P 31/00 A61P 3/04 A61P 9/12 A61P 35/00
X	BREDE DAG ANDERS ET AL: "Heterologous production of antimicrobial peptides in Propionibacterium freudenreichii.", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY DEC 2005 LNKD- PUBMED:16332788, vol. 71, no. 12, décembre 2005 (2005-12), pages 8077-8084, XP002612902, ISSN: 0099-2240 * page 8079 - page 8083 * -----	1,2,6,7	
X	WO 2008/104890 A2 (CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S [FR]; OXENDER MARITZA [US]; DASSEUX JEA) 4 septembre 2008 (2008-09-04) * revendications 1, 24, 27-36, 46, 47 * -----	1,6,10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N C07K A61K
Y	WO 01/25397 A2 (VION PHARMACEUTICALS INC [US]; BERMUDES DAVID G [US]; KING IVAN C [US]) 12 avril 2001 (2001-04-12) * revendications 1-4 * -----	3,8,9	
Y	WO 2009/111177 A2 (SINAI SCHOOL MEDICINE [US]; WOO SAVIO L C [US]; LI ZHIYU [US]; WETMUR) 11 septembre 2009 (2009-09-11) * revendications 1-20 * -----	3,8,9	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 décembre 2010		Deleu, Laurent	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		.....	
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 1



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 741393  
FR 1053750

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y,D	LAN ANNAÏG ET AL: "Increased induction of apoptosis by Propionibacterium freudenreichii TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine.", THE BRITISH JOURNAL OF NUTRITION DEC 2008 LNKD- PUBMED:18466653, vol. 100, no. 6, décembre 2008 (2008-12), pages 1251-1259, XP002612903, ISSN: 1475-2662 * abrégé * * page 1256 - page 1257 *	3,8,9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	CHOO KHAR HENG ET AL: "A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods", BMC BIOINFORMATICS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. Suppl 15, 3 décembre 2009 (2009-12-03), page S2, XP021062001, ISSN: 1471-2105, DOI: DOI:10.1186/1471-2105-10-S15-S2 * le document en entier *	5	
A	WO 03/045405 A2 (BIO K PLUS INTERNAT INC [CA]; LUQUET FRANCOIS-MARIE [FR]; BALDWIN CIND) 5 juin 2003 (2003-06-05) * revendications 1-8 *	1-10	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 décembre 2010		Deleu, Laurent	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul                      Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie                      A : arrière-plan technologique                      O : divulgation non-écrite                      P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention                      E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.                      D : cité dans la demande                      L : cité pour d'autres raisons                      &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1053750 FA 741393**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **06-12-2010**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008104890	A2	04-09-2008	US 2008293102 A1	27-11-2008
-----				
WO 0125397	A2	12-04-2001	AU 783714 B2	01-12-2005
			AU 6933400 A	10-05-2001
			BR 0014491 A	09-03-2004
			CA 2386465 A1	12-04-2001
			CN 1420783 A	28-05-2003
			EP 1261369 A2	04-12-2002
			JP 2004500042 T	08-01-2004
			MX PA02003384 A	20-08-2002
			NZ 518354 A	25-02-2005
-----				
WO 2009111177	A2	11-09-2009	AUCUN	
-----				
WO 03045405	A2	05-06-2003	AT 336258 T	15-09-2006
			AU 2002349226 A1	10-06-2003
			CA 2364249 A1	27-05-2003
			DE 60214029 T2	29-03-2007
			EP 1450832 A2	01-09-2004
			HK 1067985 A1	04-04-2007
			MX PA04005002 A	08-09-2005
			US 2005208033 A1	22-09-2005
-----				