



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux

Luis G. Bermúdez-Humarán^a, Philippe Langella^{a,*}

RÉSUMÉ

Aujourd'hui, nous disposons de données suffisantes qui confortent l'intérêt d'utiliser des bactéries lactiques (BL), notamment des souches des lactocoques et lactobacilles, pour le développement de nouvelles stratégies de vaccination mucoale. Les BL sont des bactéries à Gram positif utilisées depuis des millénaires dans la production d'aliments fermentés. Elles sont donc de bonnes candidates pour le développement de nouvelles stratégies de vectorisation orale et constituent des alternatives attractives aux stratégies vaccinales basées sur des bactéries pathogènes atténuées dont l'utilisation présente des risques sanitaires. Ce chapitre passe en revue la recherche et les progrès les plus récents dans l'utilisation des BL comme vecteurs de délivrance de protéines d'intérêt médical pour développer de nouveaux vaccins.

Bactéries lactiques – *Lactococcus lactis* – *Lactobacillus* spp. – vaccins vivants – vecteurs mucoaux – antigènes.

1. Introduction

Les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries à Gram positif qui produisent de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* [1]. Les BL sont largement utilisées dans des procédés industriels de fermentation agro-alimentaire et certains genres comme les lactobacilles ou les bifidobactéries sont des bactéries commensales qui font partie du microbiote intestinal [2]. Les BL sont généralement reconnues comme étant sans danger par les autorités (microorganismes Generally Recognized As Safe) [3]. Lorsqu'elles sont ingérées vivantes en grandes quantités, elles peuvent survivre dans le tractus digestif de l'hôte, où elles sont susceptibles d'exercer diverses actions bénéfiques sur l'hôte après leur ingestion (ex. amélioration de la digestion des fibres, stimulation du système immunitaire et prévention ou traitement des diarrhées) [4]. Du fait de

^a INRA 0910 – Unité d'écologie et de physiologie du système digestif
78352 Jouy-en-Josas

* Correspondance
philippe.langella@jouy.inra.fr

article reçu le 17 septembre, accepté le 12 octobre 2009.
© 2009 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Use of lactic acid bacteria as mucosal vaccines

Today, sufficient consistent data are available to reinforce the interest of the use of Lactic Acid Bacteria (LAB), particularly lactococci and lactobacilli strains, to develop novel mucosal vaccination strategies. LAB are Gram positive bacteria exploited since the highest Antiquity by humans to produce fermented foods. They are thus good candidates to develop novel oral vectors and constitute attractive alternatives to vaccinal strategies based on attenuated pathogens which could induce healthy risks. Here, we summarized the most recent researches performed on the use of LAB as live vaccine delivery vectors.

Lactic acid bacteria – *Lactococcus lactis* – *Lactobacillus* spp. – live vaccines – mucosal vectors – antigènes.

leur parfaite innocuité et de leurs effets probiotiques (pour certaines), les BL sont de plus en plus étudiées pour le développement de nouvelles stratégies de vaccination mucoale [5].

Actuellement, les vaccins mucoaux en cours de développement sont basés sur l'utilisation de microorganismes pathogènes atténués dont l'utilisation présente des risques sanitaires [5]. Comme les BL sont inoffensives ou même bénéfiques (certaines espèces), elles représentent une alternative intéressante aux stratégies basées sur des pathogènes atténués pour l'administration mucoale de vaccins ou médicaments [5]. En effet, de tels vecteurs vivants permettent l'induction d'une immunité au niveau des muqueuses qui constituent la première ligne de défense contre des agents pathogènes. De plus, ces vecteurs, plus faciles à administrer et moins coûteux à produire que les vaccins injectables, sont tout à fait adaptés à des campagnes massives de vaccination dans les pays en voie de développement.

2. Immunité muqueuse et vaccination

Les agents pathogènes qui infectent l'organisme par les muqueuses représentent les causes majeures des maladies infectieuses à travers le monde. Le moyen le plus

Tableau I – Vecteurs bactériens utilisés en tant que vaccin vivant.

Vecteur bactérien	Référence
Pathogènes atténués	
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	[25]
<i>Listeria monocytogenes</i>	[26]
<i>Salmonella</i> spp.	[27]
<i>Vibrio cholera</i>	[28]
<i>Shigella</i> spp.	[29]
<i>Bordetella</i> spp.	[30]
Bactéries non pathogènes	
<i>Streptococcus gordonii</i>	[31]
<i>Lactococcus lactis</i>	[5]
<i>Lactobacillus</i> spp.	[32]
<i>Staphylococcus</i> spp.	[33]

efficace de limiter la morbidité et la mortalité induites par ces agents est la vaccination. Les muqueuses, des tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital, représentent une surface de contact d'environ 400 m² avec le milieu extérieur. Ces surfaces muqueuses comportent un système immunitaire très développé : MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*), constitué d'environ 80 % des cellules immunitaires de l'organisme et considéré ainsi comme le plus important système lymphoïde chez l'homme [6, 7]. Ces propriétés particulières ont suscité l'intérêt d'exploiter une approche vaccinale muqueuse pour lutter contre les agents infectieux dès leur pénétration dans l'organisme. Les vaccins muqueux offrent l'avantage d'induire une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique. Au contraire, les vaccins injectables traditionnels génèrent une bonne immunité systémique mais n'induisent pas ou très peu d'immunité muqueuse [8]. Les vaccins muqueux sont *a priori* dépourvus d'effets secondaires parce qu'ils évitent le contact direct entre les composants complexes des vaccins (ex. adjuvants, potentiellement dangereux), et la circulation systémique. D'un point de vue pratique, ils sont faciles à administrer (spray nasal ou par voie orale par exemple), d'un moindre coût et donc plus accessibles aux pays en voie de développement [8]. Cependant, en dépit de ces avantages, l'efficacité de l'immunisation au niveau des muqueuses est limitée par la dégradation des antigènes, l'adsorption sur les muqueuses de l'hôte et l'utilisation de systèmes d'expression inadaptés. Dans les dernières années, de nouvelles stratégies d'immunisation par voie mucosale ont été développées sur la base de pathogènes atténués (bactéries et virus) exprimant des molécules d'intérêt médical [9]. Cependant, le principal risque lié à l'utilisation de ces systèmes est un retour à l'état pathogène de ces microorganismes interdisant leur application à des patients immunodéprimés, des personnes âgées et des enfants [10]. L'utilisation de BL en tant que vecteurs d'antigènes constitue une stratégie plus sûre et moins onéreuse. En plus, ces bactéries ont déjà été utilisées avec succès pour exprimer et délivrer plusieurs protéines d'intérêt médical [5, 11, 12].

3. Brève description des différents vecteurs à administration muqueuse

Un vecteur idéal à administration muqueuse doit pouvoir : i) préserver les antigènes des dégradations, ii) cibler le système immunitaire local (ex. cellules épithéliales ou cellules dendritiques susceptibles de capturer l'antigène) et iii) stimuler de façon appropriée l'immunité innée et spécifique afin d'induire une immunité spécifique adaptée. Les récentes avancées en biotechnologie et une meilleure compréhension du système immunitaire ont rendu possible aujourd'hui la conception des nouveaux vecteurs à administration muqueuse [13]. De tels vecteurs comprennent : i) des systèmes inertes dans lesquels divers complexes lipidiques, nanoparticules, microsphères ou polymères solubles enrobent les antigènes ou l'ADN nu [14-16], ii) des vecteurs viraux (adénovirus, virus de la rougeole ou poxvirus) [17-22] ou des vecteurs bactériens tels que des bactéries pathogènes atténuées (dérivés de *Salmonella typhi*, *Bordetella pertussis*, etc.) ou des bactéries lactiques et/ou commensales [5, 11, 12, 23, 24] (*tableau I*). Toutefois, les vecteurs viraux et bactériens sont plus immunogéniques que les vecteurs inertes et représentent donc de meilleurs candidats pour induire une réponse immunitaire muqueuse et systémique. Parmi ces deux types de vecteurs à administration muqueuse (virus et bactéries), les génomes bactériens présentent l'avantage de pouvoir contenir plusieurs gènes hétérologues à la différence des vecteurs viraux dont le nombre des gènes hétérologues est limité par la taille de son génome beaucoup plus petit que les vecteurs bactériens. Ainsi, une bactérie recombinante peut produire différents antigènes permettant le développement des vaccins multivalents.

4. Adjuvants muqueux

Un des problèmes majeurs rencontrés en vaccinologie est souvent la faible immunogénicité des antigènes utilisés. L'utilisation d'adjuvants telles que la toxine cholérique et l'entérotoxine d'*Escherichia coli* constitue une bonne solution ; ils sont aujourd'hui considérés comme les adjuvants muqueux les plus puissants connus à ce jour. Malheureusement, ces adjuvants très efficaces peuvent causer des diarrhées sévères chez l'homme et induire des réponses de type Th2 indésirables [34, 35]. Par ailleurs, le pouvoir adjuvant de cytokines est en cours d'évaluation et pourrait constituer une prochaine génération d'adjuvants [36, 37]. Parmi ces cytokines, l'interleukine-12 (IL-12) est une molécule stimulatrice du système immunitaire dont l'emploi s'est révélé très prometteur en co-administration avec un antigène [38]. De plus, l'IL-12 a été utilisée avec succès dans des immunothérapies contre certains cancers et son utilisation empêche le développement d'un état de tolérance contre l'antigène utilisé. Ce dernier point est très intéressant dans le cadre du développement de vaccins vivants car la persistance de l'antigène au niveau des muqueuses peut induire un état de tolérance non souhaité.

5. Bactéries lactiques comme vecteurs à administration muqueuse

La nécessité toujours actuelle de développer des vaccins plus sûrs, faciles à administrer et peu onéreux, a conduit à une recherche intense sur l'utilisation potentielle d'organismes vivants recombinants comme vecteurs d'antigènes protecteurs, administrables en particulier par voie locale. L'attention s'est donc tournée vers l'utilisation de BL à Gram-positif et commensales comme vecteurs d'antigènes [5]. Leur totale innocuité, alliée aux capacités de certaines d'entre elles à coloniser les cavités corporelles externes, désigne les BL, en particulier les lactobacilles, comme candidats de choix pour délivrer des antigènes vaccinaux au niveau des muqueuses. Ces bactéries présentent en outre l'avantage d'être aisément administrables par voie orale ou locale. L'évaluation du potentiel des BL en tant que vecteurs vivants de vaccination a été initiée il y a quelques années dans différents laboratoires dans le monde entier [5, 11, 12]. En plus de leur statut GRAS, de nombreux antigènes et cytokines ont été produits à ce jour chez différentes BL et l'administration mucosale de ces BL génétiquement modifiées chez la souris stimulent une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique (**tableau II**).

Afin d'identifier l'espèce de bactérie permettant d'induire une protection à long terme, deux types de BL ont été étudiés selon qu'ils persistent (*e.g.* certaines espèces de lactobacilles) ou non (*e.g.* *Lactococcus lactis*) dans le tube digestif. Le mode de production de l'antigène par la bactérie recombinante conduisant au meilleur effet a été examiné également. La production d'un antigène par une BL peut être envisagée (en théorie) dans trois différentes localisations cellulaires : dans la cellule, à sa surface, ou sécrétée [11]. L'expression dans ces trois localisations a pour but une optimisation des interactions protéine-hôte et chaque localisation présente des avantages et des inconvénients selon l'application. Une forme cytoplasmique permet de protéger la protéine des environnements extérieurs drastiques (tel que les jus gastriques dans l'estomac) mais une lyse cellulaire est nécessaire pour délivrer la protéine. La forme sécrétée permet une meilleure diffusion de la protéine à l'extérieur de la bactérie et donc une meilleure accessibilité à l'hôte. Elle est en revanche plus exposée à la protéolyse. La forme ancrée de la protéine pourrait constituer un compromis entre les deux formes précédentes. La présence de la protéine à la surface de la bactérie permettrait une meilleure accessibilité de l'hôte pour la protéine tout en limitant les problèmes de protéolyse de la protéine protégée par la paroi de la bactérie. Dans ce contexte, plusieurs travaux ont été réalisés pour comparer la production de différents antigènes chez les BL en utilisant ces trois localisations et l'évaluation de leurs effets immunomodulateurs [39-41]. Ces études ont montré que les réponses immunitaires les plus élevées sont obtenues avec des antigènes exposés à la surface des BL. Ainsi, la plupart des études récentes ont choisi une exposition à la surface de l'antigène d'intérêt, plutôt qu'une localisation intra- ou extracellulaire.

6. *Lactococcus lactis* en tant que vaccin vivant

Lactococcus lactis est une bactérie à Gram-positif en forme de coque ovoïde. *L. lactis* est largement utilisée dans la fabrication de produits laitiers, en particulier de fromages. De plus, cette bactérie acidifie les milieux dans lesquels elle se développe et peut synthétiser des bactériocines [42]. Cela permet d'éviter le développement de microorganismes indésirables dans les produits laitiers et participe à la préservation de la qualité hygiénique des produits. Les nombreux travaux menés sur cette bactérie ont permis de caractériser des gènes essentiels ou présentant un intérêt technologique (gènes impliqués dans le métabolisme, la résistance au stress, la croissance, etc.) et d'élucider leurs mécanismes d'expression [43]. Des outils et des techniques d'étude de plus en plus performants ont été mis au point : systèmes de mutagenèse et d'intégration chromosomique des gènes d'intérêt, vecteurs de clonage et d'expression constitutive ou inductible, systèmes de ciblage de protéines hétérologues dans différents compartiments de la bactérie [11, 44]. De plus, les génomes des souches *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 [45] et *L. lactis cremoris* MG1363 [46] ont été récemment séquencés. Grâce à ces travaux, *L. lactis* est considérée comme la BL modèle et fait partie des bactéries les mieux caractérisées avec *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Sa parfaite innocuité et le développement des connaissances sur ses capacités de production et de sécrétion de protéines hétérologues en font un bon candidat pour la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique.

L. lactis a été largement étudiée et manipulée ces dernières années pour la production de protéines hétérologues tels que plusieurs antigènes d'origine virale ou bactérienne, ainsi que des molécules biologiquement actives (cytokines, hormones, etc.) [11, 12]. Notre équipe a développé de nombreux outils d'optimisation de la production de protéines hétérologues chez cette bactérie que nous décrivons dans les paragraphes suivants.

6.1 Production de protéines hétérologues chez *L. lactis*

Aujourd'hui, une large gamme de signaux d'expression constitutive ou inductible a été décrite chez *L. lactis* [5, 11, 12]. Grâce à ces études, nous avons constitué toute une gamme de promoteurs naturels constitutifs ou inductibles. Dans le cadre de nos études, nous avons choisi d'utiliser deux types de promoteurs principalement : i) le promoteur constitutif fort P59 [47] et, ii) le promoteur inductible à la nisine (P_{nisA}) [48].

6.2. Le système NICE (*nisin induced controlled expression*)

La nisine est une bactériocine de *L. lactis* largement utilisée comme substance antimicrobienne en industrie agro-alimentaire. Onze gènes chromosomiques adjacents (*nisABTCIPRKFEFEG*) codent pour la biosynthèse et l'immunité contre la nisine [49]. Le gène *nisA* correspond au gène de structure de la nisine et les gènes *nisRK* constituent le

Tableau II – Antigènes et cytokines (adjuvants) exprimés chez les bactéries lactiques (BL).

Antigènes	Source	Vecteur	Potentiel	Référence
Bactériens				
PA	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Lb. casei</i> <i>L. lactis</i>	vaccin contre l'anthrax vaccin contre l'anthrax	[55] [unpublished data]
LpA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Lb. plantarum</i>	vaccin contre la maladie de Lyme	[56]
L7/L12	<i>Brucella abortus</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre la brucellose	[57]
GroEL	<i>Brucella abortus</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre la brucellose	[58]
TTFC	<i>Clostridium tetani</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre le tétanos	[59]
		<i>Lb. casei</i>	vaccin contre le tétanos	[60]
		<i>Lb. plantarum</i>	vaccin contre le tétanos	[61]
β-toxin	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre <i>C. perfringens</i> type B et C	[62]
K99	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>Lb. acidophilus</i>	traitement contre la colibacillose entérique	[63]
SpaA	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre le rouget du porc	[64]
UreB	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre <i>Helicobacter</i>	[65]
		<i>Lb. plantarum</i>	vaccin contre <i>Helicobacter</i>	[66]
Cag12	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre <i>Helicobacter</i>	[67]
FliC	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis (SE)	<i>Lb. casei</i>	vaccin contre SE	[68]
PAC	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre les caries	[69]
M6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre les caries	[70]
PsaA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre pneumocoques	[71]
		<i>Lb. plantarum</i>	vaccin contre pneumocoques	[72]
Pili	<i>Streptococcus agalactiae</i> GBS	<i>L. lactis</i>	vaccin contre GBS	[73]
Viraux				
NSP4	Bovine coronavirus	<i>L. lactis</i>	vaccin contre coronavirus	[74]
SARS	Coronavirus	<i>Lb. casei</i>	vaccin contre SARS-CoV	[75]
Spike glycoprotein S	Coronavirus	<i>Lb. casei</i>	vaccins contre les gastro-entérites	[76]
EDIII	Dengue virus serotype 2	<i>L. lactis</i>	vaccine contre la dengue	[77]
V3	Human immunodeficiency virus (HIV-1)	<i>L. lactis</i>	vaccine contre l'HIV	[78]
E7	Human papillomavirus type-16 (HPV-16)	<i>L. lactis</i>	vaccine contre le cancer du col de l'utérus	[79]
		<i>Lb. casei</i>	thérapie pour le cancer du col de l'utérus	[80]
		<i>Lb. plantarum</i>	thérapie pour le cancer du col de l'utérus	[81]
		<i>Lb. plantarum</i>	thérapie pour le cancer du col de l'utérus	[81]
L1	HPV-16	<i>L. lactis</i>	vaccin contre le cancer du col de l'utérus	[82]
		<i>L. lactis</i>	vaccin contre le cancer du col de l'utérus	[83]
		<i>Lb. casei</i>	vaccin contre le cancer du col de l'utérus	[84]
VP2 and VP3	Infectious bursal disease virus (IBDV)	<i>L. lactis</i>	vaccin contre coronavirus	[85]
Cap	Porcine circovirus type 2 (PCV2)	<i>L. lactis</i>	vaccin contre PCV2	[86]
VP2	Porcine parvovirus	<i>Lb. casei</i>	vaccin contre le parvovirus	[87]
VP7	Rotavirus	<i>L. lactis</i>	vaccin contre les rotavirus	[88]
Autres				
MSP-1	<i>Plasmodium yoelii</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre la malaria	[89]
MSA2	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre la malaria	[90]
BLG	Bovine beta-lactoglobulin	<i>L. lactis</i>	traitement contre l'allergie	[91]
		<i>Lb. casei</i>	traitement contre l'allergie	[92]
Der p 5 allergen	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	traitement contre l'allergie	[93]
CWP2	<i>Giardia lamblia</i>	<i>L. lactis</i>	vaccin contre la giardiose	[94]
Cytokines				
IL-2	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	adjuvant pour vaccin contre le tétanos	[95]
IL-6	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	adjuvant pour vaccin contre le tétanos	[95]
IL-10	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	thérapie pour les colites	[96]
	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. lactis</i>	thérapie pour la maladie de Crohn	[97]
IL-12	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	adjuvant thérapie pour le cancer du col de l'utérus	[98]
		<i>Lb. plantarum</i>	adjuvant thérapie pour le cancer du col de l'utérus	[unpublished data]
IFN-ω	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	traitement antiviral	[99]
IFN-γ	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	traitement antiviral/anti-tumoral	[100]
	<i>Sus scrofa</i>	<i>L. lactis</i>	traitement antiviral/anti-tumoral	[101]
IFN-β	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. lactis</i>	traitement antiviral/anti-inflammatoire	[102]
MIG/IP-10	<i>Mus musculus</i>	<i>L. lactis</i>	nouveau adjuvant muqueux	[103]
Leptin	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. lactis</i>	nouveau adjuvant muqueux	[104]

système à deux composantes responsable de l'induction des autres gènes du cluster. L'étude de la régulation de la biosynthèse de la nisine a permis de mettre en évidence le processus par lequel la nisine extracellulaire se fixe sur la protéine NisK qui s'autophosphoryle et devient capable d'activer le régulateur NisR par phosphorylation. NisR active ensuite la transcription des opérons *nisABTCIP* et *nisFEG*. La caractérisation de la régulation de ce système a permis de mettre au point un système d'expression inductible chez *L. lactis* utilisant le promoteur du gène *nisA* et les gènes *nisRK* [50]. Le gène d'intérêt est cloné en aval du promoteur P_{nisA} et le plasmide est introduit dans une souche possédant les gènes *nisRK* (ie. *L. lactis* NZ9000). L'addition de quantités sub-inhibitrices de nisine dans le milieu de culture déclenche l'expression du gène d'intérêt proportionnellement à la quantité de nisine présente. Ce système est aujourd'hui largement utilisé pour exprimer des protéines hétérologues chez les BL en général [50].

6.3. Les vecteurs d'expression

Dans notre laboratoire, nous avons développé un système de production-exportation de protéines hétérologues chez *L. lactis* à l'aide d'une protéine sécrétée modèle très stable et bien caractérisée, la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc) [51]. Nuc est considérée comme un bon rapporteur car son activité est très facilement détectable *in vivo* par un test de coloration sur des colonies bactériennes, en culture liquide ou extraites du tractus digestif. Ce système est composé d'une famille de vecteurs qui permettent le ciblage contrôlé de l'expression d'une protéine à l'intérieur de la cellule, ancrée à la paroi ou sécrétée dans le milieu extérieur, pCYT, pSEC et pCWA, respectivement.

- pCYT : Pour obtenir l'expression d'une protéine dans le cytoplasme, le gène d'intérêt est fusionné uniquement au promoteur P_{nisA} .

- pSEC : La voie de sécrétion utilisée dans nos travaux est la voie Sec-dépendante. Elle reconnaît des protéines synthétisées avec un peptide signal (PS) N-terminal et assure leur exportation et leur translocation. La nature du PS utilisé pour sécréter une protéine peut beaucoup influencer l'efficacité de sécrétion de la protéine. Un des PS les plus efficaces pour sécréter protéines hétérologues chez *L. lactis* est celui de la protéine Usp45 qui est la protéine majoritaire sécrétée par *L. lactis* [52]. Ainsi, le PS de cette protéine a été utilisé pour exporter de nombreuses protéines hétérologues chez *L. lactis* [53].

- pCWA : Pour obtenir une protéine ancrée à la paroi de la bactérie, le gène d'intérêt est fusionné au PS_{Usp45} et au domaine d'ancrage de la protéine M6 de *Streptococcus pyogenes* (CWA_{M6}). Ce domaine contient les signaux nécessaires pour un ancrage à la paroi [54].

Ces vecteurs, fonctionnels dans un large spectre de BL, sont utilisés en routine au sein de notre laboratoire pour la production d'une 40^{aine} de protéines hétérologues chez *L. lactis* (tableau II). Plus récemment, nous avons développé différents systèmes d'expression basés sur des promoteurs inductibles aux sels biliaires qui constituent une bonne alternative au promoteur inductible à la nisine.

6.4. Amélioration de la production-sécrétion de protéines hétérologues chez *L. lactis*

Nous avons aussi travaillé sur d'autres vecteurs d'expression et les facteurs de l'hôte affectant la production-sécrétion chez *L. lactis*. Nous avons ainsi développé un vecteur (pSEC:LEISS) contenant un propeptide synthétique (LEISSTCDA), identifié comme « booster » de la production et de la sécrétion [105]. Pour les facteurs de l'hôte affectant la production-sécrétion, nous avons identifié le gène *ybdD*. L'inactivation de ce gène entraîne une surproduction des seules protéines sécrétées selon un mécanisme non encore élucidé [Morello *et al.*, soumis]. Nous avons aussi complété la machinerie de sécrétion de *L. lactis* avec SecDF de *B. subtilis* et avons observé une amélioration des niveaux de production et de sécrétion dans la souche résultante [106]. Enfin, nous avons obtenu récemment une souche de *L. lactis* qui ne produit ni l'unique protéase extracellulaire HtrA [107], ni la principale protéase intracellulaire ClpP [108]. Cette souche permet une production contrôlée et stable de différentes protéines hétérologues qui étaient hautement dégradées dans la souche sauvage [109].

7. Réponse immunitaire contre des antigènes produits par *Lactococcus lactis*

Aujourd'hui, des nombreuses études justifient l'utilisation des souches recombinantes de *L. lactis* pour induire une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique [11, 12]. La première tentative pour évaluer le potentiel de *L. lactis* en tant que vaccin à administration muqueuse a été réalisée avec une souche recombinante de lactocoque produisant une forme ancrée de l'antigène protecteur (PAC) de *Streptococcus mutans* [69]. Les souris immunisées par voie orale avec cette souche recombinante développaient des anticorps IgG sériques et IgA mucosales spécifiques du PAC. Ces résultats montrent pour la première fois que *L. lactis* peut être utilisée comme un vecteur pour délivrer un antigène au système immunitaire. Toutefois, Wells *et al.* [59] rapportent pour la première fois l'utilisation d'une souche recombinante de *L. lactis* vivante produisant le fragment C de la toxine tétanique (TTFC) comme antigène modèle, pour protéger des souris contre un challenge léthal avec la toxine tétanique après administration sous-cutanée de la souche recombinante. Plus tard, le même groupe évalue l'effet de l'administration par voie orale ou nasale de souches recombinantes de lactocoques produisant la TTFC chez la souris [110, 111]. L'immunisation orale chez la souris avec ces lactocoques recombinants entraîne une réponse humorale (ie. anticorps IgG sériques et IgA mucosales spécifiques du TTFC) moins importante que l'administration intranasale, mais l'efficacité protectrice mesurée (c'est-à-dire le défi avec la toxine tétanique) était la même.

Plusieurs études ont été menées après ces travaux pour analyser l'expression de nombreuses protéines hétérologues d'origine virale, bactérienne ou eucaryote chez *L. lactis* [11 et tableau II]. L'immunogénicité des souches

recombinantes résultantes a été évaluée dans certains cas dans des modèles animaux avec des résultats très prometteurs. En particulier, notre équipe a réussi (comme cité ci-dessus) à produire une 40^{ème} de protéines hétérologues chez *L. lactis* (tableau II). Notre objectif étant d'induire une réponse immune au niveau des muqueuses de l'hôte, nos efforts se sont concentrés sur la présentation de protéines d'intérêt médical telles que des cytokines, des antigènes, des allergènes et des antioxydants par des BL. Dans cette partie du chapitre, nous décrivons les trois projets les plus marquants de notre équipe qui concernent la production de protéines d'intérêt santé par *L. lactis* et comportant tous une phase de construction de souches suivie d'une phase d'expérimentations chez l'animal : i) construction de souches vaccinales de *L. lactis* afin de protéger et de lutter contre le papillomavirus humain de type 16 (HPV-16), ii) prévention et traitement des allergies à la β -lactoglobuline (BLG) avec de lactocoques recombinants produisant la BLG et l'interleukine-12 (IL-12) ; et iii) utilisation des lactocoques recombinants producteurs de leptine humaine en vue du traitement de l'obésité.

7.1. Construction de souches vaccinales de BL afin de protéger et de lutter contre l'HPV-16

Le papillomavirus humain de type 16 (HPV-16) est un des virus à potentiel oncogène que l'on retrouve (avec le type 18) dans plus de 90 % des cancers du col de l'utérus (300 000 décès par an dans le monde) [112]. Les stratégies actuelles pour prévenir ou traiter l'infection par ce virus sont prometteuses mais coûteuses. Des vaccins prophylactiques basés sur des VLPs (virus-like particles) ont récemment induit des baisses significatives des infections à l'HPV-16 et 18 et des cancers associés à ces infections en essais cliniques humains [113]. Cependant, ces vaccins agissent seulement au niveau de l'infection et n'ont aucun effet thérapeutique. Par ailleurs, leur coût encore très élevé limite leur utilisation dans les pays en voie de développement où l'on dénombre environ 80 % de décès liés au cancer associés à l'HPV. Dans ce projet, nous avons utilisé *L. lactis* pour délivrer deux protéines: i) l'antigène E7 du HPV-16, protéine retrouvée systématiquement dans des carcinomes provoqués par des infections par des HPV et un des antigènes candidats pour le développement d'une thérapie anti-HPV et ii) l'interleukine-12 (IL-12), une molécule stimulatrice de la réponse immunitaire cellulaire lors d'infections [38].

Dans un premier temps, nous avons construit une souche génétiquement modifiée de *L. lactis* sécrétant de façon stable l'antigène E7, alors qu'E7 est décrite comme une protéine très labile [79]. Puis, grâce aux outils développés précédemment, nous avons ciblé l'expression d'E7 dans trois localisations différentes (i.e. cytoplasme, paroi et milieu extracellulaire) et nous avons pu mettre en évidence une réponse immune spécifique d'E7 chez la souris, suite à l'administration nasale avec les trois souches recombinantes exprimant E7. Nous avons également observé une immunogénicité accrue de la forme ancrée d'E7 [41]. Nous avons ensuite construit une souche recombinante de *L. lactis* sécrétant l'IL-12. Cette cytokine déjà utilisée avec succès en immunothérapie et cancérologie n'avait jusqu'alors jamais été produite chez une bactérie à Gram positif. En effet, une

des difficultés concernant la production d'IL-12 est qu'elle requiert l'assemblage de deux sous-unités (p35 et p40) par un pont disulfure. Pour cela, nous avons développé des souches de *L. lactis* permettant la production de : i) de p35 et p40, donnant une forme hétérodimérique native de l'IL-12 et ii) d'une protéine de fusion des deux sous-unités de l'IL-12 (scIL-12). L'activité biologique de l'IL-12 produite par *L. lactis* a été ensuite confirmée *in vitro* sur des cellules de rate de souris puis *in vivo* par administration intranasale à des souris [98]. Nous avons également mesuré le potentiel adjuvant de ces souches recombinantes de lactocoques en les associant à la souche de *L. lactis* produisant la forme ancrée de l'antigène E7 [98].

Enfin, afin d'évaluer les capacités préventives et curatives de la combinaison de ces deux lactocoques, nous avons mis en place un modèle murin dans lequel nous induisons des tumeurs par implantation sous-cutanée de cellules tumorales exprimant l'antigène E7 de l'HPV-16 (TC-1), et dont nous mesurons l'évolution suite à l'administration intranasale de souches [114]. Nous avons évalué les effets préventifs et curatifs de la co-administration intranasale chez la souris de souches de lactocoques produisant E7 et IL-12 sur le développement de la tumeur TC-1. Nos résultats démontrent que l'administration préventive de lactocoques avant l'injection des cellules tumorales induit l'absence de développement de tumeurs chez 50 % des animaux immunisés. Nous avons ainsi constaté un effet adjuvant significatif de l'IL-12 co-délivrée avec l'antigène E7 dans la mesure où en l'absence de la souche produisant l'IL-12, nous observons l'absence de tumeurs dans seulement 25 % des souris immunisées. De plus, les souris immunisées avec LL-E7 et LL-IL12 sont capables de résister à un second défi (2 mois après la première immunisation) suggérant que l'immunité induite est durable [114]. L'utilisation thérapeutique de ces souches chez des souris où les tumeurs sont déjà implantées, provoque la régression totale des tumeurs chez 35 % des animaux traités. Ces effets anti-tumoraux sont la conséquence d'une réponse cytotoxique dépendante des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Ces résultats chez la souris constituent la première mise en évidence d'un effet préventif et curatif contre le cancer du col de l'utérus par vaccination muqueuse avec des souches recombinantes de lactocoques. Le vaccin, disponible actuellement en France, a un coût très élevé (près de 150 € la dose à raison de trois doses par personne vaccinée), ce qui limite son utilisation dans les pays en voie de développement. Il faut cependant souligner que ces stratégies basées sur des bactéries transgéniques demeurent aujourd'hui des modèles d'étude non encore autorisés chez l'Homme. Ces derniers temps, on peut cependant noter une évolution sensible concrétisée entre autres par les premiers essais cliniques de Phase I menés chez l'Homme avec des souches de lactocoques sécrétrices d'IL-10 [115].

7.2. Prévention et traitement des allergies à la BLG avec de lactocoques recombinants produisant la BLG et l'IL-12

La prévalence des allergies alimentaires a particulièrement augmenté au cours des 20 dernières années [116]. Les réactions et manifestations allergiques résultent de l'induction, chez des sujets génétiquement prédisposés,

de lymphocytes T auxiliaires (ou Th pour T « helper ») de type 2 (Th2) contre certaines protéines alimentaires inoffensives normalement tolérées par l'organisme: ces protéines deviennent des allergènes. Il existe dans l'organisme une régulation fine entre les différentes sous-populations lymphocytaires Th1, Th2 et Th17. Cette régulation résulte d'actions inhibitrices de ces différentes populations les unes envers les autres, et/ou du fait de l'activation de cellules régulatrices (Treg). Les lymphocytes Th1 sont sécrétateurs des cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-12 et l'interféron gamma (IFN- γ), qui favorisent l'induction d'une immunité à médiation cellulaire et la production d'IgG2a chez la souris (IgG1 chez l'homme) [117]. L'IL-12 inhibe le développement des lymphocytes Th2. Les lymphocytes Th2 sont quant à eux sécrétateurs de cytokines anti-inflammatoires qui conduisent à la production d'IgE spécifiques et inhibent le développement des cellules Th1 (IL-4, IL-13). L'induction modérée de cellules spécifiques de type Th1 pourrait donc permettre la modulation des cellules Th2 spécifiques d'allergènes, responsables de la sensibilisation allergique (production d'IgE spécifiques d'un allergène) et de la réaction allergique (apparition de symptômes suite à un test de provocation). Plusieurs études suggèrent que certaines bactéries probiotiques, dont certaines BL, pourraient agir favorablement et participer au maintien de cet équilibre Th1/Th2. Elles représentent donc des bonnes candidates pour réguler les maladies allergiques. Grâce à un modèle murin d'allergie alimentaire à la beta-lactoglobuline bovine (BLG) [118], un des allergènes majeurs du lait de vache, nous avons pu étudier l'effet de la co-administration par voie orale ou intranasale de lactocoques recombinants produisant la BLG et l'IL-12 sur la sensibilisation allergique. Grâce au suivi de la réponse immunitaire spécifique induite chez ces souris (dosage des anticorps spécifiques et des cytokines Th1/Th2), nous avons démontré que l'administration intranasale de lactocoques recombinants stimule de façon significative une réponse immunitaire Th1 par rapport aux souris contrôles. Ce pré-traitement permet de prévenir la sensibilisation allergique à la BLG (c'est-à-dire la production d'IgE spécifiques et de cytokines Th2) et le déclenchement de la réaction allergique chez les souris (éosinophilie locale) [119]. De plus, nous avons montré l'effet positif de l'administration thérapeutique des lactocoques produisant la BLG sur certains marqueurs de l'allergie au lait de vache [120]. Enfin, nous avons mis en évidence que l'administration nasale de la souche sécrétant l'IL-12 diminue aussi les manifestations allergiques dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine [121].

7.3. Utilisation de souches recombinantes de *L. lactis* productrices de la leptine humaine en vue du traitement de l'obésité

L'obésité constitue un problème mondial de santé publique et les traitements susceptibles de réduire ce problème ont un très fort potentiel thérapeutique. Nous avons développé des lactocoques recombinants producteurs de la leptine humaine, hormone produite principalement par l'adipocyte, qui informe le cerveau de l'état des réserves adipeuses. Chez la souris obèse (*ob/ob*), la déficience en leptine conduit à une obésité massive. Nos travaux ont eu pour objet de mesurer les effets de l'administration nasale

d'une souche de *L. lactis* sécrétant la leptine humaine chez des souris *ob/ob*. Dans un premier temps, nous avons construit une souche de *L. lactis* sécrétant efficacement la leptine humaine biologiquement active. Nous avons ensuite déterminé si l'administration intra-nasale de LL-Lep pouvait inhiber la prise alimentaire et la prise de poids des souris *ob/ob*. Nous avons ainsi observé que l'administration quotidienne de cette souche recombinante de *L. lactis* à ces souris obèses réduisait de façon significative le gain de poids et la prise alimentaire [104]. Ces résultats démontrent que la leptine (une hormone) est produite sous forme active par *L. lactis* et que cette souche peut être utilisée avec succès pour réguler le poids corporel et la consommation des aliments.

L'ensemble de ces résultats confirme tout le potentiel des lactocoques recombinants en tant que vecteur de protéines d'intérêt santé et laissent espérer que de telles souches de BL recombinantes seront un jour autorisées afin d'apporter de nouvelles solutions dans le futur pour la prévention et le traitement de maladies.

8. Lactobacilles en tant que vaccin vivant

Contrairement à *L. lactis*, certaines espèces de lactobacilles peuvent coloniser certaines régions de la muqueuse et induire une réponse immunitaire locale, avantage lors de développement d'un vaccin. Par ailleurs, l'utilisation possible de certaines souches probiotiques de lactobacilles comme vecteur à administration muqueuse constitue un avantage supplémentaire [32]. Cependant, la biodiversité de ce genre rend leur utilisation en tant que vaccin vivant beaucoup plus complexe que celle de *L. lactis* où une seule souche (MG1363) a été utilisée. En effet, ce genre est très répandu et contient plus de 60 espèces qui diffèrent au niveau de leurs propriétés biochimiques, écologiques et immunologiques. Toutefois, la capacité du genre *Lactobacillus* à produire des antigènes a également été démontrée.

9. Réponse immune contre antigènes produits par *Lactobacilles* spp.

Comme pour *L. lactis*, plusieurs travaux ont rapporté l'expression d'une variété de protéines hétérologues d'origine virale, bactérienne ou eucaryote chez les lactobacilles (*tableau II*). L'utilisation de lactobacilles génétiquement modifiés pour produire des protéines hétérologues et pour développer une nouvelle génération de vaccins muqueux a été proposée pour la première fois au début des années 90 [122, 123] mais la plupart de nos connaissances actuelles sur leur utilisation en tant que vaccin vivant a été obtenue avec l'antigène modèle TTFC [59, 111].

À la fin des années 90 et au début des années 2000, plusieurs laboratoires utilisaient des souches recombinantes de *Lb. casei* et *Lb. plantarum* en tant que vecteur pour délivrer des protéines d'intérêt médical à la surface des muqueuses et ils ont observé une forte stimulation de la

réponse immunitaire [5, 32]. Ainsi, notre équipe a transféré tout son savoir-faire sur la production de protéines hétérologues acquis chez *L. lactis* dans des souches de lactobacilles (plus spécifiquement dans des souches de *Lb. casei* et *Lb. plantarum*) qui présentent le double intérêt de transiter plus lentement dans le tractus digestif et de posséder des propriétés adjuvantes intéressantes dans le cas de souches vaccinales.

Dans un premier temps, nous avons l'immunogénicité d'une souche recombinante de *Lb. plantarum* produisant l'antigène E7 du HPV-16 a été évaluée dans des modèles animaux avec des résultats très prometteurs [81]. Nous avons aussi développé des souches recombinantes de *Lb. casei* productrices d'enzymes antioxydantes telles que des catalases ou des superoxyde dismutases. Le but de ce projet portait sur l'évaluation des effets bénéfiques de l'administration orale de souches de lactobacilles aux propriétés anti-oxydantes dans un modèle murin d'inflammation reproduisant des syndromes de type maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les MICI sont des maladies causées par une inflammation anormale du TD qui provoque des dysfonctionnements gastro-intestinaux. Ces maladies, souvent invalidantes et de longue durée, se caractérisent par un excès de dérivés actifs oxygénés qui s'accompagne d'une diminution des capacités des systèmes antioxydants ainsi que d'un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Nous avons d'abord exprimé chez *Lb. casei* BL23 une catalase manganèse-dépendante (MnKat) de *Lb. plantarum* [124] et nous avons démontré par la suite que l'administration quotidienne orale des souches de *Lb. casei* produisant ou non la catalase MnKat, chez des souris où une colite a été induite par l'ingestion de DSS (dextran sulfate sodium) dans l'eau de boisson, permettait de limiter significativement l'inflammation au niveau du caecum et du côlon, contrairement aux souris témoins traitées avec du PBS pour lesquelles diarrhée et lésions mucosales ont été observées [125]. Plus récemment, nous avons cherché à améliorer le potentiel antioxydant de nos souches de lactobacilles en exprimant la SOD (superoxyde dismutase) à Mn de *L. lactis* [Watterlot *et al.*, soumis].

Dans une autre étude, Chang *et al.* [126] ont construit une souche recombinante de *Lb. jensenii*, une bactérie

commensale du vagin, pour exprimer et sécréter un domaine de la protéine de liaison à la protéine gp120 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), CD4, et ils ont démontré que la co-incubation de cette bactérie recombinante avec un virus VIH portant le gène rapporteur luciférase (*i.e.* VIH-1HxB2) entraîne une diminution significative de l'entrée de ce virus dans des cellules HeLa (exprimant le récepteur CD4-CXCR4-CCR5) *in vitro*.

En plus de leur application en tant que vaccin, les lactobacilles peuvent aussi être utilisés pour délivrer de molécules anti-infectieuses ou produits antimicrobiens *in situ*. Un exemple est l'utilisation de souches recombinantes de lactobacilles pour prévenir la carie dentaire dans un modèle animal [127].

10. Conclusions et perspectives

Dans les cinq dernières années, l'intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques pour délivrer des molécules d'intérêt a considérablement augmenté, ce qui s'est traduit par des avancées significatives rassemblées au sein de cette revue. En dépit de ces progrès, beaucoup de questions restent en suspens notamment au niveau de la réponse immunitaire générée chez l'hôte par les antigènes natifs de la BL utilisée comme vecteur ou encore le mode d'administration orale ou intranasale. Actuellement, ce dernier paraît le plus adapté pour induire une bonne réponse immunitaire aux niveaux systémique et muqueux mais il reste à s'assurer de l'aspect sanitaire de ces administrations.

Les applications thérapeutiques ont évolué de telle manière que l'on peut raisonnablement envisager l'utilisation de BL recombinantes en prévision et lors du traitement de pathologies humaines dans les prochaines années. Des systèmes de confinement biologique ont été mis au point afin d'empêcher la dissémination de ces BL recombinantes [97]. Cette stratégie a permis la mise en place d'un premier essai clinique de phase I [115] qui est une étape essentielle dans des utilisations futures de ces outils très prometteurs.

Conflit d'intérêt: aucun.

Références

- Stackebrandt E, Teuber M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 1988;70(3):317-24.
- Mater DD, Corthier G. Response of lactic acid bacteria to the digestive environment. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(6 Suppl):S64-6.
- Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1990;7(1-2):175-88.
- Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006;7(2):73-89.
- Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(5):349-62.
- Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006;34(5):599-608.
- Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52(1):2-12.
- Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 2006;6(2):148-58.
- Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005;11(4 Suppl):S45-53.
- Alexandersen S. Advantages and disadvantages of using live vaccines risks and control measures. *Acta Vet Scand Suppl* 1996;90:89-100.
- Bermúdez-Humarán LG, Corthier G, Langella P. Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res Devel Microbiology* 2004;8:147-60.
- Bermúdez-Humarán LG. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Hum Vaccin* 2009;5(4):264-7.
- Illum L, Davis SS. Nasal vaccination: a non-invasive vaccine delivery method that holds great promise for the future. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51(1-3):1-3.
- Hu KF, Lövgren-Bengtsson K, Morein B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51(1-3):149-59.

- [15] Christensen D, Korsholm KS, Rosenkrands I, et al. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(5):785-96.
- [16] Singh M, Chakrapani A, O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(5):797-808.
- [17] Moss B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 1991;252(5013):1662-7.
- [18] Ulaeto D, Hruby DE. Uses of vaccinia virus in vaccine delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1994;5(5):501-4.
- [19] Beukema EL, Brown MP, Hayball JD. The potential role of fowlpox virus in rational vaccine design. *Expert Rev Vaccines* 2006;5(4):565-77.
- [20] Karkhanis LU, Ross TM. Mucosal vaccine vectors: replication-competent versus replication-deficient poxviruses. *Curr Pharm Des* 2007;13(19):2015-23.
- [21] Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem* 2008;389(5):521-36.
- [22] Patterson LJ, Robert-Guroff M. Replicating adenovirus vector prime/protein boost strategies for HIV vaccine development. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(9):1347-63.
- [23] Mielcarek N, Alonso S, Loch C. Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51(1-3):55-69.
- [24] Daudel D, Weidinger G, Spreng S. Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(1):97-110.
- [25] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991;351(6326):456-60.
- [26] Jensen ER, Shen H, Wettstein FO, et al. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunol Rev* 1997;158:147-57.
- [27] Curtiss R 3rd, Kelly SM, Tinge SA, et al. Recombinant Salmonella vectors in vaccine development. *Dev Biol Stand.* 1994;82:23-33.
- [28] Killeen K, Spriggs D, Mekalanos J. Bacterial mucosal vaccines: *Vibrio cholera* as a live attenuated vaccine/vector paradigm. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;236:237-54.
- [29] Phalipon A, Sansonetti P. Live attenuated *Shigella flexneri* mutants as vaccine candidates against shigellosis and vectors for antigen delivery. *Biologicals* 1995;23(2):125-34.
- [30] Stevenson A, Roberts M. Use of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* as live vaccines and vectors for heterologous antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;37(2-3):121-8.
- [31] Lee SF. Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: Potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(3):231-5.
- [32] Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol* 2002;20(12):508-15.
- [33] Nguyen TN, Hansson M, Ståhl S, et al. Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosus* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene* 1993;128(1):89-94.
- [34] Holmgren J, Harandi AM, Czerkinsky C. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Expert Rev Vaccines* 2003;2(2):205-17.
- [35] Lycke N. Targeted vaccine adjuvants based on modified cholera toxin. *Curr Mol Med* 2005;5(6):591-7.
- [36] Villinger F. Cytokines as clinical adjuvants: how far are we? *Expert Rev Vaccines* 2003;2(2):317-26.
- [37] Boyaka PN, McGhee JR. Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;51(1-3):71-9.
- [38] Metzger DW. IL-12 as an adjuvant for the enhancement of protective humoral immunity. *Expert Rev Vaccines* 2009;8(5):515-8.
- [39] Norton PM, Brown HW, Wells JM, et al. Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;14(2-3):167-77.
- [40] Reveneau N, Geoffroy MC, Loch C, et al. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 2002;20(13-14):1769-77.
- [41] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, et al. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 5):427-33.
- [42] Siegers K, Entian KD. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(3):1082-9.
- [43] Djordjevic GM, Klaenhammer TR. Inducible gene expression systems in *Lactococcus lactis*. *Mol Biotechnol* 1998;9(2):127-39.
- [44] Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, et al. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2003;2(1):102-11.
- [45] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 2001;11(5):731-53.
- [46] Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, et al. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* 2007;189(8):3256-70.
- [47] van der Vossen JM, van der Lelie D, Venema G. Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol* 1987;53(10):2452-7.
- [48] de Ruyter, PG, OP Kuipers, MM Beerthuyzen, et al. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 1996;178:3434-39.
- [49] Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, et al. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem* 1995;270(45):27299-304.
- [50] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;68(6):705-17.
- [51] Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, et al. Direct screening of recombinants in gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *J Bacteriol* 1996;178(14):4333.
- [52] van Asseldonk M, de Vos WM, Simons G. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase. *Mol Gen Genet* 1993;40:428-434.
- [53] Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* 2005;4(1):2.
- [54] Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, et al. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 1997;179(9):3068-72.
- [55] Zegers ND, Kluter E, van Der Stap H, et al. Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *J Appl Microbiol* 1999;87(2):309-14.
- [56] del Rio B, Dattwyler RJ, Aroso M, et al. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum* induces a protective immune response in mice with Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(9):1429-35.
- [57] Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, et al. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(2):910-6.
- [58] Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Ribeiro LA, et al. Heterologous expression of *Brucella abortus* GroEL heat-shock protein in *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact* 2006;5:14.
- [59] Wells JM, Wilson PW, Norton PM, et al. *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol* 1993;8(6):1155-62.
- [60] Maassen CB, Laman JD, den Bak-Glashouwer MJ, et al. Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* 1999;17(17):2117-28.
- [61] Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, et al. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* 2001;69(3):1547-53.
- [62] Nijland R, Lindner C, van Hartskamp M, et al. Heterologous production and secretion of *Clostridium perfringens* beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *J Biotechnol* 2007;127(3):361-72.
- [63] Chu H, Kang S, Ha S, et al. *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 2005;49(11):941-8.

- [64] Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, et al. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *J Appl Microbiol* 2004;96(6):1347-53.
- [65] Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* 2001;19(28-29):3927-35.
- [66] Corthésy B, Boris S, Isler P, et al. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* 2005;192(8):1441-9.
- [67] Kim SJ, Jun DY, Yang CH, et al. Expression of *Helicobacter pylori* cag12 gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72(3):462-70.
- [68] Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ et al. Intra-gastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine* 2007;25(18):3599-605.
- [69] Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, et al. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* 1990;58(9):2929-34.
- [70] Mannam P, Jones KF, Geller BL. Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. 2004 Jun; 72(6):3444-50.
- [71] Hanniffy SB, Carter AT, Hitchin E, et al. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* 2007;195(2):185-93.
- [72] Oliveira ML, Monedero V, Miyaji EN, et al. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface protein A) by *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;227(1):25-31.
- [73] Buccato S, Maione D, Rinaudo CD, et al. Use of *Lactococcus lactis* expressing pili from group B *Streptococcus* as a broad-coverage vaccine against streptococcal disease. *J Infect Dis* 2006;194(3):331-40.
- [74] Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(4):1423-8.
- [75] Lee JS, Poo H, Han DP, et al. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *J Virol* 2006;80(8):4079-87.
- [76] Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intra-gastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine* 2005;23(11):1335-42.
- [77] Sim AC, Lin W, Tan GK, et al. Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine* 2008;26(9):1145-54.
- [78] Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, et al. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood* 2003;102(1):223-8.
- [79] Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, et al. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(2):917-22.
- [80] Poo H, Pyo HM, Lee TY, Yoon SW, Lee JS, Kim CJ, Sung MH, Lee SH. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. *Int J Cancer* 2006;119(7):1702-9.
- [81] Cortes-Perez NG, Lefèvre F, Corthier G, et al. Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine* 2007;25(36):6581-8.
- [82] Cho HJ, Shin HJ, Han IK, et al. Induction of mucosal and systemic immune responses following oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing human papillomavirus type 16 L1. *Vaccine* 2007;25(47):8049-57.
- [83] Cortes-Perez NG, Kharrat P, Langella P, et al. Heterologous production of human papillomavirus type-16 L1 protein by a lactic acid bacterium. *BMC Res Notes* 2009;2:167.
- [84] Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, et al. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(1):745-52.
- [85] Dieye Y, Hoekman AJ, Clier F, et al. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(12):7281-8.
- [86] Wang K, Huang L, Kong J, et al. Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *J Virol Methods* 2008;150(1-2):1-6.
- [87] Xu Y, Li Y. Induction of immune responses in mice after intra-gastric administration of *Lactobacillus casei* producing porcine parvovirus VP2 protein. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(21):7041-7.
- [88] Perez CA, Eichwald C, Burrone O, et al. Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice. *J Appl Microbiol* 2005;99(5):1158-64.
- [89] Zhang ZH, Jiang PH, Li NJ, et al. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1(19). *World J Gastroenterol* 2005;11(44):6975-80.
- [90] Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A, et al. Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunizations. *Vaccine* 2006;24(18):3900-8.
- [91] Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, et al. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 May;8(3):545-51.
- [92] Hazebrouck S, Oozeer R, Adel-Patient K, et al. Constitutive delivery of bovine beta-lactoglobulin to the digestive tracts of gnotobiotic mice by engineered *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(12):7460-7.
- [93] Charng YC, Lin CC, Hsu CH. Inhibition of allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity by recombinant lactic-acid bacteria. *Vaccine* 2006;24(33-34):5931-6.
- [94] Lee P, Faubert GM. Oral immunization of BALB/c mice by intra-gastric delivery of *Streptococcus gordonii*-expressing *Giardia* cyst wall protein 2 decreases cyst shedding in challenged mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Dec;265(2):225-36.
- [95] Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, et al. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 1998;66(7):3183-9.
- [96] Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 2000;289(5483):1352-5.
- [97] Steidler L, Neiryck S, Huyghebaert N, et al. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 2003;21(7):785-9.
- [98] Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Cortes-Perez NG, et al. Intra-nasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun* 2003;71(4):1887-96.
- [99] Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Commissaire J, et al. Controlled intra- or extracellular production of staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;224(2):307-13.
- [100] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, L'Haridon R, et al. Production of biological active murine IFN-gamma by recombinant *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;280(2):144-9.
- [101] Rupa P, Monedero V, Wilkie BN. Expression of bioactive porcine interferon-gamma by recombinant *Lactococcus lactis*. *Vet Microbiol* 2008;129(1-2):197-202.
- [102] Zhuang Z, Wu ZG, Chen M, et al. Secretion of human interferon-beta 1b by recombinant *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett*. 2008;30(10):1819-23.
- [103] Cortes-Perez NG, da Costa Medina LF, Lefèvre F, et al. Production of biologically active CXC chemokines by *Lactococcus lactis*: evaluation of its potential as a novel mucosal vaccine adjuvant. *Vaccine* 2008;26(46):5778-83.
- [104] Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Silberfarb V, et al. Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(16):5300-7.

- [105] Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, et al. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 1998;180(7):1895-903.
- [106] Nouaille S, Morello E, Cortez-Peres N, et al. Complementation of the *Lactococcus lactis* secretion machinery with *Bacillus subtilis* SecDF improves secretion of staphylococcal nuclease. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(3):2272-9.
- [107] Poquet I, Saint V, Seznec E, et al. HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol* 2000;35(5):1042-51.
- [108] Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 1999;31(1):79-87.
- [109] Cortes-Perez NG, Poquet I, Oliveira M, et al. Construction and characterization of a *Lactococcus lactis* strain deficient in intracellular ClpP and extracellular HtrA proteases. *Microbiology* 2006;152(Pt 9):2611-8.
- [110] Norton PM, Brown HW, Wells JM, et al. Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;14(2-3):167-77.
- [111] Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, et al. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 1997;15(7):653-7.
- [112] Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110:S4-7.
- [113] Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, et al. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 2008;26 Suppl 10:K53-61.
- [114] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Lefèvre F, et al. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 2005;175(11):7297-302.
- [115] Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4(6):754-9.
- [116] Lack G. Clinical practice. Food allergy. *N Engl J Med* 2008;359(12):1252-60.
- [117] O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-83.
- [118] Adel-Patient K, Nahori MA, Proust B, et al. Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clin Exp Allergy* 2003;33(3):376-85.
- [119] Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(3):226-33.
- [120] Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Bermúdez-Humarán LG, et al. Allergy therapy by intranasal administration with recombinant *Lactococcus lactis* Producing bovine beta-lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;150(1):25-31.
- [121] Wu C, Yang G, Bermúdez-Humarán LG, et al. Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Int Immunopharmacol* 2006;6(4):610-5.
- [122] Rush CM, Hafner LM, Timms P. Lactobacilli: vehicles for antigen delivery to the female urogenital tract. *Adv Exp Med Biol* 1995;371B:1547-52.
- [123] Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJ. The potential of Lactobacillus as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol* 1996;44(1-3):183-92.
- [124] Rochat T, Gratadoux JJ, Gruss A, et al. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(8):5143-9.
- [125] Rochat T, Bermúdez-Humarán L, Gratadoux JJ, et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* 2007;6:22.
- [126] Chang TL, Chang CH, Simpson DA, et al. Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(20):11672-7.
- [127] Krüger C, Hu Y, Pan Q, et al. In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol* 2002;20(7):702-6.