

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Bellatreche Wissam

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie fondamentale

THÈME

**Les Bactéries lactiques
nouveaux vecteurs vaccinaux**

Déposé le : 08 /09/2021

DEVANT LE JURY

Présidente :	Mme Ait Chaaban Louisa	MCB	(Université de Mostaganem)
Promotrice :	Mme Kouadri Boudjelthia Nacima	MAA	(Université de Mostaganem)
Examinatrice :	Mme Bekinich Nahla	MAA	(Université de Mostaganem)

Année universitaire : 2020-2021

REMERCIEMENT

Avant tout, je tiens à remercier dieu tout puissant ;

Qui m'a donné la santé, la volonté, et la patience pour l'accomplissement de ce travail.

Je tiens en premier lieu, à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice :

KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima,

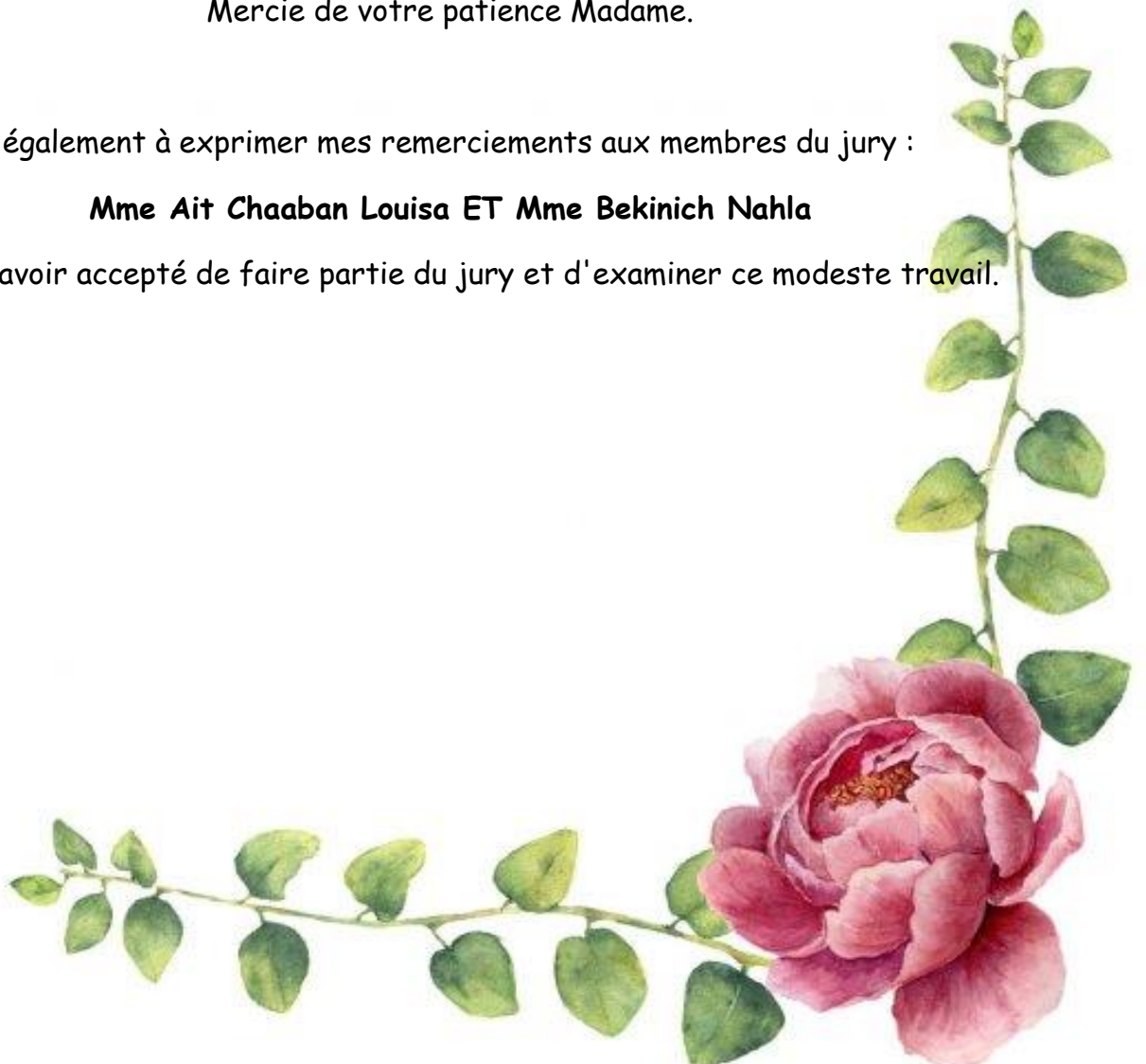
Pour la qualité de son encadrement ; Je la remercie infiniment de m'avoir été d'une grande efficacité, par sa disponibilité à tout moment, ses conseils constructifs, ses orientations et ses encouragements durant toute la période de réalisation de ce travail.

Mercie de votre patience Madame.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux membres du jury :

Mme Ait Chaaban Louisa ET Mme Bekinich Nahla

Merci d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce modeste travail.



DÉDICACE

A mes très chers parents,

Maman, Papa...

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être, je vous remercie pour toute la patience, le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance jusqu'à ce jour et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toute la vie.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous n'acquitte jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut Puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A Mes chers frère, ma sœur et ma belle-sœur : « Bachir » et « Hakim », « Kenza », et « bakheta » ;

Qui n'ont pas cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité dans la vie.

À mes meilleures amies Ikram et Oum-elkhier ;

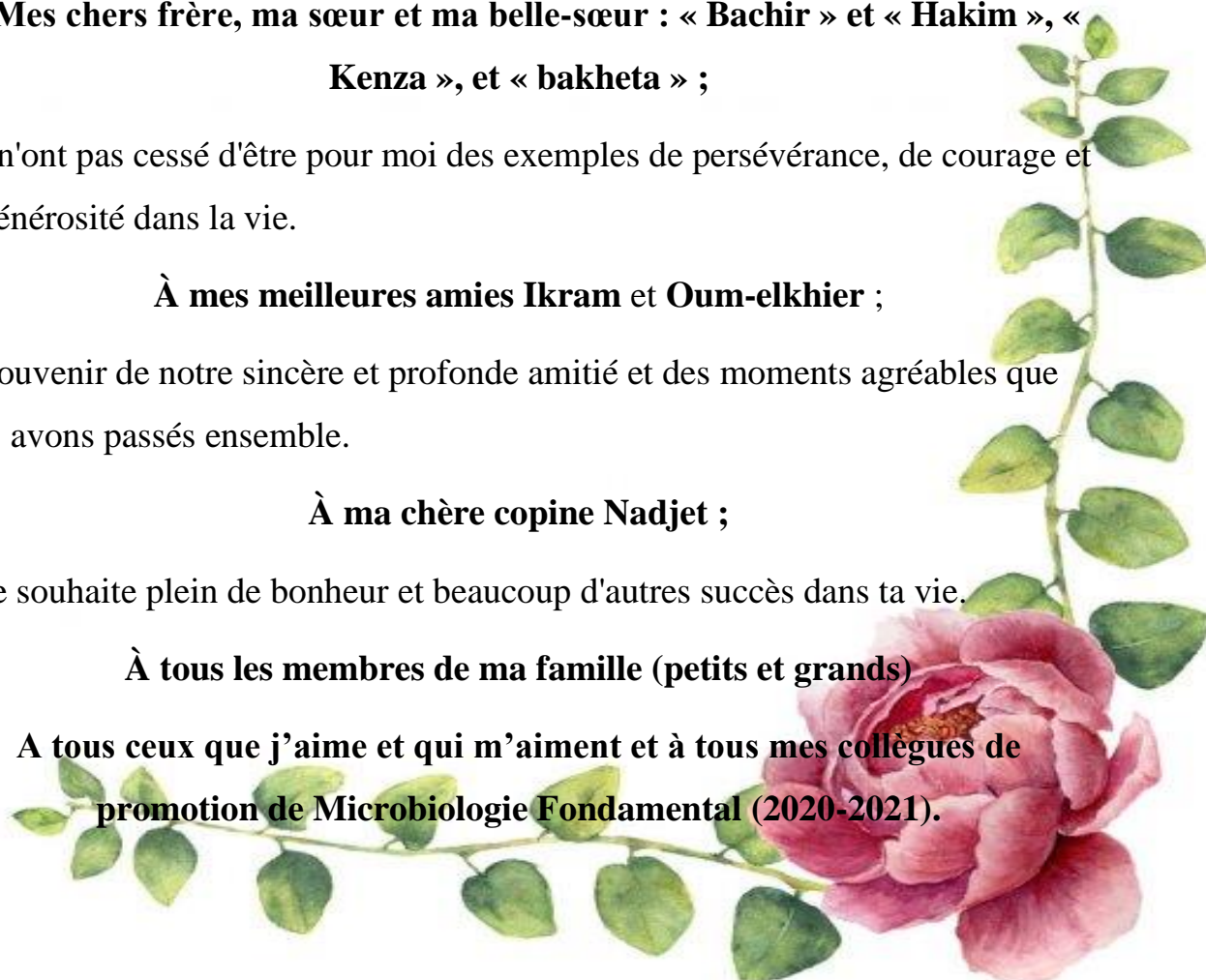
En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

À ma chère copine Nadjet ;

Je te souhaite plein de bonheur et beaucoup d'autres succès dans ta vie.

À tous les membres de ma famille (petits et grands)

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment et à tous mes collègues de promotion de Microbiologie Fondamental (2020-2021).



Résumé :

L'objectif de notre étude est de démontrer théoriquement l'efficacité d'utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux pour le développement d'une immunité efficace contre différentes maladies bactériennes ou virales. A cet effet, l'analyse de l'article de **Wei et al. (2009) : " Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99"**, est réalisée afin de comprendre les mécanismes mis en œuvre pour l'utilisation des bactéries lactiques dans la conception de vaccins efficaces. L' étude de l'article analysé vise à développer un vaccin sûr et efficace pour la prévention d'entérotoxine *Escherichia coli* (ETEC) K99 responsables de plusieurs maladies infectieuses ; un système d'affichage d'antigène de surface utilisant pgsA (poly--glutamate synthétase A) est développé comme matrice d'ancrage. Les protéines de fusion recombinantes constituées de pgsA et de la protéine fimbriae d'ETEC K99 ont été exprimées de manière stable sur *Lactobacillus casei*. La localisation en surface de la protéine de fusion a été vérifiée par immunoblot, microscopie à immunofluorescence et cyrtométrie en flux. Souris BALB/c exemptes d'agents pathogènes spécifiques (SPF) vaccinées par voie orale ou intranasale avec *L. casei* a entraîné des taux élevés d'immunoglobulines G (IgG) sériques et d'IgA muqueuses contre ETEC K99, comme l'ont démontré les tests immuno-enzymatiques utilisant des peptides de fimbriae purifiés. Les isotypes d'anticorps sériques obtenus étaient majoritairement IgG1 et IgG2a. Les souris SPFBALB/cm vaccinées ont été évaluées par provocation orale avec l'ETEC C83912 de type standard après la dernière vaccination de rappel. Plus de 80 % des souris immunisées ont survécu quelle que soit la voie immunitaire. Les titres d'anticorps induits après immunisation orale étaient inférieurs à ceux après immunisation intranasale mais l'efficacité protectrice était du même ordre de grandeur. Ces résultats indiquent que l'immunisation muqueuse avec des *L. casei* l'expression de la protéine fimbriae ETEC K99 à sa surface fournit un moyen efficace pour déclencher une réponse immunitaire protectrice contre ETEC K99.

Mots clés : Bactéries lactiques ; vaccin ; type de vaccination ; Immunisation des muqueuses.

Abstract:

This study demonstrates the effect of lactic bacteria use as vaccine vectors for the development of effective immunity against different bacterial or viral diseases. For this purpose, the analysis of the article by Wei et al. (2009): "**Immunogenicity and Protective Effective Efficacy of Orally Gold intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* Expressing ETEC K99**", is achieved to understand the mechanisms implemented for the use of lactic bacteria in the design of effective vaccines. The study of the article analyzed aims to develop a safe and effective vaccine for the prevention of enterotoxin *Escherichia coli* (ETEC) K99 responsible for several infectious diseases; A surface antigen display system using PGSA (poly - glutamate synthetase a) is expanded as anchor matrix. The recombinant fusion proteins consisting of PGSA and ETEEC K99 Fimbriae protein have been stably expressed on *Lactobacillus Casei*. The surface location of the fusion protein was verified by immunoblot, immunofluorescence microscopy and flow cytometry. BALB / C mouse free of specific pathogens (SPF) Oral or intranasal vaccinated with *L. casei* resulted in serum IMA immunoglobulin G (IgG) immunoglobulins against ETEEC K99, as demonstrated Immuno-enzyme tests using purified fimbria peptides. The serum antibody isotypes obtained were predominantly IgG1 and IgG2a. Spfbalb / cm mice vaccinated were evaluated by oral provocation with standard ETEEC C83912 after the last reminder vaccination. More than 80% of the immune mice survived regardless of the immune route. The antibody titers induced after oral immunization were lower than those after intranasal immunization but the protective efficiency was of the same order of magnitude. These results indicate that mucosal immunization with *L. casei* the expression of the Fimbriae ETEEC K99 protein at its surface provides an effective way to trigger a protective immune response against ETEEC K99.

Keywords: Lactic acid bacteria; vaccine; type of vaccination; Mucous membrane immunization.

ملخص

الهدف من دراستنا هو إثبات فعالية استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك نظريًا كنواقل لقاح لتطوير مناعة فعالة ضد الأمراض البكتيرية أو الفيروسية المختلفة. تحقيقًا لهذه الغاية، تحليل المقال من قبل وي وآخرون. (2009): "الاستمناع والفعالية الوقائية للملينة اللبنية المؤتلفة التي يتم تناولها عن طريق الفم أو داخل الأنف والتي تعبر عن «ETEC K99» ، يتم تنفيذها من أجل فهم الآليات المطبقة لاستخدام بكتيريا حمض اللاكتيك في تصميم لقاحات فعالة. تهدف دراسة المقالة التي تم تحليلها إلى تطوير لقاح آمن وفعال للوقاية من السموم المعوية *Escherichia coli* (ETEC) K99 المسؤولة عن العديد من الأمراض المعدية؛ تم تطوير نظام عرض مستضد السطح باستخدام *pgsA* مركب متعدد الجلوتامات (A كمصفوفة مرسة. تم التعبير عن بروتينات الاندماج المؤتلف المكونة من *pgsA* وبروتين *fimbriae* لـ ETEC K99 بثبات على *Lactobacillus casei*. تم التحقق من التوطن السطحي لبروتين الاندماج عن طريق التكتل المناعي والفحص المجهرى المناعي وقياس التدفق الخلوي. أسفرت الفئران BALB / c الخالية من مسببات الأمراض المحددة (SPF) التي تم تلقيحها عن طريق الفم أو داخل الأنف مع *L. casei* عن ارتفاع مستويات الغلوبولين المناعي (IgG) و G (IgG) والغشاء المخاطي ضد ETEC K99 ، كما أثبتت فحوصات الممتز المناعي المرتبطة بالإنزيم باستخدام البيبتيدات *fimbriae* المنقى. كانت الأنماط المتماثلة للأجسام المضادة في الدم التي تم الحصول عليها هي في الغالب IgG1 و IgG2a. تم تقييم الفئران الملقحة SPFBALB /سم عن طريق التحدي الفموي مع النوع القياسي ETEC C83912 بعد التطعيم الأخير الداعم. نجا أكثر من 80٪ من الفئران المحصنة بغض النظر عن مسار المناعة. كانت عيارات الجسم المضاد التي تم تحفيزها بعد التحصين عن طريق الفم أقل من تلك التي حدثت بعد التحصين عن طريق الأنف، لكن الفعالية الوقائية كانت بنفس الترتيب من حيث الحجم. تشير هذه النتائج إلى أن التحصين المخاطي بتعبير *L. casei* لبروتين *fimbriae* ETEC K99 على سطحه يوفر وسيلة فعالة لاستنباط استجابة مناعية وقائية ضد ETEC K99

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك؛ مصل؛ نوع التطعيم تحصين الأغشية المخاطية

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique
- Ag** : Antigène
- Ag O** : Antigènes Somatiques
- Ag K** : Antigènes Capsulaires
- ARN** : Acide Ribonucléique
- BALT** : Bronchi-Associated Lymphoid Tissues
- BCG** : bacille de Calmette et Guérin
- BL** : Bactéries Lactiques
- CD** : Cellule Dendritique
- CT** : Toxine Cholérique
- CTB** : sous-unité B de Toxine du Choléra
- ELISA**: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- ETEC**: *Escherichia coli* Entéro-Toxinogènes
- GALT**: Gut-Associated Lymphoid Tissues
- GRAS**: Generally Recognized As Safe
- HPV** : Human Papilloma-Virus vaccine
- ICE** : Eléments Intégratifs et Conjugatifs
- ID** : voie intradermique
- IECs** : cellules épithéliales intestinales de souris
- IgA** : ImmunoGlobulin A
- L** : Lactococcus
- LL* : *Lactococcus lactis*
- LT** : Toxine Thermolabile
- MALT** : Mucosa-Associated Lym-phoid Tissues
- MLST** : Multilocus Sequence Typing
- MLV** : modified live vaccine
- NaCl** : chlorur de sodium

Nuc: Nucléase

OMS : organisation mondiale de la santé

Opp : OLIGO-PEPTIDES

PA : Pôle Associé

PAc : antigène protecteur de Streptococcus mutans

PCR : Polymerase Chain Reaction

PgsA : protéine poly-gamma-acide glutamique synthétase A

PS : peptide signal

Rb : protéine du retinoblastome

rpoB: subunit of bacterial RNA polymerase

SARS-CoV : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère

SC : Voie sous cutanée

Ssp. : sous-espèces

Th 2 : Cellules T helper

TTFC : fragment C de la toxine tétanique

VLPs : virus-like particles

VIH/VIS : Virus de l'Immunodéficience Human / Virus de l'Immunodéficience Simienne

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Historique du développement des vaccins	6
Tableau 2. Vecteurs bactériens utilisés en tant que vaccin vivant.	8
Tableau 3 Liste des vaccins inactivés ou inertes selon leur cible et leur composition.....	9
Tableau 4. Classification des groupes de lactophages.....	30
Tableau 5. Le matériel biologique et leur d'origine	40

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma représentant une coupe de la peau	11
Figure 2. Schéma d'induction des réponses locales au niveau du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (GALT).	14
Figure 3. Sécrétion d'une protéine d'intérêt	20
Figure 4. Ancrage d'une protéine d'intérêt à la paroi bactérienne	21
Figure 5. Schéma des trois principaux mécanismes de transfert horizontal.	23
Figure 6. Mécanisme général du transport des oligopeptides par Opp	25
Figure 7. Aptitude des souches sauvages de <i>L. lactis</i> à se développer en présence de peptides sources d'acide aminé essentiel.....	26
Figure 8. Schéma de la propagation d'un ICE entre deux cellules.	28
Figure 9. Coupe histologique de muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS et évaluées selon le score histologique.....	32
Figure 10. Structure de la capsid de l'HPV-16.....	33
Figure 11. Organisation génétique de l'HPV-16 et structure de la protéine E7.....	34
Figure 12. Détection de pLA-K99 exprimé dans <i>Lactobacillus casei</i> par Western Blot avec des anticorps polyclonaux anti-K99 (a) et anti-pgsA (b).....	47
Figure 13. Images d'immunofluorescence représentatives de cellules témoins abritant pLA et de recombinantes <i>L. casei</i> cellules exprimant pgsA-K99.	48
Figure 14. Histogrammes du trieur de cellules activé par fluorescence des cellules témoins abritant des cellules pLA (remplies) et recombinantes (ouvertes) de <i>L. casei</i>	48
Figure 15. Réponse anti-K99 systémique après immunisation des muqueuses.....	50
Figure 16. Réponses des anticorps IgA muqueux anti-K99.....	52
Figure 17. Réponses des anticorps IgA muqueux anti-K99.....	52
Figure 18. Survie de souris BALB/c immunisées avec pLA-K99/L.....	54

SOMMAIRE :

Remerciement	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Partie 01 : Etude bibliographique	
I. La vaccination	4
I.1. Historique et Définition de la vaccination :	4
I.2. Types de vaccins :	6
I.2.1 Vaccins vivants :	7
I.2.2 Les vaccins bactériens	8
I.2.3 Les vaccins viraux.....	8
I.2.4 Les vaccins inertes.....	8
I.3. Les voies d'administration des vaccins :	10
I.3.1 Vaccination par voie sous cutanée (SC) :	10
I.3.2 La vaccination par voie intradermique (ID)	11
I.3.3 La vaccination par voie rectale	12
I.3.4 La vaccination par voie muqueuse	12
I.3.5 La vaccination par voie orale.....	14
II. Utilisation des bactéries lactiques en vaccination.....	16
II.1 Généralité sur les bactéries lactiques :	16
II.2 <i>Lactococcus lactis</i> :	17
II.3 <i>Lactococcus lactis</i> comme vecteur vivant à administrations muqueuses :	17
II.4 Les vecteurs d'expression.	19
III. Le Transfert horizontal	22
III.1. Définition :	22
III.1.1. Les différents mécanismes du transfert horizontal :	22
III.1.2. L'état de compétence chez les bactéries :	24
III.2. Caractéristiques des éléments Intégratifs et Conjugatifs :	27

III.2.1. Caractéristiques des éléments génétiques mobiles, cas des ICE	27
III.3. Les Lactophages :	29
III.4. Bactéries Recombinantes :	31
III.4.1. Construction de souches vaccinales de BL afin de protéger et de lutter contre l'HPV-16	32
III.4.2. Prévention et traitement des allergies à la β -lactoglobuline bovine (BLG) avec des <i>lactocoques</i> recombinants produisant la BLG et l'interleukine 12 (IL-12).	37
Partie 02 : Analyse d'article scientifique	
Partie I : Liste des articles	40
Partie II : Matériels et Méthodes	40
I. Matériels :	40
I.1 Matériel biologique :	40
II. Méthodes :	40
II.1. Souches bactériennes et conditions de culture :	40
II.2. Construction du plasmide et transformation bactérienne :	41
II.3. Immunoblotting, microscopie par immunofluorescence et flux cytométrique :	41
II.4. Etude in vivo de l'immunisation chez les souris BALB/c :	43
Partie III : Résultats et Discussion	46
III.1. Expression de la protéine de fusion pgsA-K99 à la surface cellulaire :	46
III.2. Immunogénicité systémique et muqueuse des protéines hybrides exprimées sur <i>L. casei</i>	49
III.3. Efficacité de la protéine fimbriae ETEC K99 exprimée dans le <i>L. casei</i> vivant recombinant :	53
Conclusion	57
Reference	59
Annexe	

Introduction

La vaccination permet à l'individu de développer une protection active spécifique vis-à-vis d'un antigène donné, en utilisant les ressources naturelles de l'immunité. Le choix des modalités vaccinales est complexe et les résultats peuvent être influencés par de nombreux facteurs : outre la nature des antigènes, il peut s'agir de la dose, du type d'adjuvant, des délais entre l'administration du vaccin et l'évaluation de son efficacité. Ces dernières années, des bactéries lactiques recombinantes (BL) ont été utilisées avec succès comme véhicules d'administration de protéines thérapeutiques dans des vaccins muqueux et à ADN. La protéine qui est utilisé c'est la protéine Spike qui permet au récepteur de pénétrer dans la cellule. Il y a peu près plus de 200 vaccins dans le monde qui sont en train d'être testée, actuellement, les vaccins muqueux sont en cours de développement, qui sont basés sur l'utilisation de micro-organismes pathogènes atténués (**Wells et Mercenier, 2008**).

En effet, de tels vecteurs vivants permettent l'induction d'une immunité au niveau des muqueuses qui constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. 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 (**Cesta, 2006 ; Corr et al., 2008**). 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 (**Neutra et Kozlowski, 2006**).

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 (**Neutra et Kozlowski, 2006**).

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. Aussi, 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 **(Alexandersen, 1996)**.

L'utilisation des bactéries lactiques en tant que vecteurs d'antigènes constituent une stratégie plus sûre et moins onéreuse. En effet les bactéries lactiques sont de plus en plus étudiées pour le développement de nouvelles stratégies de vaccination mucoale **(Wells et Mercenier, 2008)**. Elles sont inoffensives ou même bénéfiques pour certaines espèces, donc leur utilisation représente une alternative intéressante aux stratégies basées sur des pathogènes atténués pour l'administration mucoale de vaccins ou médicaments (Wells et Mercenier, 2008). En plus, ces bactéries ont déjà été utilisées avec succès pour exprimer et délivrer plusieurs protéines d'intérêt médical **(Wells et Mercenier, 2008 ; Bermúdez-Humarán et al., 2004a ; Bermúdez-Humarán, 2009)**.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail, qui vise à développer l'idée d'utilisation des bactéries lactiques en tant que nouveaux vecteurs vaccinaux, pour cela le manuscrit est divisé en trois grandes parties ; la première partie concerne la partie bibliographique, et les parties deux et trois concernent l'analyse d'article scientifique ; de **Wei et al. (2009)** : « **Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99** » ; ou nous avons développé respectivement la partie pratique (matériel et méthode) ensuite la discussion des différents résultats obtenus par les différents Auteurs des articles analysés.

PARTIE 01 :

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. La vaccination

1.1. Historique et Définition de la vaccination :

Les vaccins restent aujourd'hui un des piliers de la médecine moderne. On leur attribue souvent une bonne part de l'augmentation de l'espérance de vie au cours de ces dernières années et ils représentent, avec la sérothérapie, un des fondements de la révolution médicale (**Leclerc, 2011**).

C'est contre un virus, le virus de la variole, que les premières "vaccination" ont été pratiquées, d'abord en Chine, depuis très longtemps, puis en Angleterre au début du XVII^e siècle. La variolisation ou administration de matériel de pustule de variole conférait une protection contre les formes graves de la maladie. En 1796, Edward Jenner, un médecin anglais, rapporte la possibilité de protéger contre la variole grâce à l'inoculation intradermique de sérosité prélevées sur la main d'une fermière qui avait contracté la vaccine. Cette maladie bénigne chez l'homme est due à un virus infectant la vache et proche au virus de la variole : les Cowpox virus. Ainsi fut introduite la notion de protection croisée obtenue avec des microorganismes donnant peu ou pas de signes cliniques : il s'agit de la vaccination jennérienne. Il a fallu environ 10 ans d'une campagne de vaccination systématique (1967-1977) organisée par l'OMS pour qu'en 1979 soit déclarée officiellement l'éradication définitive de la variole et qu'en 1984 soit supprimée l'obligation vaccinale. (**Mammette, 2002**).

Environ un siècle plus tard, Pasteur propose, après l'avoir testée chez le chien, la vaccination rabique comme méthode pour prévenir la rage après morsure, le vaccin est préparé à partir de virus prélevé sur moelle rabique de chien et cultivé sur moelle de lapin. La méthode consiste à injecter des moelles de plus en plus virulentes, l'atténuation de la virulence étant obtenue par "contact plus ou moins prolongé avec l'air sec". Pasteur pose les bases scientifiques de la vaccination (**Mammette, 2002**).

Par ailleurs, le développement des méthodes de culture sur œufs embryonnés à partir des années 30 et des cultures cellulaires à partir des années 50 a permis la mise au point de nombreux vaccins vivants atténués : vaccins contre fièvre jaune, la grippe et les oreillons, vaccin poliomyélitique Sabin en 1957. L'atténuation est obtenue par passage successifs en culture. Ce sont les mêmes progrès techniques permettant la culture des virus qui sont à l'origine de la mise au point des vaccins à virus inactivés permis lesquels un premier vaccin antigrippal en 1940 et le vaccin poliomyélitique inactivé développé par SALK en 1954. Des vaccins sous unitaire constituée non pas du virus entier mais d'une ou de plusieurs protéines virales ou encore de

fragments de protéines ont enfin été développés. Le premier de cette nouvelle génération de vaccins, le vaccin contre l'hépatite B, a été mis au point par Philippe Maupas en 1976. **(Mammette, 2002).**

Leur définition selon OMS (organisation mondiale de la santé) la vaccination est un moyen simple, sûr et efficace de se protéger des maladies dangereuses, en stimulant le système immunitaire pour créer des anticorps, de la même manière que s'il était exposé à la maladie sauf que les vaccins ne renferment que des formes tuées ou atténuées des germes, virus ou bactéries, donc ne provoquent pas la maladie et n'exposent pas le sujet à des risques de complications **(Heininger et al., 2012).**

Selon la Pharmacopée Européenne, les vaccins sont définis comme : « Les vaccins pour usage humain sont des préparations contenant des antigènes ayant la propriété de créer chez l'homme une immunité active spécifique contre l'agent infectant ou la toxine, ou l'antigène élaboré par celui-ci. Les réponses immunitaires comprennent l'induction des mécanismes innés et adaptifs (cellulaires, humoraux) du système immunitaire. Il doit être démontré que les vaccins à usage humain possèdent une activité immunogène et une innocuité acceptable chez l'homme lorsqu'ils sont administrés selon le programme de vaccination préconisé. Les vaccins pour usage humain peuvent être constitués par des microorganismes entiers (bactéries, virus ou parasites), inactivés par des moyens physiques ou chimiques qui maintiennent des propriétés immunogènes adéquates ; des microorganismes vivants entiers naturellement a virulents ou qui ont été traités afin d'atténuer leur virulence tout en maintenant des propriétés immunogènes adéquates; ou des antigènes extraits des microorganismes ou sécrétés par des microorganismes ou préparés par génie génétique ou synthèse chimique **(Pharmacopée européenne, 2009).**

Les antigènes peuvent être utilisés dans leur état d'origine où ils peuvent être détoxifiés par des moyens physiques ou chimiques et peuvent être sous forme d'agrégats, de conjuguas ou de polymères afin d'augmenter leur pouvoir immunogène. Les vaccins peuvent contenir un adjuvant. Si l'antigène est adsorbé sur un adjuvant minéral, le vaccin est appelé vaccin adsorbé **(Pharmacopée européenne, 2009).**

L'historique du développement des vaccins divisé en vaccins vivants et atténuées, est représenté dans le tableau 01.

Tableau 1. Historique du développement des vaccins (Plotkin, 2011).

	<i>Live attenuated</i>	<i>Killed whole organisms</i>	<i>Purified proteins of organisms or polysaccharides</i>	<i>Reassortants</i>	<i>Genetically engineered</i>
<i>Eighteenth century</i>	Smallpox				
<i>Nineteenth century</i>	Rabies	Typhoïde Cholera plague			
<i>Early 20th century</i>	BCG (tuberculosis) Yellow fever	Pertusis (whole cell) Influenza Rickettsia	Diphtheria Tetanus		
<i>Late 20th century</i>	Polio (OPV)	influenza	Pneumococcus	Influenza (killed+live)	Hépatites B recombinant Cholera toxin Pertussis toxin
	Mcasles Mups	Polio(IPV) Rabies (new)	Meningococcus Hépatites B (plasma derived)		
	Rubella (ca) Adenovirus Typhoïde (ty12a) Vericella Cholera (CVD103)	Anthrax Japanese – encephalitis Hepatitis A Tick-borne encephalitis E.coli(+CT B)	H.influenza Typhoid (Vi) Pertussis (acellular) H.influenza. menignococcus (protein conjugated)		
<i>Twenty-first century</i>	Zoster		Pneumococcal conjugate	rotavirus	Human papillomavirus

1.2. Types de vaccins :

La vaccination consiste en l'inoculation d'un agent présentant une action pathogène envers l'organisme, en vue de prévenir l'apparition d'une maladie. Différents types de vaccins sont actuellement disponibles ou en cours de développement et Ils peuvent être divisés en deux catégories : vaccins vivants et vaccins inertes.

I.2.1 Vaccins vivants :

Les vaccins vivants traditionnels incluent des souches atténuées par des moyens conventionnels, comme la croissance dans des conditions de culture inhabituelles (bactéries), ou dans des cellules ou des animaux vis-à-vis desquels les souches ne sont pas initialement adaptées (virus). Les nouvelles générations de vaccins vivants utilisant les techniques de recombinaison génétique (vaccins recombinants) peuvent être fabriquées par mutagénèse dirigée de gènes de virulence, ou par clonage de gènes de protéines immunogènes dans des vecteurs viraux ou bactériens qui possèdent les propriétés souhaitées d'innocuité et d'efficacité. **(Eloit, 1998).**

Les vaccins vivants peuvent être classés en vaccins atténués, c'est-à-dire incluant une souche de l'agent pathogène ou d'un agent infectieux proche possédant un pouvoir pathogène faible ou nul pour l'espèce de destination, et en vaccins vectorisés, c'est-à-dire incluant un agent infectieux non pathogène (vecteur) dont le génome a été modifié afin d'inclure un ou plusieurs gènes codant pour des protéines immunogènes de l'agent pathogène cible **(Eloit, 1998).**

Les vaccins vectorisés, Les techniques de la biologie moléculaire n'ont pas seulement permis d'identifier certains gènes de virulence. Elles ont aussi conduit à identifier les protéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée. En effet, si la plupart des protéines d'un agent pathogène peuvent être reconnues par le système immunitaire, la réponse immune contre un petit nombre d'entre elle (voire une seule) peut permettre une protection complète. Le gène de cette ou de ces protéines, voire une séquence génique codant pour une petite fraction de cette protéine, peut alors être transféré dans un autre microorganisme (virus ou bactérie), appelé vecteur, possédant des caractéristiques adéquates de sécurité et d'efficacité par la voie d'administration retenue. Ce microorganisme va, après administration à l'hôte, induire une réponse immune contre cette protéine étrangère. Cette approche correspond à un deuxième type de vaccin recombinant **(Eloit, 1998).**

Les vaccins vivants atténués appelés « modified live vaccine » (MLV) sont obtenus de manière empirique après de multiples passages in vitro sur lignée cellulaire hétérologue, telle que les cellules MARC-145, d'une souche sauvage SDRPV-1 ou SDRPV-2 sélectionnée du terrain. Le but de cette méthodologie est d'atténuer sa virulence, aboutissant respectivement à l'obtention d'un MLV1 ou d'un MLV2 **(Murtaugh, 2011 ; OIE, 2015).**

I.2.2 Les vaccins bactériens

Entre 1882 et 1927, seuls des vaccins bactériens (Tableau 02) ont été mis au point. Actuellement, ces vaccins font l'objet de nombreuses controverses du fait de leur efficacité relative et de la mauvaise tolérance de la plupart d'entre eux. (Anonyme, 2013).

I.2.3 Les vaccins viraux

L'ère des vaccins viraux ont véritablement commencé en 1949, grâce à l'élaboration de techniques de cultures tissulaires par Endres, Wellers et Robbins, permettant en même temps, la production à grande échelle des virus. (Anonyme, 2013).

Tableau 2. Vecteurs bactériens utilisés en tant que vaccin vivant. (Bermúdez-Humarán LG., 2009)

Pathogènes atténués	Bactéries non pathogènes
<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Salmonella spp</i>	<i>Lactobacillus spp</i>
<i>Vibrio cholera</i>	<i>Staphylococcus spp</i>
<i>Shigella spp</i>	
<i>Bordetella spp</i>	

I.2.4 Les vaccins inertes

Les vaccins inactivés ou inertes sont des vaccins qui ont perdu tout pouvoir infectant par procédé physico-chimique. Ils sont donc exempts de tout risque infectieux. De manière à obtenir une réponse immunitaire satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une masse importante d'agent pathogène et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvant, deux facteurs qui expliquent leur coût de production plus élevé que les vaccins à souche vivante modifiée. Ces vaccins sont habituellement très sûrs dans la mesure où les procédures d'inactivation mises en place par les firmes sont désormais correctement définies, mises en œuvre et contrôlées, après quelques rares accidents dans le passé. Le risque associé à ces vaccins ressort plutôt de réactions locales, liées en particulier à la présence d'adjuvants (Eloit, 1998).

Les vaccins inactivés conventionnels sont fabriqués par traitement des microorganismes par des agents physiques ou chimiques. Dans la mesure où les fractions immunogènes des microorganismes sont de mieux en mieux connues, elles peuvent être utilisées pour fabriquer des vaccins ne comprenant que ces fractions immunogènes majeures (vaccin subunitaires) par purification, ou par expression in vitro de protéines (un autre type de vaccin recombinant) ou enfin synthèse chimique de peptides. Récemment, il a été démontré, chez différentes espèces,

que l'inoculation directe dans le muscle d'un gène codant pour une protéine immunogène (immunisation génétique) permettait d'induire une réponse immune cellulaire et humorale. Cette méthode correspond à un dernier type de vaccin recombinant. L'immunité systémique et muqueuse obtenue après injection de vaccin vivant est comparée à celle obtenue après injection de vaccin inerte (Eloit, 1998).

Tableau 3 Liste des vaccins inactivés ou inertes selon leur cible et leur composition. (Site WEB : www.professionnels.vaccination-info-service.fr)

Vaccins inactivés ou inertes			
Vaccins à cible virale		Vaccins à cible bactériens	
Entiers	Sous-unitaire	Entiers	Sous-unitaires
<ul style="list-style-type: none"> • Encéphalite japonaise • Encéphalite à tiques • Grippe • Hépatite A • Poliomyélite • rage 	<ul style="list-style-type: none"> • Hépatite B • HPV 	<ul style="list-style-type: none"> • Choléra • Leptospirose 	<p>Toxine inactivée</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diphtérie • Tétanos <p>Polysaccharides capsulaires non conjugués</p> <ul style="list-style-type: none"> • Méningocoque A+C • Pneumocoque 23-valent • Typhoïde <p>Polysaccharides capsulaires conjugués</p> <ul style="list-style-type: none"> • Haemophilus influenzae b • Méningocoques C et ACWY • Pneumocoque 13-valent <p>Protéines</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coqueluche acellulaire • Méningocoque B

1.3. Les voies d'administration des vaccins :

I.3.1 Vaccination par voie sous cutanée (SC) :

Administrer une thérapeutique par voie sous-cutanée est souvent le dernier recours pour un médecin désireux de limiter les traitements agressifs et invasifs, particulièrement dans le cadre des soins palliatifs. Pour répertorier les principes actifs pouvant être administrés par cette voie ainsi que les éventuelles limites associées, une revue de la littérature a été effectuée. Les antibiotiques concernés sont la teicoplanine, la nétilmicine et la gentamicine, avec un risque de nécrose cutanée pour les aminosides. Le midazolam est utile dans diverses indications et peut être associé à la morphine en cas de dyspnée. Des données sur l'administration sous-cutanée de la dexaméthasone, du clonazépam, de l'halopéridol et de la lévomépromazine sont retrouvées dans la littérature ; il en est de même pour le fentanyl, le néfopam et certains antiémétiques comme l'ondansétron et le métoclopramide. Une administration sous-cutanée des différents principes actifs cités est possible mais demande des études complémentaires. Par cette voie, on utilise surtout des médicaments en solutions aqueuses isotoniques. L'utilisation de la voie sous-cutanée connaît un nouvel essor principalement chez les personnes âgées, aussi bien pour le traitement des déshydratations que pour l'administration de certains médicaments, grâce à sa facilité d'utilisation et à sa bonne tolérance. L'injection par voie sous-cutanée est réalisée dans la partie profonde de l'hypoderme (Figure 01). **(Goarin et Cogulet, 2010).**

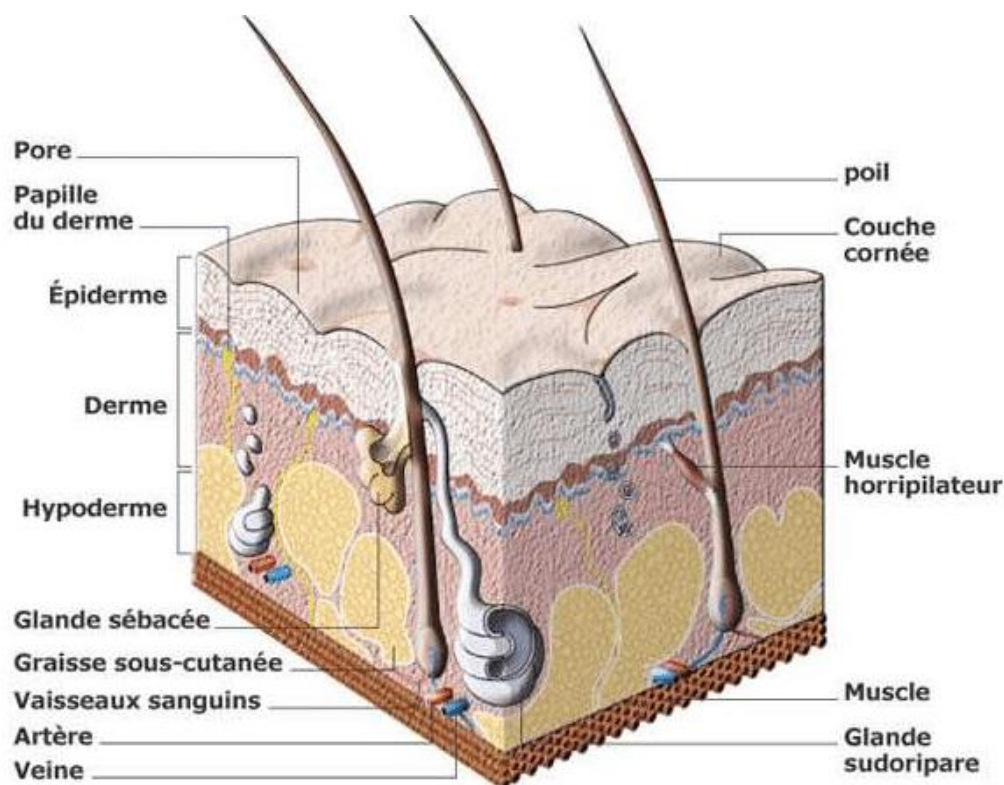


Figure 1. Schéma représentant une coupe de la peau

(Site WEB : www.cnrs.fr)

Les avantages de cette voie d'administration, permet une très bonne réponse immunitaire chez les enfants initialement séronégatifs, et un dosage précis de la dose reçue. Parmi les inconvénients, il y'a exigence de respect des conditions d'hygiène standard pour éviter une infection du site d'injection dont l'injection est assez douloureuse. Enfin cette voie reste difficile à utiliser en campagnes de masse (Denis ; Alain et Poly, 2007)

I.3.2 La vaccination par voie intradermique (ID)

Il s'agit d'une administration immédiatement sous la surface de la peau, à l'imite de l'épiderme et du derme. Utilisée pour faire des tests d'allergie, des tests tuberculiques ou des tests de désensibilisation. (Gharbi, 2016).

Le BCG est le seul vaccin pour lequel on utilise cette voie d'administration. L'injection intradermique du vaccin BCG réduit le risque de lésion neuro-vasculaire chez les nouveau-nés L'injection (0,05 ml chez le nourrisson de moins de 1 an ou 0,1 ml chez les sujets plus âgés) qui est difficile à administrer en raison de la petite taille des bras. Le BCG (bacille de Calmette et Guérin) ou Le vaccin antituberculeux, est dérivé d'un isolat de *Mycobacterium bovis* qui a perdu sa virulence par passages successifs sur des milieux à base de pommes de terre auxquels on ajoute de la bile et de la glycérine (Denis ; Alain et Poly, 2007).

Aussi, le vaccin contre la variole mis au point mort depuis l'éradication de la variole en 1980, et la crainte d'une éventuelle utilisation du virus de la variole par des terroristes a conduit à des propositions de revaccination. Un vaccin vivant qui utilise le virus du vaccin dérivé du virus atténué de la variole de la vache et qui est constitué de deux souches, la souche Lister et la souche NYC BOH. qui sont administrées par voie intradermique à l'aide d'une aiguille bifurquée. **(Denis ; Alain et Poly, 2007).**

Les avantages de cette voie d'administration est qu'elle n'est pas en contact avec le suc gastrique ni elle passe par le foie et peut être utilisée en cas de coma ou d'inconscience de la personne, et peut même être utilisée lors de vomissement. Les inconvénients concernent le risque infectieux important car c'est une voie irréversible en cas d'erreur lors d'utilisation du matériel d'injection non stérile **(Gharbi, 2016).**

I.3.3 La vaccination par voie rectale

Cette voie peut être appropriée pour immuniser contre des agents entéro-pathogènes tels que les rotavirus. Des vaccinations intra-rectales utilisant des souches atténuées ou des antigènes de poliovirus, des peptides VIH/VIS, ou encore des virus grippaux, ont induit des réponses spécifiques locales (intestin) et dans d'autres sites partageant une immunité muqueuse commune **(Neutra et Kozlowski, 2006)**. L'Administration du médicament ce fait dans le rectum (partie terminale du tube digestif), il y aura résorption au niveau des veines hémorroïdales moyennes ce qui permet de diffuser la substance injectée directement dans la circulation supérieure au lieu du premier passage hépatique **(Gharbi, 2016).**

Les avantages de cette technique c'est qu'elle n'engendre pas de nausées, ni de vomissement, elle est facile à faire chez les enfants et les nourrissons et permet d'éviter l'effet de premier passage hépatique. Les inconvénients sont la biodisponibilité variable selon l'individu ; l'irritation des muqueuses rectales ; elle n'est pas utilisable en cas de fissures et il peut y avoir la possibilité de rejet de la substance administrée. **(Gharbi, 2016).**

I.3.4 La vaccination par voie muqueuse

La plupart des agents pathogènes bactériens et viraux infectent leurs hôtes respectifs au travers de la barrière muqueuse des systèmes respiratoire, intestinal et génital. Ainsi, l'induction d'une forte réponse immune à la porte d'entrée à l'encontre de l'agent infectieux semble être la plus appropriée pour prévenir une infection. Par conséquent, la stratégie permettant d'induire une réponse immune protectrice au niveau de la muqueuse est un aspect critique du développement de nouveaux vaccins. Alors que la voie parentérale induit principalement une immunité

cellulaire et humorale, et cela essentiellement au niveau systémique, la voie muqueuse est plus appropriée à stimuler une immunité muqueuse efficace, et même accompagnée d'une réponse immune systémique dans certains cas. Finalement, en évitant l'injection, la voie muqueuse est une méthode non invasive de choix pour la vaccination. **(GOGEV S et al., 2003)**

Les muqueuses de l'hôte constituent la principale voie d'entrée des pathogènes dans l'organisme. Elles représentent de ce fait un site privilégié de stimulation des défenses anti-infectieuses **(Phalipon et Sansonetti, 1998)**.

Le fonctionnement du système immunitaire muqueux (MALT pour mucosa-associated lymphoid tissues) a été très étudié. Celui associé à la muqueuse intestinale (GALT pour gut-associated lymphoid tissues) est le mieux connu **(Hein W.R., 1999)**. Des études récentes ont montré une grande similitude fonctionnelle entre le GALT et le BALT (bronchi-associated lymphoid tissues) **(Brandtzaeg P. et al., 1997)**, tandis que le tractus génital présente des caractéristiques qui lui sont propres **(Mestecky et Fultz, 1999)**. Schématiquement, le GALT est formé de deux compartiments reliés entre eux par les voies hémolymphatiques (figure 2). **(Denis ; Alain et Ploy, 2007)**.

Le premier compartiment, constitué des nodules lymphoïdes intra-muqueux isolés ou associés (on parle alors de plaques de Peyer), forme le site d'induction de la réponse. En fait, les cellules M présentes dans l'épithélium folliculaire qui recouvre le nodule ont pour fonction le transport des antigènes de la lumière intestinale vers le follicule lymphoïde sous-jacent où la réponse immunitaire spécifique est mise en route **(Neutra MR. M., 1999)**. Le second compartiment est formé par les lymphocytes T mûrs et les plasmocytes qui, à la suite de recours à un adjuvant et certaines toxines bactériennes comme la toxine cholérique (CT) ou son homologue la toxine thermolabile (LT) produites par certains *Escherichia coli* pathogènes **(Freytag LC, Clements JD., 1999)**. Sont d'excellents adjuvants muqueux dans les modèles murins. **(Phalipon et Sansonetti, 1998)**.

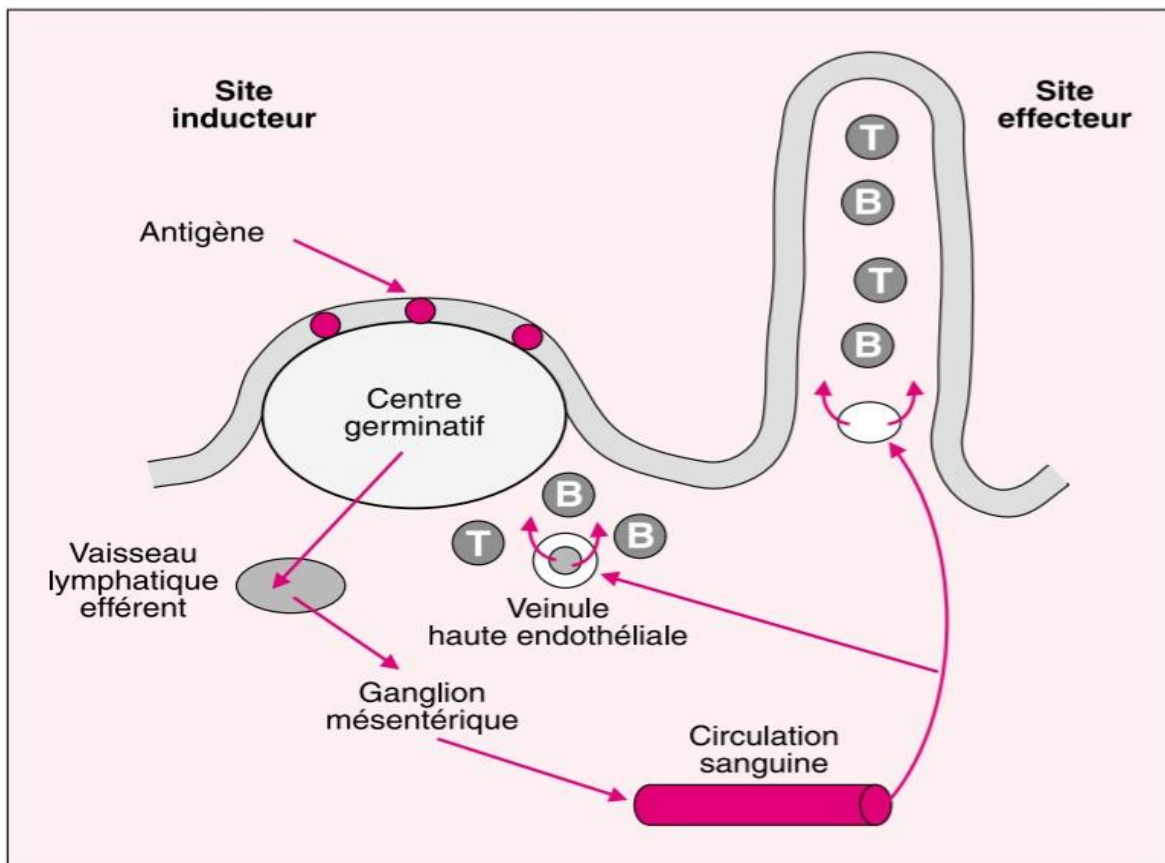


Figure 2. Schéma d'induction des réponses locales au niveau du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (GALT).

Les lymphocytes stimulés après contact avec l'antigène dans le centre germinatif du nodule lymphoïde (site inducteur) migrent via les vaisseaux lymphatiques efférents vers les ganglions mésentériques. Après maturation, ils gagnent la circulation sanguine via le canal thoracique. Ils sont alors préférentiellement domiciliés en tant que cellules mémoires aux sites effecteurs muqueux, lamina propria ou nodule lymphoïde, grâce à l'expression de récepteurs spécifiques (Phalipon et Sansonetti, 1998).

L'avantage de la vaccination par voie muqueuse est l'induction d'une réponse immune à la porte d'entrée des agents pathogènes. Puisque les vaccins administrés seuls par voie muqueuse ont une faible biodisponibilité, ils doivent être Co-administrés avec des substances qui favorisent leur pénétration ou avec des adjuvants (GOGEV S. et al., 2003).

I.3.5 La vaccination par voie orale

C'est la voie la plus utilisée, elle consiste à l'introduction du médicament par la bouche, pour passer à l'estomac puis à l'intestin grêle où se situent les microvillosités de résorption. Une fois absorbé le principe actif est transporté par la veine porte vers le foie avant d'atteindre la circulation systémique. Utiliser pour les vaccins bactériens; surtout les bactéries responsables d'infections entériques; agent du choléra (*Vibrio cholerae*), shigelles, agent de la fièvre typhoïde (*Salmonella typhi*) et d'infections cholériques causées par les *Escherichia coli*

entérotoxinogènes (ETEC), qui ont donné lieu à des recherches ciblant essentiellement trois types d'antigènes : le système d'adhérence ou d'interaction des pathogènes avec l'épithélium intestinal, les entérotoxines ou cytotoxines protéiques, les antigènes somatiques (Ag O) ou éventuellement les antigènes capsulaires (Ag K). Aussi, chez les infections à *E. coli* (ETEC), un vaccin oral proche de celui qui a été développé contre le choléra, il associe des bactéries tuées et la sous-unité B de *V. cholerae* (CTB), et la protection est de l'ordre de 50 % à 67 % (Hill ; Ford et Lallo, 2006 ; Alain et Poly, 2007).

Une ne immunisation par voie orale avec une souche vivante de *Chlamydia trachomatis* a induit une réponse de type IgA au niveau des tractus génital, respiratoire et digestif ; un rappel local au niveau de la muqueuse génitale induit une meilleure réponse qu'un rappel administré par voie orale (Cui et al., 1991 ; Alain et Poly, 2007).

Les vaccinations orales présentent plusieurs avantages. Elles sont faciles à utiliser, mieux tolérées et plus facilement acceptées. De plus, les erreurs économiques et réversibles et le risque d'infection sont également très faibles. La possibilité d'un lavage gastrique en cas d'intoxication

En revanche, il présente de nombreux inconvénients, à savoir la possibilité de modifier le PA au contact des sécrétions du tube digestif, qui contiennent des enzymes ou des bactéries dégradantes : Par exemple : L'insuline est dégradée par la peptidase, l'héparine est dégradée par l'hydrolase, et les problèmes de goût des médicaments (goût et odorat) et ne peuvent être utilisées en cas de vomissements ou de coma. Et la voie orale est propice à l'automédication. Il existe également certains patients (sujets âgés...) qui ont des difficultés à avaler et des différences individuelles de pH, ainsi que des interactions avec des aliments ou d'autres médicaments. Dépassement du premier passage hépatique (biodisponibilité variable).

II. Utilisation des bactéries lactiques en vaccination

II.1 Généralité sur les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques (BL) constituent un groupe de bactéries gram-positives unies par une constellation de caractéristiques morphologiques et physiologiques. Les BL sont largement utilisées dans des procédés industriels de fermentation agroalimentaire et certains genres comme les *Lactobacilles* ou les *bifidobactéries* sont des bactéries commensales qui font partie du microbiote intestinal (**Mater et Corthier., 2004**). Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* (**Stackebrandt et Teuber, 1988**).

Les BL sont généralement reconnues comme étant sans danger par les autorités sanitaires du monde entier (microorganismes considérés comme GRAS « Generally Recognized As Safe ») (**Gilliland, 1990**). 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) (**Ljungh et Wadström, 2006**).

Les bactéries de l'acide lactique, bien que constituées d'un certain nombre de genres divers, sont regroupées sous forme d'homofémenteurs ou d'hétérofémenteurs en fonction du produit final de leur fermentation. Les lactiques homofémenteurs comprennent les genres *Streptococcus* et *Pediococcus*. *Streptococcus* produit du lactate L (+) et *Pediococcus* produit du lactate DL. Les lactiques hétérofémentaires se composent du genre *Leuconostoc* et d'un sous-groupe du genre *Lactobacillus*, les *Betabacteria*. Les *leuconostocs* produisent du D (-) lactate ; Les *bétabactéries* produisent du lactate DL (**Frank et al., 2002**).

En plus, la sélection du type de bactérie lactique est faite en fonction des caractéristiques enzymatiques qui dictent le goût, la saveur, la texture ainsi que la vitesse de fermentation (**Mierau et al., 1997 ; Smit et al., 2005**). D'ailleurs, les produits dérivés de fermentation comme l'aldéhyde et le diacétyl, les produits de la protéolyse de la caséine par les protéases bactériennes ainsi que les exopolysaccharides permettent la fabrication de produits laitiers fermentés aux propriétés recherchées (**Mierau et al., 1997 ; Geis, 2005 ; Smit et al., 2009**)

II.2 Lactococcus lactis :

L. lactis fut la première bactérie à être isolée en culture pure par Joseph Lister en 1873 (**Lister, 1878**). Jusqu'en 1985, cette bactérie portait le nom de *Streptococcus lactis* (**Schliefer et al., 1985**). Morphologiquement, elle a l'aspect d'une coque de 0,5 à 1,5 µm de diamètre qui s'organise en paire ou en courte chaînette. Sa température optimale de croissance est de 30°C.

De plus, *L. lactis* est une bactérie anaérobie aérotole'érante puisqu'elle n'utilise pas l'oxygène naturellement comme accepteur final d'électron. Toutefois, elle peut utiliser la respiration aérobie en présence d'hème (**Duwat et al., 2001**).

L. lactis est divisé en quatre sous-espèces (ssp.) (*cremoris*, *hordniae*, *lactis* et *tractae*) où seulement les sous-espèces *cremoris* et *lactis* sont utilisées par l'industrie laitière (**Latorre-Guzman et al., 1977; Schliefer et al., 1985; Pérez et al., 2011; Von Wright, 2012**). La sous-espèce *lactis* est fréquemment utilisée dans la production de certains fromages frais (**Jamet, 2009**) alors que la ssp. *cremosis* est davantage utilisée dans la fabrication de cheddar (**Vedamuthu et al., 1966**). Ces deux sous-espèces sont très similaires au niveau génétique (Identité >99% pour ARN16S et les gènes conservés *rpoB* et *recA*), mais peuvent être distinguées par des caractéristiques métaboliques spécifiques. En effet, la ssp. *cremoris* se distingue de *lactis* par son incapacité à croître à 40°C, sa croissance en présence de 4% NaCl ainsi que son aptitude à hydrolyser l'arginine (**Holt et al., 1994; Von Wright, 2012;**).

II.3 Lactococcus lactis comme vecteur vivant à administrations muqueuses :

Les études sur les bactéries lactiques en tant que vecteurs de délivrance se sont principalement basés sur le développement de vaccins muqueux, avec beaucoup d'efforts consacrés à la génération d'outils génétiques pour l'expression d'antigènes dans différentes localisations bactériennes. Les bactéries lactiques ont également été utilisés comme système de délivrance pour une gamme de molécules qui ont différentes applications, y compris les anti-infectieux, les thérapies pour les maladies allergiques et les thérapies pour les maladies gastro-intestinales. (**Lichtor et Glick, 2012**).

Une question importante à résoudre est celle de la nécessité éventuelle d'une colonisation par ces bactéries pour induire une réponse immune. Certains systèmes génétiques ont récemment été développés pour les bactéries telles que *Streptococcus gordonii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *staphylococcus xylosus*, *staphylococcus carnosus* et, dans certains cas, une

bonne réponse immune a pu être obtenue contre un antigène modèle chez la souris : les **vaccins** recombinants vivant ; multivalents et vaccins ADN (**Robinson et coll., 1997**).

Lactococcus lactis est une bactérie à Gram-positif en forme de coque ovoïde. *L. lactis* acidifie les milieux dans lesquels elle se développe et peut synthétiser des bactériocines (**Siegers et Entian., 1995**). 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 (**Nouaille et al., 2003**).

De plus, les génomes des souches *L. lactis subsp. lactis* IL1403 et *L. lactis cremoris* MG1363 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. (**Bermudez et al., 2004**).

La bactérie *Lactococcus lactis* (LL) a été largement étudiée et manipulée ces dernières années pour la production de protéines hétérologues telles que plusieurs antigènes d'origine virale ou bactérienne, ainsi que des molécules biologiquement actives (cytokines, hormones, etc.) (**Bermudez et al., 2004**). *L. lactis* a été aussi largement exploitée en tant qu'usine cellulaire pour la production de nombreuses protéines d'intérêt pour la santé comme des antigènes en vue de développer de nouveaux vaccins. Il a été montré plus récemment que cette bactérie a la capacité de transférer des vaccins à ADN aux surfaces muqueuses (**Miyoshi et Azevedo, 2004 ; Wells et Mercenier, 2008 ; Chatel et al., 2008**) (**Mercela Azevedo., 2013**).

L'utilisation de *Lactococcus lactis* (LL) comme vecteur d'ADN est très intéressant par rapport à l'utilisation de bactéries pathogènes atténuées du fait de leur qualité GRAS (**wells et Mercenier, 2008**). En effet, **Guimaraes et al (2006)** ont montré que la souche sauvage (Wt) de LL pouvait transférer des vaccins à ADN in vitro. Plus tard, **chatel et al (2008)** ont montré que cette bactérie était capable de transférer de l'ADN plasmidique in vivo à des cellules épithéliales intestinales de souris (IECs). Même si la capacité des lactocoques à transférer des vaccins à ADN est confirmée, le mécanisme par lequel LL peut transférer de l'ADN à des cellules eucaryotes in vivo demeure obscure (**Mercela Azevedo., 2013**).

En vaccin viraux comme le coronavirus ; l'induction de l'immunité muqueuse peut être importante pour prévenir les infections par le SARS-CoV. Pour une administration sûre et efficace d'antigènes viraux au système immunitaire muqueux, un nouveau système d'affichage d'antigènes de surface pour les bactéries lactiques a été développé en utilisant la protéine poly-

gamma-acide glutamique synthétase A (PgsA) de *Bacillus subtilis* comme matrice d'ancrage. En effet, **Lee et al. (2006)**, indiquent que l'immunisation muqueuse avec *L. casei* recombinante exprimant la protéine de coronavirus S associée au SARS sur sa surface fournit un moyen efficace pour déclencher une réponse immunitaire protectrice contre le virus (**Lee et al., 2006**).

Aujourd'hui, de nombreuses études justifient l'utilisation des souches recombinantes de *L. lactis* pour induire une réponse immunitaire à la fois muqueuse et systémique. En effet, 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 mutants (**Iwaki et al., 1990**).

Toutefois, **Wells et al. (1993)** ; 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 létal 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 (**Wells et al., 1993 ; Robinson et al., 1997**).

Plusieurs autres études ont été menées après ces travaux pour analyser l'expression de nombreuses protéines hétérologues d'origine virale, bactérienne ou eucaryote chez *L. lactis* et qui ont été évaluée dans certains cas dans des modèles animaux avec des résultats très prometteurs (**Bermudez-Humaran et al., 2004**)

II.4 Les vecteurs d'expression.

Les chercheurs ont 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) (**Le Loir et al., 1996**). 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 PnisA.

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 (figure 3). 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* (van Asseldonk et al., 1993). Ainsi, le PS de cette protéine a été utilisé pour exporter de nombreuses protéines hétérologues chez *L. lactis* (Le Loir et al., 2005). (Bouasria Benbouziane, 2014).

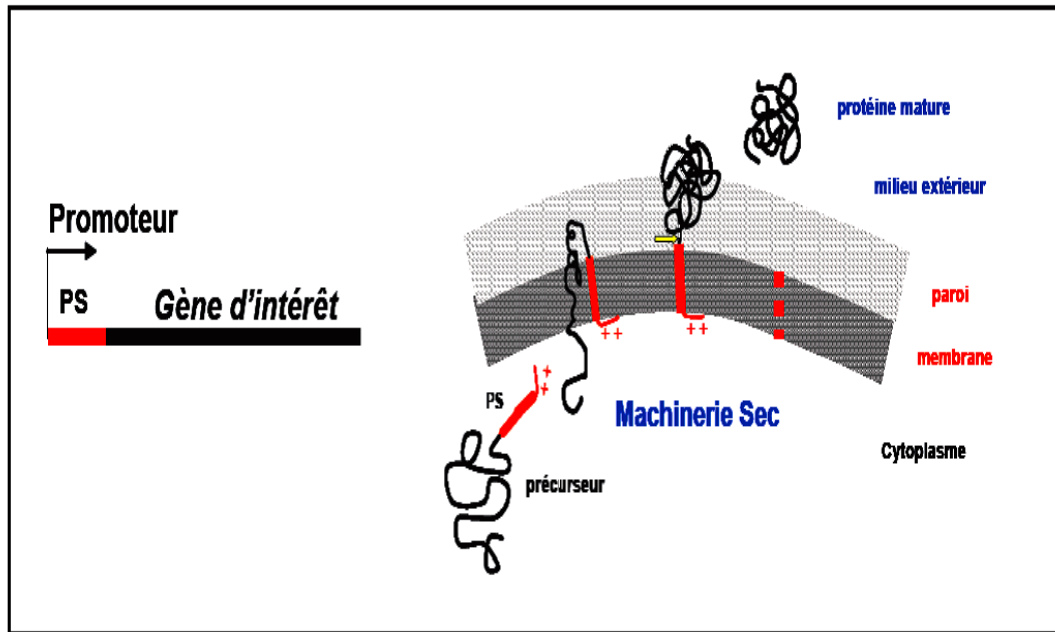


Figure 3. Sécrétion d'une protéine d'intérêt (Van Asseldonk et al., 1993).

pCWA : Pour obtenir une protéine ancrée à la paroi de la bactérie, le gène d'intérêt est fusionné au PSUsp45 et au domaine d'ancrage de la protéine M6 de *Streptococcus pyogenes* (CWAM6) (figure 4). Ce domaine contient les signaux nécessaires pour un ancrage à la paroi (Piard et al., 1997)

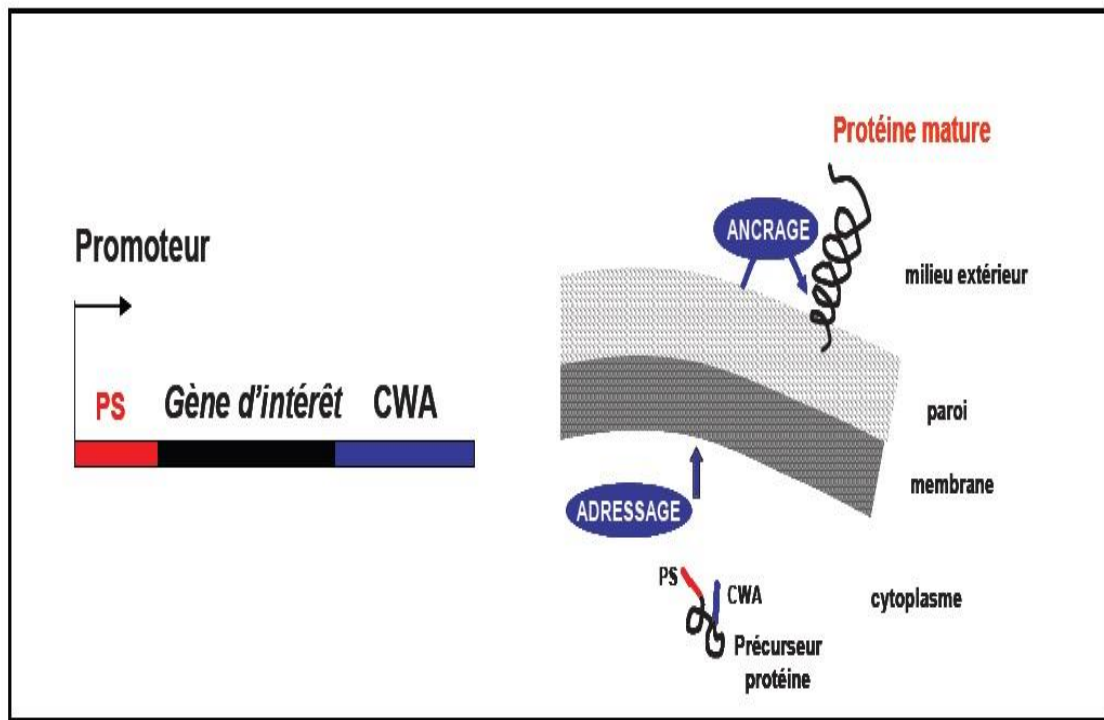


Figure 4. Ancrage d'une protéine d'intérêt à la paroi bactérienne (Piard et al., 1997).

Ces vecteurs, fonctionnels dans un large spectre de BL, sont utilisés en routine au sein de notre laboratoire partenaire (Institut MICALIS, Jouy-en-Josas) pour la production d'une quarantaine de protéines hétérologues chez *L. lactis*. Plus récemment, ce laboratoire a développé différents systèmes d'expression basés sur des promoteurs inductibles aux sels biliaires qui constituent une bonne alternative au promoteur inductible à la nisine. (Bouasria Benbouziane, 2014).

III. Le Transfert horizontal

III.1. Définition :

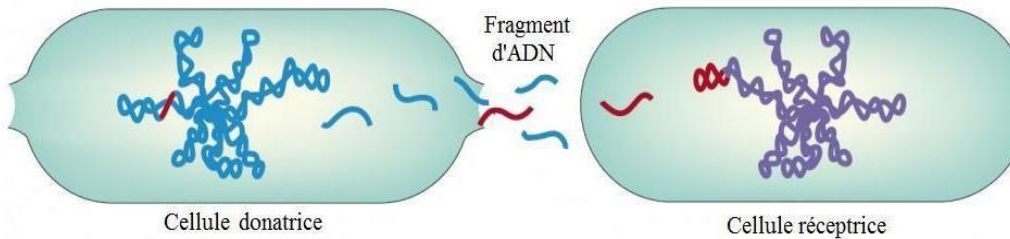
Le transfert horizontal est un mécanisme clé de l'évolution bactérienne. Il s'agit d'un processus par lequel une bactérie (dite réceptrice) intègre un fragment d'ADN provenant d'une autre bactérie (dite donatrice) qui n'est pas son ascendant et qui en est plus ou moins éloignée phylogénétiquement. Ce phénomène peut conduire à l'acquisition de gènes et donc de nouvelles fonctions chez la bactérie réceptrice. Trois étapes sont indispensables : l'entrée de l'ADN, l'intégration dans le génome et sa transmission à la descendance et enfin, le succès évolutif de ces cellules ; c'est-à-dire leur multiplication de façon plus importante que les cellules ne l'ayant pas reçu. **(Yoann Perrin, 2014).**

III.1.1. Les différents mécanismes du transfert horizontal :

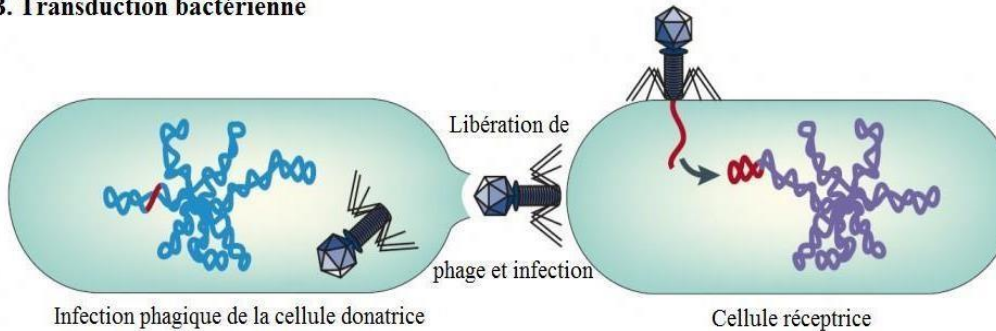
Il existe trois mécanismes principaux qui permettent le transfert de molécules d'ADN **(Furuya et Lowy, 2006)**. La transformation, tout d'abord, correspond à la pénétration intracellulaire d'un fragment d'ADN exogène libre dans l'environnement et son intégration dans le génome de la bactérie réceptrice. Ce mécanisme nécessite l'expression de gènes de compétence de la cellule réceptrice suite à des signaux environnementaux (figure 5A). Le deuxième mécanisme est la transduction. Il s'agit du transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire d'un bactériophage (vecteur viral) (figure 5B). Enfin, le dernier des trois mécanismes est la conjugaison. Elle correspond à un transfert d'ADN unidirectionnel qui nécessite un contact entre les deux cellules (figure 5C).

Afin que le transfert horizontal soit observé, l'ADN acquis doit se maintenir dans la cellule réceptrice ainsi que chez sa descendance. Il peut rester sous forme

A. Transformation bactérienne



B. Transduction bactérienne



C. Conjugaison bactérienne

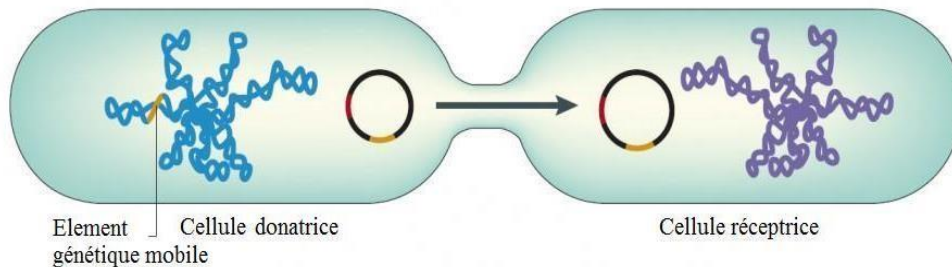


Figure 5. Schéma des trois principaux mécanismes de transfert horizontal.
(D'après *Furuya et Lowy, 2006*)

La transformation bactérienne est possible lorsque des fragments d'ADN sont libérés par la lyse d'une cellule et sont captés par une cellule réceptrice avant intégration dans son génome.

A. La transduction bactérienne correspond au transfert d'ADN d'une cellule à une autre par l'intermédiaire d'une particule virale porteuse d'ADN bactérien et dite transductrice. L'acquisition de l'ADN est donc possible grâce à l'infection de la cellule réceptrice par cette particule transductrice.

B. La conjugaison bactérienne est un transfert d'information génétique lors d'un contact physique direct entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice. Durant ce transfert, l'ADN va se répliquer par cercle roulant. Ainsi, la cellule donatrice conserve toujours l'élément génétique malgré son transfert vers la cellule réceptrice. extrachromosomique (plasmide) ou s'intégrer dans l'ADN génomique (recombinaison homologue, illégitime ou spécifique de site). Dans ce dernier cas, il sera transmis grâce à la réplication et la ségrégation

chromosomique de l'hôte ; un plasmide quant à lui code pour ses propres fonctions de réplication et de partition. (Yoann Perrin, 2014).

III.1.2. L'état de compétence chez les bactéries :

Le système Opp est présent chez la plu-part des bactéries et, chez les bactéries à Gram positif, il intervient également dans le mécanisme général de la signalisation par les peptides (ou phéromones) de type quorum sensing. Opp est impliqué dans les processus de sporulation et compétence. Le système Opp a été caractérisé chez plusieurs bactéries comme *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *L. lactis*. C'est un transporteur ABC (ATP-Binding Cassette) constitué de cinq protéines. Une protéine affine lie les oligopeptides substrats : OppA (périplasmique chez les bactéries à Gram négatif, lipoprotéine attachée à la membrane chez les bactéries à Gram positif). Deux protéines transmembranaires OppB et OppC constituent la perméase du système. Enfin, deux protéines liant l'ATP, OppD et OppF, fournissent l'énergie au système par hydrolyse de l'ATP. Les gènes codant pour les protéines du système Opp sont organisés en opéron et leur ordre est assez bien conservé, le gène oppA étant situé en amont des autres gènes du complexe. Chez *L. lactis*, l'ordre des gènes de l'opéron se différencie du cas général puisque le gène oppA est situé en aval de l'opéron opp (Tynkkynen S. et al., 1993) La protéine OppA est par ailleurs généralement décrite comme le déterminant de la spécificité du système Opp. Entre *S. typhimurium* et *L. lactis*, les protéines OppA présentent un faible pourcentage d'identité (de l'ordre de 21 %) et leur spécificité de substrat est très différente. OppA de *S. typhimurium* est capable de fixer des di- et tripeptides quelle que soit leur séquence avec une affinité maximale pour les tripeptides (Rostom A.A. et al., 2000 ; Tame J.R.H. et al., 1995). Tandis que OppA de *L. lactis* ne fixe aucun di- ni tri-peptide (Juillard V. et al., 1998 ; Kunji E.R.S. et al., 1993).

III.1.2.1. Le transport des oligo-peptides chez *L. lactis* :

Spécificité du système Opp chez *L. lactis* MG1363, Le système de transport Opp de *L. lactis* a été caractérisé génétiquement la première fois par l'équipe de (Tynkkynen S. et al., 1993) chez la souche MG1363. L'inactivation du gène oppA (Lanfermeijer F.C. et al., 1999, Tynkkynen S. et al., 1993) a permis de mettre en évidence que Opp, chez MG1363, est le seul système impliqué dans le transport des oligopeptides supérieur à trois résidus, ceci malgré la présence dans le génome de cette souche d'autres opérons codant pour des transporteurs de peptides putatifs (Buist G. et al., 2002).

Le modèle de fonctionnement du système Opp, établi par Lanfermeijer et al. décompose le transport de peptides en quatre étapes : I, fixation réversible du ligand à la protéine affine OppA (dans sa forme ouverte) ; II, changement de conformation de la protéine OppA

permettant la capture du peptide (forme OppA fermée) ; III, rapprochement de la protéine OppA.

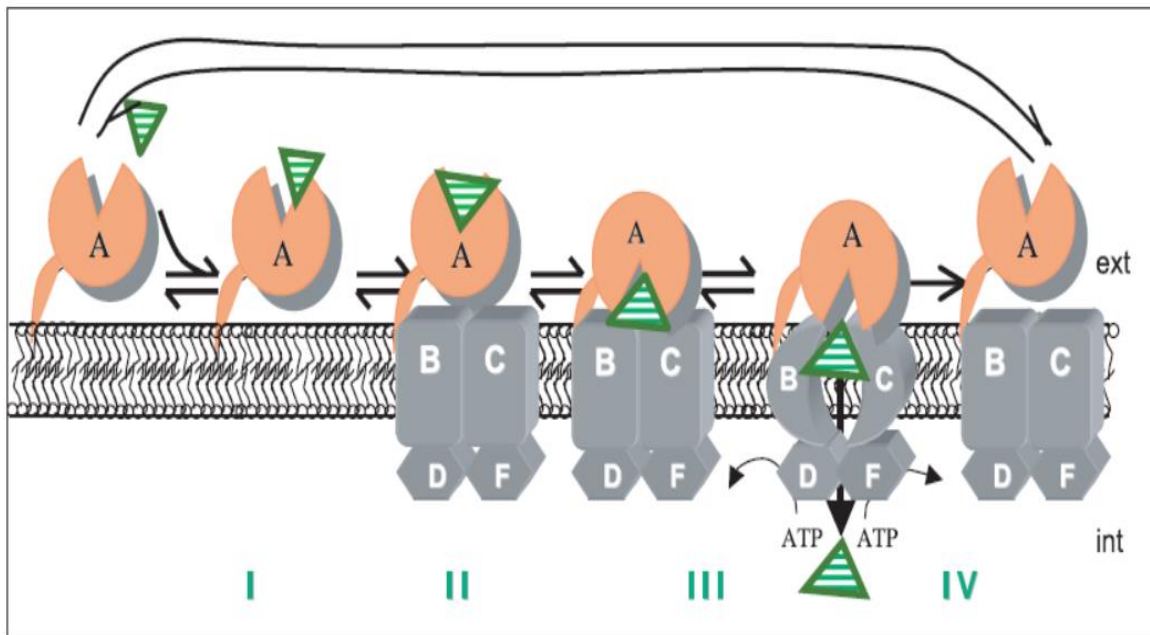


Figure 6. Mécanisme général du transport des oligopeptides par Opp (adapté de **Lanfermeijer F.C. et al., 1999**). La protéine OppA est la protéine affine fixant le peptide. Les protéines OppB et OppC forment le canal transmembranaire. Les protéines OppD et OppF sont les ATPases du système. Les quatre étapes décomposant le transport d'un peptide (symbolisé par un triangle hachuré) sont indiquées par les chiffres I à IV.

Liée au substrat vers le complexe perméase OppBC, changement de conformation du complexe perméase ; IV, translocation du substrat à travers la membrane (Figure 6). Dans ce modèle, la protéine affine joue un double rôle : elle permet la présentation du substrat au reste du transporteur et en étant fortement liée au translocon lors de cette étape (étape III), elle permet la stabilisation du transporteur dans un état catalytique dit de transition (**Davidson A.L., 2002**). Dans cette conformation, les deux sous-unités fixant l'ATP se rapprochent afin de compléter les sites de fixation de l'ATP. Le substrat est transféré de façon irréversible de la protéine affine vers le canal transmembranaire jusqu'à atteindre le cytoplasme même si les ATPa-ses sont toujours engagées. Une fois l'hydrolyse de l'ATP accomplie et la libération du substrat dans le cytoplasme, le transporteur retourne dans son état initial et la protéine affine s'éloigne du complexe. Des expériences de transport de peptides par Opp ont montré que *L. lactis* MG1363 est capable de transporter in vitro des oligopeptides jusqu'à 18 résidus de longueur (**Detmers F.J.M. et al., 1998**). Les peptides basiques hydro-phobes, de taille comprise entre 600 et 1100 g.mol⁻¹ sont préférentiellement utilisés (**Juillard V. et al., 1998**).

Des cinq protéines du système Opp, OppA est décrite comme le récepteur initial de l'oligopeptide-substrat et donc le premier acteur de la spécificité de substrat du transporteur. L'affinité d'OppA pour ses substrats a été étudiée, chez *L. lactis* MG1363, via sa reconstitution

dans des protéoliposomes (Detmers F.J.M. et al., 2000). Une banque combinatoire de peptides a ensuite été testée et a permis d'établir ou confirmer certaines règles d'affinité :

- Il existe une relation entre l'affinité pour le substrat et sa taille : plus le peptide est long, plus l'affinité OppA/peptide est importante avec une affinité maximale pour les nonapeptides (Lanfermeijer F.C. et al., 1999). La capacité de fixation peut s'étendre jusqu'à 35 résidus (Detmers F.J.M. et al., 2000).

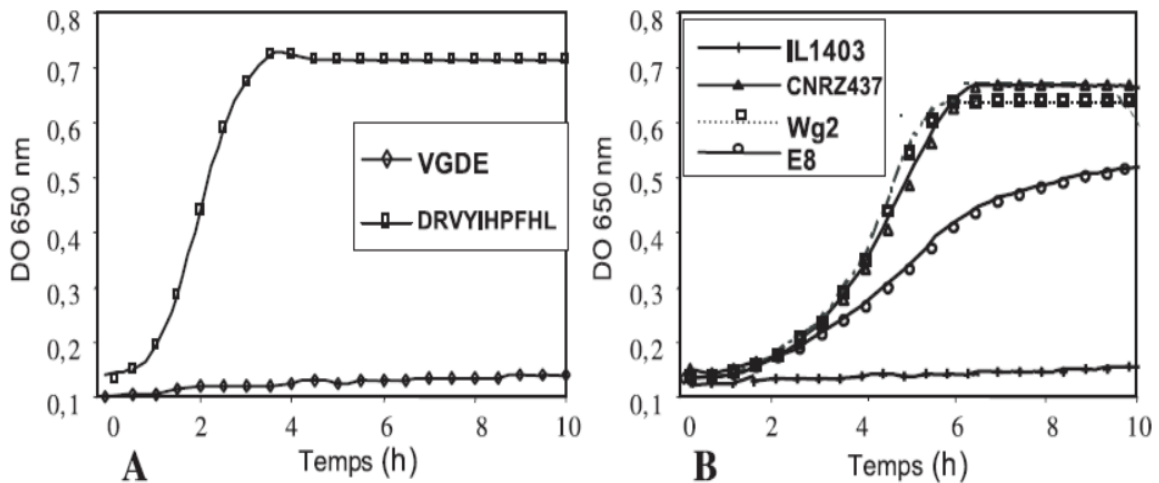


Figure 7. Aptitude des souches sauvages de *L. lactis* à se développer en présence de peptides sources d'acide aminé essentiel. (Adapté de Charbonnel P. et al., 2003).

Les peptides DRVYIHPFHL et VGDE sont respectivement sources d'histidine et de valine. A : Croissance de *L. lactis* MG1363 en présence des peptides DRVYIHPFHL et VGDE. B : Croissance des souches de *L. lactis* CNRZ437, Wg2, IL1403 et E8 pour le peptide DRVYIHPFHL.

- Les six premiers résidus du peptide pénètrent dans la protéine OppA, les autres interagissent de façon aspécifique sur la surface d'OppA en fonction de leur nature (Detmers F.J.M. et al., 2000).
- La spécificité serait imposée principalement par les quatrième, cinquième et sixième résidus du peptide.

Le fait de surproduire OppA à la surface des cellules bactériennes (Picon A. et al., 2000) augmente la capacité d'OppA à lier un peptide donné mais n'augmente pas celle du transport sensu-stricto. L'étape limitante du transport d'un peptide n'est donc pas sa fixation sur OppA mais plus vraisemblablement son transfert vers le complexe transmembranaire OppBC (étapes III-IV du modèle Figure 7).

III.2. Caractéristiques des éléments Intégratifs et Conjugatifs :

III. 2.1. Caractéristiques des éléments génétiques mobiles, cas des ICE

Les événements de transferts horizontaux impliquent fréquemment des éléments génétiques mobiles. Ce sont des fragments d'ADN portant un ensemble de gènes leur permettant de se déplacer dans un même génome ainsi que d'être transféré d'une cellule à une autre (**Bellanger et al., 2013**). Ils diffèrent du génome de l'hôte par leur pourcentage en G+C, un biais compositionnel en GC (« GC-skew ») et un usage de codons différent de celle du génome hôte (**Hacker et Carniel, 2001**). Ces caractéristiques permettent de conclure à une acquisition par transfert horizontal des éléments génétiques mobiles.

Ces éléments peuvent conférer un avantage sélectif à leur hôte dans un environnement donné (**Wozniak et Waldor, 2010**). Ainsi, l'élément *clc* de *Pseudomonas* sp. confère diverses fonctions cataboliques (**Gaillard et al., 2006**). L'îlot de pathogénicité ICEHin1056a permis l'émergence de souches multi-résistantes d'*Haemophilus influenzae*, bactérie responsable de diverses pathologies (**Dimopoulou et al., 2007**). L'élément de symbiose R7A de *Mesorhizobium loti* porte tous les gènes impliqués dans la symbiose et dans la fixation d'azote (**Ramsay et al., 2006**).

Parmi ces éléments, certains sont capables de coder les fonctions nécessaires à leur excision sous forme circulaire libre dans l'organisme donneur, leur transfert par conjugaison puis leur intégration dans le génome de la bactérie réceptrice (figure 8). Ces îlots sont appelés Eléments Intégratifs et Conjugatifs (ICE). La fixation d'une intégrase sur ces séquences va permettre une recombinaison, dite « site spécifique », et entraîner l'excision ou l'intégration génomique de l'ICE (**Bellanger et al., 2011**). L'ensemble des gènes essentiels à la mobilité des ICE sont regroupés sous forme de modules, c'est-à-dire en groupes de gènes et de séquences conférant une même fonction. Ainsi, on peut identifier chez les ICE des modules de recombinaison, de conjugaison et de régulation.

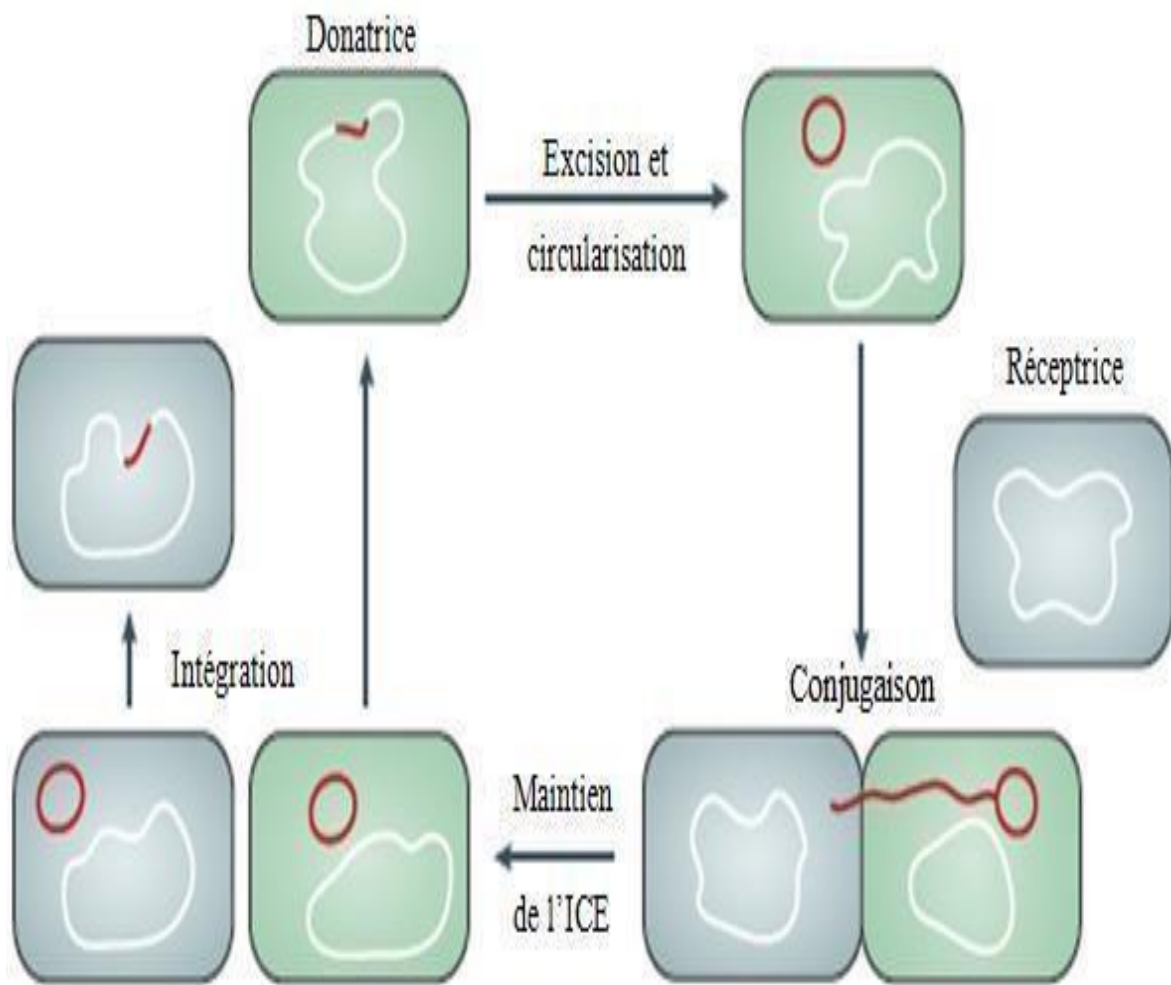


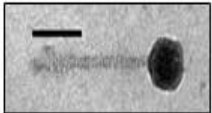
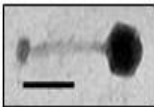
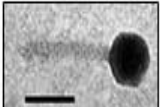
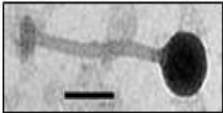
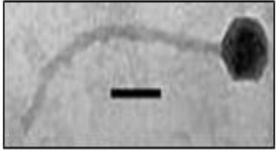




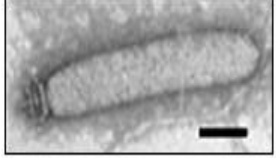
Figure 8. Schéma de la propagation d'un ICE entre deux cellules. (D'après **Wozniak et Waldor, 2010**).

Un ICE est intégré dans le chromosome de la cellule donatrice (cellule verte), il s'excise et se circularise par recombinaison site-spécifique. Ainsi, l'ICE se transfère par conjugaison dans une cellule ne le possédant pas. Il est nécessaire d'avoir un contact physique entre la cellule donatrice (verte) et la cellule réceptrice (grise). Un brin d'ADN de l'ICE se forme par réplication de type cercle roulante est transféré dans la majorité des cas simultanément dans la cellule réceptrice. L'ADN simple brin de l'élément se circularise puis le brin complémentaire est obtenu grâce à la machinerie de l'hôte. La recombinaison site-spécifique permet l'intégration de l'ICE dans le chromosome de son nouvel hôte et dans celui de la cellule donatrice. (**Yoann Perrin, 2014**).

III.3. Les Lactophages :

Dans l'industrie de la transformation laitière, les mêmes souches bactériennes de choix sont constamment utilisées afin de maximiser les rendements de l'entreprise et la fidélité des consommateurs. Depuis quelques décennies, l'utilisation massive de ces bactéries a conduit à l'émergence de nouveaux phages qui infectent spécifiquement ces souches d'intérêt (**Rousseau et Moineau, 2009**). Leur incidence sur les rendements et la qualité des fromages constitue la raison principale pour expliquer l'intérêt marqué des chercheurs pour les phages reliés au domaine laitier. Uniquement dans le laboratoire du Prof. Sylvain Moineau, plus de 125 nouveaux phages de lactocoques en provenance de l'industrie laitière québécoise ont été isolés depuis 15 ans. (**Maxime Bélanger, 2014**). Les phages de *Lactococcus lactis* ont tous une queue non contractile et la majorité d'entre eux appartiennent à la famille des Siphoviridae. La classification actuelle subdivise les lactophages en 10 groupes génétiques distincts (tableau 4) (**Deveau et al., 2006**). Parmi eux, les groupes 936, c2 et P335 sont, en ordre d'importance, les plus souvent associés à des problèmes de fermentation dans plusieurs pays du monde (**Rousseau et Moineau, 2009**). (**Maxime Bélanger, 2014**).

Tableau 4. Classification des groupes de lactophages. Adaptée de (Deveau et al., 2006).

Espèce	Phage	Capside		Queue		Microscopie électronique
		Diamètre		Longueur	Diamètre	
		(nm)		(nm)	(nm)	
<i>Siphoviridae</i>						
936	bIL170	45		125	11	
P335	ul36	40 - 45		120 - 140	11	
1358	1358	45		94	10	
P087	P087	55		168	16	
1706	1706	55		251	15	
949	949	60		472	14	
c2	C2	45X30		96	10	
Q54	Q54	50X35		114	12	
<i>Podoviridae</i>						
P034	P369	50X35		26	10	
KSY1	KSY1	232X43		35	5	

La barre représente 50 nm.

Une méthode de type multiplex PCR ciblant des gènes conservés est disponible et permet de classer rapidement les nouveaux phages à l'intérieur d'un de ces trois groupes prédominants (**Labrie et Moineau, 2000**). L'évaluation de l'incidence et de la variabilité des populations phagiques lors de fermentation industrielle constitue le premier pas dans le contrôle de ces contaminants. L'étude plus approfondie des phages les plus problématiques, tel ceux du groupe des 936, a d'ailleurs permis de développer des modèles de recherche et des outils de détection efficaces pour contrer les phages dans cette industrie.

Chez le groupe 936, certains phages sont bien caractérisés et constituent des modèles d'études : p2 (**Sciara et al., 2010**), P008 (**Loof et al., 1983**), sk1 (**Chandry et al., 1997**) et bIL170 (**Labrie et Moineau, 2000 ; Crutz-Le Coq et al., 2002 ; Dupont et al., 2005**). Les phages 936 possèdent une capsidie icosaédrique et une queue non contractile (*Siphoviridae*), leur génome variant entre 25 et 40 kpb (**Brøndsted et Hammer, 2006**). Le nombre total de phages de type 936 dont le génome a été séquencé s'élève aujourd'hui à 52 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Récemment développée dans le laboratoire du Prof. S. Moineau, une nouvelle méthode MLST (« Multilocus Sequence Typing ») permet la différenciation des phages 936 par comparaison de séquence nucléotidique de cinq gènes conservés (**Moisan et Moineau, 2012**). Tel que démontré à la figure 1.4., les phages 936 forment un groupe génétiquement homogène. Un génome-cœur composé de 33 gènes a été identifié et est constitué majoritairement de gènes codant pour des protéines structurales. Au contraire, les produits de gènes précoces sont en générales peu conservés entre les phages (**Rousseau et Moineau, 2009**). (**Maxime Bélanger, 2014**).

III.4. Bactéries Recombinantes :

Une bactérie qui peut produire différents antigènes permettant le développement de vaccins multivalents. 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 (**Bermúdez-Humarán et al., 2004a**). 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. (**Bouasria Benbouziane, 2014**).

III.4.1. 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) (Castellsagué., 2008).

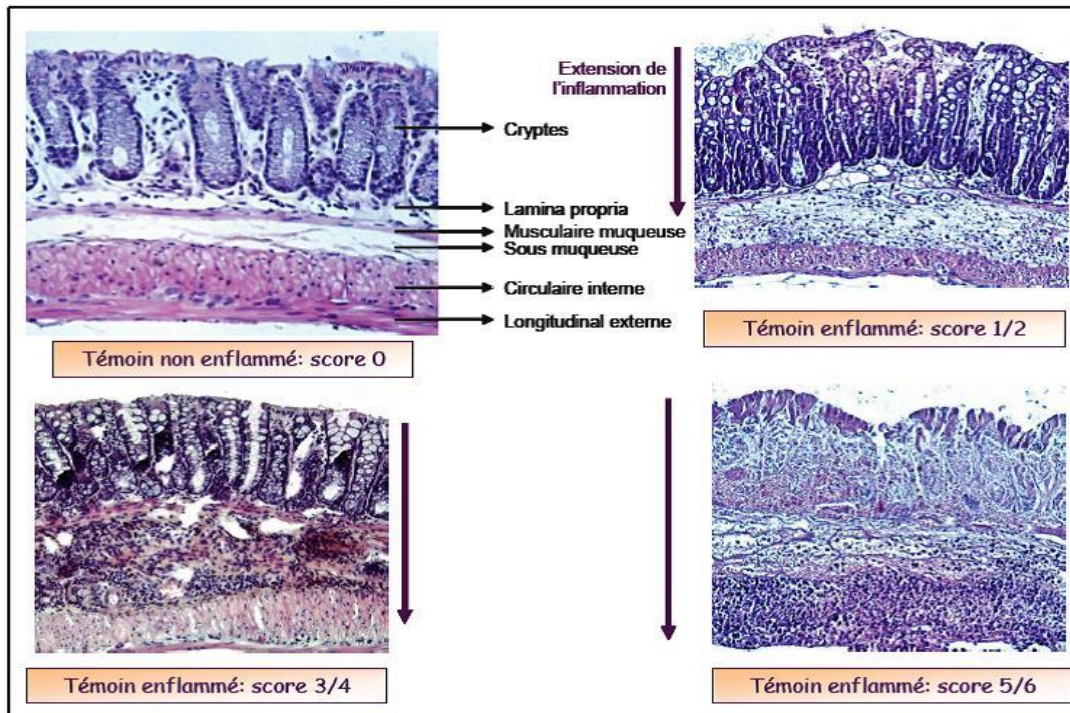


Figure 9. Coupe histologique de muqueuses murines enflammées ou non avec du TNBS et évaluées selon le score histologique (Ameho et al., 1997).

L'HPV-16 fait partie de la famille des *papovaviridae*. Son génome est constitué d'environ 8000 pbs, sa capside de forme icosaédrique est formée à partir de deux protomères L1 et L2 qui s'associent en 72 capsomères (douze pentons et soixante hexons). Ce virus est dépourvu d'enveloppe et sa taille est de l'ordre de 50 nm (figure. 10).

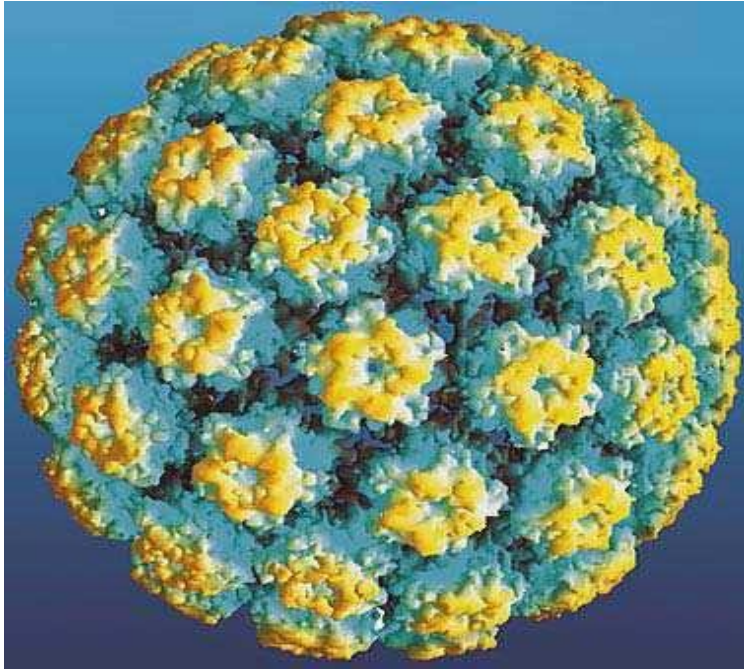


Figure 10. Structure de la capside de l'HPV-16 (Smotkin et Wettstein, 1986).

L'Ag E7 est exprimé depuis les cellules eucaryotes infectées par l'HPV-16 et contribue ainsi au développement du phénotype malin. L'Ag E7 est une phosphoprotéine composée de 98 acides aminés, de masse moléculaire 19 KDa et dépourvue d'activité enzymatique (Smotkin et Wettstein, 1986).

Cette phosphoprotéine possède un domaine de liaison au zinc à l'extrémité COOH terminale impliqué dans la stabilité de la protéine. Du côté NH₂ terminal, on retrouve une petite région analogue à celle de la protéine E1A des adénovirus et de l'Ag T des polyomavirus, impliquée dans la perturbation du cycle cellulaire.

C'est ainsi, que l'Ag E7 interagit avec plusieurs composants cellulaires et notamment des protéines suppresseurs de tumeur telles que Rb (protéine du retinoblastome), dérégulant ainsi le cycle cellulaire des cellules épithéliales et provoquant leur multiplication anarchique (figure 11) (Baker *et al.*, 1987 ; Dyson *et al.*, 1989 ; Tanaka *et al.*, 1989 ; Zwerschke and Jansen-Durr, 2000). C'est à travers ce processus que la protéine E7 participe à la prolifération et à l'immortalisation de la cellule infectée induisant le développement du cancer.

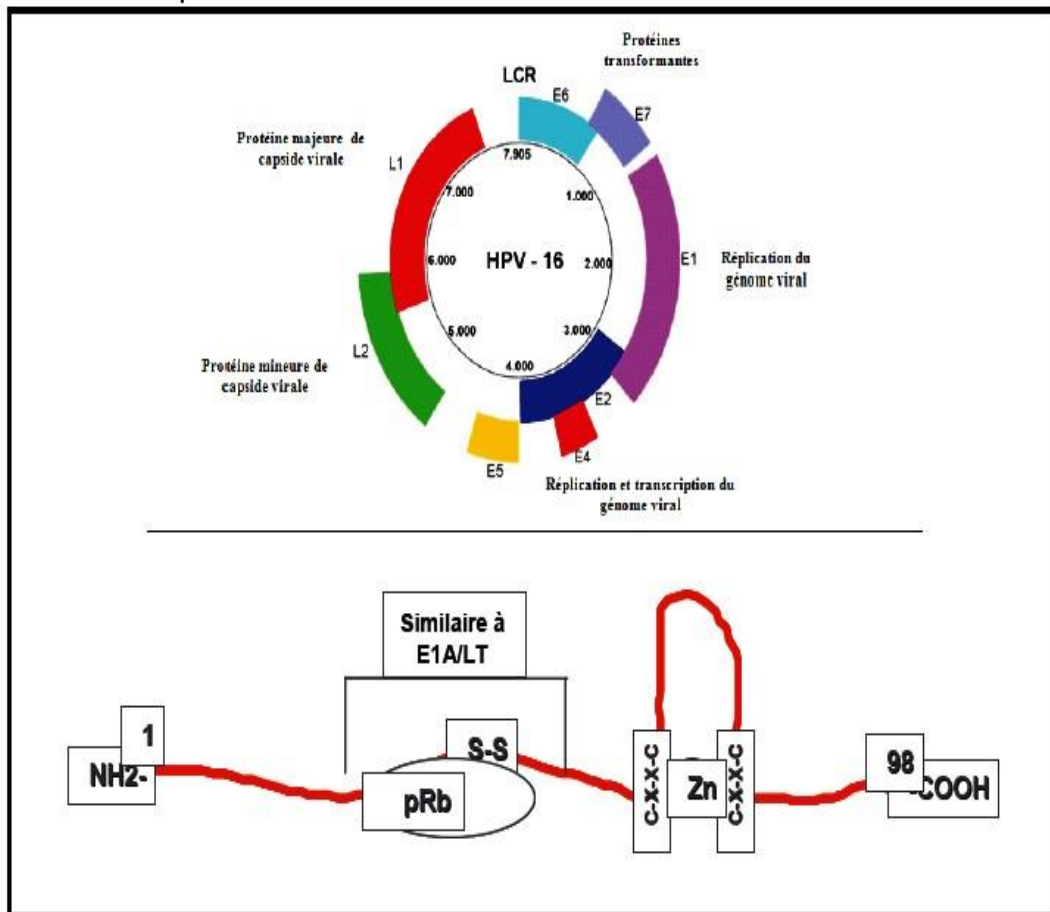


Figure 11. Organisation génétique de l'HPV-16 et structure de la protéine E7.
(Schiller *et al.* 2008).

Bien que la protéine E6 soit également impliquée dans le processus, les études ont démontré que le transcrit de E7 et sa protéine sont plus abondants (Smotkin and Wettstein, 1986). En conséquence, la protéine E7 semble être le candidat le plus adapté pour étudier la réponse immunitaire et développer de nouveaux vaccins contre l'HPV-16.

Lors d'une immunisation induite par la présence de la protéine au sein de l'organisme, ce dernier va activer des macrophages, des LT et induire des Ac dirigés spécifiquement contre la protéine virale E7.

De précédentes études concernant les mécanismes de la réponse immunitaire induite par l'HPV-16 restent ambiguës. Il semblerait que l'ensemble des voies Th1 et Th2 interviennent, notamment par l'augmentation des cytokines telles que l'IFN- γ (appartenant au groupe Th1) et l'IL-5 (appartenant au groupe Th2) (De Jong *et al.*, 2004 ; Warrino *et al.*, 2004 ; Warrino

et al., 2005). Dans nos travaux, nous avons choisi d'analyser plus spécifiquement ces deux cytokines caractéristiques de la réponse immunitaire induite par l'antigène E7.

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 l'HPV18, ainsi que des cancers associés à ces infections lors d'essais cliniques humains (**Schiller et al. 2008**).

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, l'équipe de Schiller a utilisé *L. lactis* pour délivrer deux protéines :

a) 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

b) L'interleukine-12 (IL-12), molécule à laquelle Metzger (2009) attribua une action Stimulatrice de la réponse immunitaire cellulaire lors d'infections.

Dans un premier temps, Schiller *et al.* (2008) ont construit une souche génétiquement modifiée de *L. lactis* sécrétant de façon stable l'antigène E7, alors que l'E7 fut décrite auparavant par Bermúdez-Humarán *et al.* (2002) comme une protéine très labile, et qui ont par la suite ciblé l'expression de l'E7 dans trois localisations différentes (i.e. cytoplasme, paroi et milieu extracellulaire).

L'administration nasale de trois souches recombinantes exprimant l'E7 induit une réponse immune spécifique de l'E7 chez la souris chez laquelle une immunogénicité accrue de la forme ancrée de l'E7 fut observée (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004b).

Bermúdez-Humarán *et al.* (2004b) ont 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, Bermúdez-Humarán *et al.* (2003a) avaient développé des souches de *L. lactis* permettant la production de :

a) De protéines p35 et p40, donnant une forme hétérodimérique native de l'IL-12.

b) 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 intra-nasale à des souris.

Ces mêmes auteurs ont, 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.

Deux années plus tard, ce même groupe de chercheurs (**Bermúdez-Humarán et al., 2005**) a évalué les capacités préventives et curatives de la combinaison de ces deux lactocoques par la mise en place d'un modèle murin chez lequel ils induisent des tumeurs par implantation sous-cutanée de cellules tumorales exprimant l'antigène E7 de l'HPV-16 « cellule tumorales » (TC-1), et dont ils mesurent l'évolution suite à l'administration intranasale de souches.

Ils ont ainsi évalué les effets préventifs et curatifs de la co-administration intra-nasale chez la souris de souches de *lactocoques* produisant E7 et IL-12 sur le développement de la tumeur TC-1. Leurs 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.

Bermúdez-Humarán et al. (2005) ont 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, ils notent l'absence de tumeurs dans seulement 25 % des souris immunisées.

Ces auteurs observent, également, que 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.

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 (**Braat et al., 2006**) (**Bouasria Benbouziane, 2014**).

III.4.2. Prévention et traitement des allergies à la β -lactoglobuline bovine (BLG) avec des *lactocoques* recombinants produisant la BLG et l'interleukine 12 (IL-12).

La prévalence des allergies alimentaires a particulièrement augmenté au cours des 20 dernières années (**Lack, 2008**). 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 sécrétteurs 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) (**O'Garra, 1998**).

L'IL-12 inhibe le développement des lymphocytes Th2 qui sont, quant à eux, sécrétteurs 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 bêta-lactoglobuline bovine (BLG) (**Adel-Patient et al., 2003**), un des allergènes majeurs du lait de vache, ils ont 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), ils ont démontré que l'administration intra-nasale de *lactocoques* recombinants stimule de façon significative une réponse immunitaire Th1 par rapport aux souris contrôles. Ce prétraitement 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) (**Cortes-Perez et al., 2007b**).

De plus, Cortes-Perez et al. (2009b) ont montré l'effet positif de l'administration thérapeutique des *lactocoques* produisant la BLG sur certains marqueurs de l'allergie au lait de vache. Enfin, ils ont 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 (**Wu et al., 2006**) (**Bouasria Benbouziane, 2014**).

PARTIE 02 :

ANALYSE

D'ARTICLE SCIENTIFIQUE

Partie I : Liste des articles

Wei Chun-Hua, Liu Jian-Kui, Hou Xi-Lin, Yu Li-Yun,b, Lee Jong-Soo, Kim Chul-Joong (2009). Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99; P: 4113-4118.

Partie II : Matériels et Méthodes

I. Matériels :

I.1 Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé lors de cette étude (Wei et al., 2009) est représenté dans le tableau 5

Tableau 5. Le matériel biologique et leur d'origine

Souches bactérienne /Plasmides	Origine
<i>E. coli</i> C83912	Isolée d'un veau atteint d'une infection intestinale au Japon ; achetée au Centre chinois de culture vétérinaire Collection (CVCC), Pékin, Chine. <i>E. coli</i> XL1-Blue
<i>L. casei</i>	Isolé de la nourriture chinoise. (<i>L. casei</i> BLS-S8 ; Lee et al., 2006)
Le vecteur Pla	Comprend le promoteur constitutif HCE et le gène pgsA-tag
pLA-K99.	Le plasmide d'affichage de surface minimal résultant de la protéine fimbriae de K99 amplifiée et inséré dans le vecteur pLA
pgsA-K99	Protéine de fusion

II. Méthodes :

II.1. Souches bactériennes et conditions de culture :

E. coli C83912 utilisée pour la construction des vecteurs d'expression, a été cultivée dans le milieu Luria-Bertani ou sur gélose Luria-Bertani et incubée à 37°C. Et *L. casei* a été cultivé à

37 °C dans du bouillon MRS (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Les milieux de cultures utilisés sont respectivement additionnés des antibiotiques appropriés, pour la culture d'*E. coli*, l'ampicilline, est ajouté à raison de 100 g/ml, et pour *L. casei*, le chloramphénicol a été utilisé à une concentration finale de 10 g/ml. (Wei et al., 2009).

II.2. Construction du plasmide et transformation bactérienne :

Le plasmide d'affichage de surface minimal, pLA-K99, a été construit selon le protocole de (Hou et al., 2007 dans Wei et al., 2009).

- ✓ Le fragment d'ADN de 498 pb codant pour la protéine fimbriae (pili court : appendice protéique) de K99 a été amplifié avec 5CGCGGATCCATGAAAAAGACTCTGA3 et 5CGCAAGCTTTTACATATAAGTGACT3.
- ✓ Digestion des amplifiât par BamHI et HindIII, et insertion des fragments d'intérêt dans le vecteur pLA qui comprend principalement Promoteur constitutif HCE et gène pgsA-tag.
- ✓ Le plasmide, dans laquelle la protéine de fusion du pgsA-K99 a été exprimée est désigné pLA-K99.

La Transformation de *L. casei* est réalisée par électroporation :

- ✓ L'échantillon a été soumis à un 2.2-kV, 200-Ω, 25- μF ; de pulsion électrique dans une cuvette de 0,2 cm, à l'aide d'un gène pulser (Bio-Rad, Richmond, Californie).
- ✓ *L. casei* transformée avec une vectrice navette vide pour générer (pLA/ *L. casei*) est utilisée comme contrôle négatif.
- ✓ Les lactobacilles ont été cultivés en milieu MRS (Difco, USA) supplémenté avec 16g/ml d'érythromycine à 30 C.
- ✓ Les cellules ont été récoltées et l'existence des protéines de fusion sur leur surface a été examinée
- ✓ Les cellules recombinantes de *L. casei* ont été cultivées à 37 °C.

II.3. Immunoblotting, microscopie par immunofluorescence et flux cytométrique :

Les extractions de protéines sont réalisées selon le protocole d'Acres et al. (1979) cité dans Wei et al. (2009).

II.3.1. L'immunoblotting des protéines de fusion :

Les techniques d'Immunoblotting "immunotransfert" utilisent des anticorps (ou d'autres ligands spécifiques dans des techniques apparentées) pour identifier des protéines cibles parmi un certain nombre d'espèces de protéines non apparentées. Ils impliquent l'identification de la cible protéique via des réactions spécifiques antigène-anticorps (ou protéine-ligand). Les protéines

sont généralement séparées par électrophorèse et transférées sur des membranes (généralement de la nitrocellulose). La membrane est recouverte d'un anticorps primaire pour une cible spécifique puis d'un anticorps secondaire marqué, par exemple, avec des enzymes ou avec des radio-isotopes. Lorsque le ligand n'est pas un anticorps, la réaction peut être visualisée à l'aide d'un ligand directement marqué. La dot blot est une procédure simplifiée dans laquelle les échantillons de protéines ne sont pas séparés par électrophorèse mais sont déposés directement sur la membrane. L'immunotransfert est maintenant largement utilisé en conjonction avec l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide, non seulement à des fins traditionnelles, telles que l'identification par immunoaffinité des protéines et l'analyse des réponses immunitaires, mais aussi comme technique d'interface génome-protéome. (**Magi B. et Liberatori S. 2005**).

Dans l'étude de Wei et *al.* (2009) ; Les gènes anti-pgsA (1:1000) et anti-K99 de souris (1:800) ont été utilisés. L'immunoglobuline G (IgG) anti-souris conjuguée à la peroxydase de raifort a été utilisée comme anticorps secondaire. Après lavage des membranes avec du PBS contenant 0,05 % de tween 20 (PBS-T), les membranes ont été traitées avec le complexe Streptavidine-HRP (Vectastain ABC Kit, VectorLab, USA) en suivant les instructions du fabricant. La visualisation de l'immuno-liaison a été réalisée avec une solution de diaminobenzidine (DAB) (VectorLab, USA) (**Wei et al., 2009**).

II.3.2. La microscopie par immunofluorescence :

Le principe de l'immunofluorescence consiste à mettre en évidence en microscopie de fluorescence la fixation sur un antigène figuré d'un anticorps auquel a été incorporée une substance que les rayons ultraviolets rendent fluorescente. La technique directe met en présence l'antigène figuré et le sérum contenant l'anticorps et dans lequel au préalable les globulines, support des anticorps, ont été électivement conjuguées à la substance fluorescente ; cette méthode exige pour chaque sérum à tester ce marquage initial des globulines (**Cottenot et Merklen, 1968**).

Wei et *al.* (2009) ; ont utilisé pour cette analyse, des cellules marquées avec des anticorps polyclonaux anti-K99 et des anticorps anti-souris conjugués au FITC qui ont été examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence Carl Zeiss Axioskop 2. Les photographies sont prises avec une caméra haute résolution AxioCam en utilisant des temps d'exposition identiques (**Wei et al., 2009**).

II.3.3. La cytométrie en flux :

La cytométrie en flux permet d'effectuer rapidement des analyses sur un grand nombre de cellules en suspension. Elle consiste en une suspension monocellulaire, colorée par un fluorochrome, circulant dans une veine liquide et passant devant un rayon lumineux (source laser le plus souvent) grâce à un système optique étudiant la lumière transmise et la lumière diffractée et ou réémise par un fluorochrome (immunofluorescence). Le principe de l'analyse des cellules en CMF est basé sur la réaction d'immunofluorescence. Cette réaction associe la spécificité des anticorps monoclonaux et les propriétés des fluorochromes. Elle constitue une méthode de choix pour la révélation d'antigènes cellulaires. Les techniques de marquage sont de deux types ; L'immunofluorescence directe où l'anticorps employé est conjugué directement à un fluorochrome, et l'immunofluorescence indirecte où l'anticorps engagé dans la réaction est révélé par un deuxième anticorps lui-même fluorescent (**Elleuch Zghal, 2004**).

Dans cette étude de **Wei et al. (2009)** ; Les cellules de *L. casei* ont été cultivées dans du bouillon MRS (Difco) pendant la nuit à 37 °C. Les culots cellulaires ont été séquentiellement incubés et mélangés avec des anticorps polyclonaux anti-K99 de souris (1:800) et Anticorps secondaires IgG anti-souris conjugués au FITC (1:5000 ; Sigma, Saint-Louis, MO). Enfin, 3×10^4 cellules ont été analysées avec FACS Calibur (Becton Dickinson, Oxnard, CA) équipé du logiciel CellQuest (**Wei et al., 2009**).

II.4. Etude in vivo de l'immunisation chez les souris BALB/c :

II.4.1. Conditions d'élevage et alimentation des souris :

Des souris SPF (BALB/c, femelles, âgées de cinq semaines) issues du Laboratoire Vital River, Pékin, Chine. Ces animaux sont élevés et utilisés selon les protocoles animaux approuvés par l'Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Les animaux sont placés dans des cages individuelles avec de la nourriture et de l'eau stérilisés disponibles à volonté. Toutes les souris sont hébergées en salle d'asepsie et acclimatées au nouvel environnement pendant une semaine avant l'immunisation, dès leur arrivée (**Wei et al., 2009**).

II.4.2. Induction de l'immunisation par les souches recombinantes :

Pour étudier la possibilité que les protéines ETEC K99 affichées en surface des souches *L. casei* recombinées, induisent l'immunité muqueuse chez la souris, le protocole de **LeeJong-Soo et al. (2006)** a été utilisé par **Wei et al. (2009)**. Des souris BALB/c (45 par groupe en 4 groupes) ont été immunisées par voie orale ou par voie intra-nasale avec une quantité égale de souches *L.*

casei vivantes exprimant la protéine K99 combinée à partir du plasmide *pLA-K99*. *L. casei* hébergeant le plasmide parental *pLA* a été utilisé comme témoin négatif. Pour la voie orale, 5×10^9 *pLA-K99/L. casei* dans 100 μ l de suspension sont administrés quotidiennement par lavage intragastrique aux jours 0–4, 7–11, 21–25 et 49–53. Par contre, la voie intra-nasale, 2×10^9 *pLA-K99/L. casei* dans 20 μ l de suspension sont administrées dans les narines de souris légèrement anesthésiées aux jours 0-2, 7-9, 21 et 49 (Wei et al., 2009).

II.4.3. Préparation des échantillons pour l'analyse :

Tout d'abord, Des échantillons de sang sont prélevés dans la veine caudale aux jours 0 (pré-immun), 14, 28, 42, 56, 70 et 84. Les sérums sont récupérés et conservés à -20 °C jusqu'à ce qu'ils soient analysés (Wei et al., 2009).

Ensuite, des échantillons de matières fécales sont prélevés chaque semaine. Granulés fécaux (100mg) et sont mis en suspension dans 0,5 ml de PBS. Après centrifugation à 15 000 \times g pour 5min, les surnageant sont collectés et testés pour les IgA par ELISA (Wei et al., 2009).

Aussi, selon la méthode de Wu et Russell des échantillons de lavage intestinal, sont obtenus par 7 souris qui ont été sacrifiées dans les jours 56, 70 ou 84, après ces liquides de lavage intestinal sont obtenus en rinçant l'intestin grêle excisé avec 3 ml de PBS contenant 50 mM d'EDTA et 0,1 mg/ml d'inhibiteur de trypsine-chymotrypsine de soja (Sigma). Le contenu a été collecté et conservé sur de la glace pour le traitement, après quoi les fluides sont vortexés et centrifugés à 650 xg pendant 10 minutes à 4 C. Un volume de 30 μ l de fluorure de phénylméthylsulfonyl 100 mM (PMSF) (Sigma) a été ajouté aux surnageant avant qu'ils ne soient vortexé et centrifugé à 27 000 xg pendant 20 min à 4 C. Et 20 μ l supplémentaires de PMSF, 100 μ l de sérum bovin fœtal (FBS) et 20 μ l d'azoture de sodium à 1 % (Sigma) sont ajoutés aux surnageant avant qu'ils ne soient distribués en aliquotes et congelés (Wei et al., 2009).

Par ailleurs, Les liquides de lavage pulmonaire sont obtenus en post mortem en insérant une canule de nylon à la trachée exposée, qui était attachée en place et une aiguille hypodermique avec une seringue sont fixées et utilisées pour injecter et retirer 0,7 ml de PMSF 2 mM dans du PBS trois fois. Les échantillons du fluide récupéré sont conservés dans la glace avant centrifugation à 27 000 xg pendant 20 min à 4 °C, puis les surnageants sont conservés en aliquotes à -20 C (Wei et al., 2009).

Enfin, des liquides vaginaux sont obtenus en lavant le vagin trois fois avec 0,5 ml de solution saline glacée contenant des inhibiteurs de protéase. Les échantillons obtenus sont centrifugés à 2500 xg pendant 20 min à 4 C, et les surnageants sont conservés à -20 °C jusqu'à ce qu'ils soient analysés (Wei et al., 2009).

II.4.4. Test d'ELISA :

ELISA, c'est l'abréviation de dosage immunosorbant ; dont le principe de base est d'utiliser une enzyme pour détecter la liaison de l'antigène (Ag) à l'anticorps (Ab). L'enzyme convertit un substrat incolore (chromogène) en un produit coloré, indiquant la présence d'Ag : Ab obligatoire. Un test ELISA peut être utilisé pour détecter soit la présence d'Ags ou d'Abs dans un échantillon, selon la façon dont le test est conçu **(Ma et Shiehk, 2006)**.

Dans la présente étude de Wei *et al.* (2009) ; Les taux d'anticorps dans le sérum, les échantillons fécaux, le lavage pulmonaire, le lavage intestinal et les liquides vaginaux sont déterminés par un dosage immuno-enzymatique (ELISA) comme décrit selon le protocole de **(Lee et al., 2006)**. ELISA a été réalisée trois fois pour chaque échantillon de sérum. Les titres au point final ont été définis comme les dilutions maximales donnant une mesure A450 de 0,1. Cette valeur seuil représente la densité optique moyenne plus 2 écarts-types de 10 échantillons de sérum de souris normaux testés à une dilution de 1:50. La comparaison statistique a été faite en utilisant le test U de Mann Whitney **(Wei et al., 2009)**.

II.4.5. Expérience du défi de fimbriae adhésif K99 :

L'expérience du défi contre l'immunité intra-nasale ou orale est réalisée lorsque l'immunité intranasale ou orale était à 3 semaines et 9 semaines après la dernière immunisation, avec 200µl de C83912 qui avait un titre de 2×10^3 DL50 ml⁻¹ (6×10^{11} UFC). Les décès sont enregistrés et les souris survivantes sont maintenues pendant 20 jours après la provocation. Les souris saines sans signes de diarrhée sont jugées protégées. La différence de survie des souches est calculée par le test du log rank avec le logiciel SPSS **(Wei et al., 2009)**.

Partie III : Résultats et Discussion

III.1. Expression de la protéine de fusion pgsA-K99 à la surface cellulaire :

Les résultats obtenus par **Wei et al. (2009)** ; sont illustré par les **figures 12 ; 13 et 14**. La **figure 12** ; montre l'analyse du lysat des cellules entières de *L. casei* portant le plasmide pLA-K99. Les tailles moléculaires respectives des protéines, analysées par Western Blot, pgsA et ETEC K99 sont d'environ 41 kDa et 18 kDa, alors que la taille de la protéine de fusion pgsA-K99 est d'environ 59 kDa. Une bande claire de la protéine de fusion a été observée à la taille moléculaire estimée, indiquant l'expression réussie de la protéine de fusion (**Wei et al., 2009**).

La **figure 13** montre qu'une fluorescence verte de la protéine de fusion pgsA-K99 immunocolorée est observée sur les cellules de *Lactobacillus casei* portant le plasmide pLA-K99, tandis que les cellules portant le plasmide témoin pLA n'étaient pas immunocolorées. Les résultats montrent qu'ETEC K99 était affiché sur la surface cellulaire des cellules recombinantes de *Lactobacillus casei*. Dans la plupart des cellules, la fluorescence verte est localisée autour de la membrane cellulaire (**Wei et al., 2009**).

La cytométrie en flux a été utilisée pour analyser quantitativement l'affichage de la surface cellulaire d'ETEC K99 (**figure 14**). La surface cellulaire affichée par pgsA-K99 est colorée avec des anticorps primaires et secondaires similaires à ceux utilisés pour l'immunofluorescence, et des cellules de *Lactobacillus casei* contenant le plasmide pLA sont utilisées comme contrôle pour la cytométrie en flux. Les cellules recombinées pgsA-K99 ont montré une intensité de signal de fluorescence significativement plus élevée que les cellules témoins (**Wei et al., 2009**).

Les résultats montrent que *Lactobacillus casei* contenant pLA ne présentait pas de propriétés antigéniques, mais *Lactobacillus casei* contenant pLA-K99 pouvait être reconnu par des antisérums spécifiques. De plus, le plasmide recombinant pLA-K99 dans *Lactobacillus casei* a une bonne séparation et stabilité structurelle, et ne montre aucun réarrangement structurel (**Wei et al., 2009**).

En effet, l'IGA est le principal anticorps à la surface de la muqueuse, car il est produit plus localement que toutes les autres immunoglobulines donc, un vaccin oral efficace contre ETEC devrait induire une réponse IgA muqueuse spécifique. (**Brandtzaeg, 1994 ; Kilian et Russel,**

1994 ; Wei et al., 2009). Aussi, pour de nombreux agents pathogènes, l'infection initiale se produit principalement dans les tissus muqueux. Par conséquent, il est important de développer un vaccin capable de déclencher une réponse immunitaire protectrice pour empêcher l'infection par un agent pathogène et la réplication au niveau de la muqueuse grâce à l'immunité muqueuse. (Medina et Guzman, 2001 ; Wei et al., 2009).

Par ailleurs, l'utilisation de bactéries lactiques comme support vivant pour délivrer des antigènes à la muqueuse immunitaire ou à d'autres molécules thérapeutiques a été proposée. Cependant, seuls quelques systèmes ont été précédemment décrits comme utilisant des souches de *Lactobacillus casei* comme vecteurs pour exprimer des antigènes bactériens hétérologues sous une forme qui peut être présentée et traitée par le système immunitaire d'un hôte mammifère (Granette et al., 2001 ; Scheppler et al., 2002).

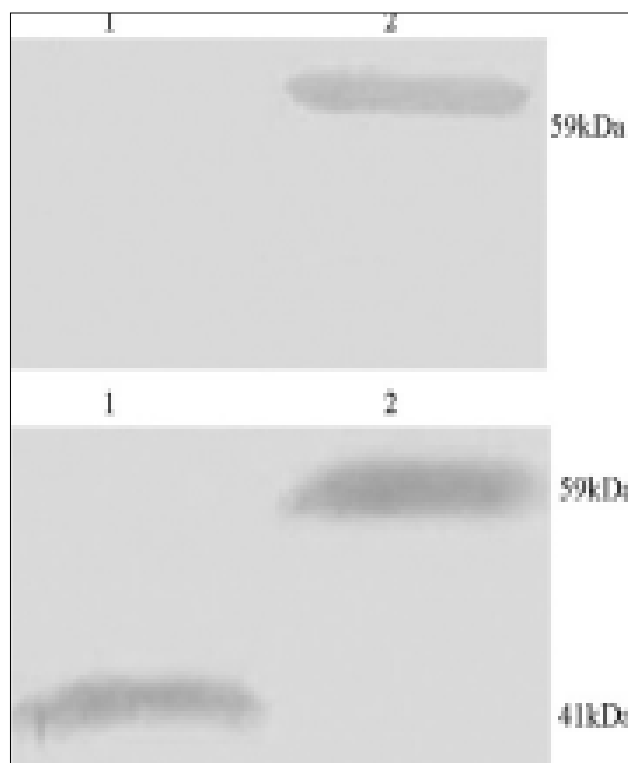


Figure 12. Détection de pLA-K99 exprimé dans *Lactobacillus casei* par Western Blot avec des anticorps polyclonaux anti-K99 (a) et anti-pgsA (b). La piste 1 montre des lysats de cellules entières de type standard (vecteur parental) ; la piste 2 montre le recombinant *L. casei*. Des bandes de protéines de 59 kDa, correspondant à la taille attendue de pgsA-K99 ont été détectées (Wei et al., 2009).

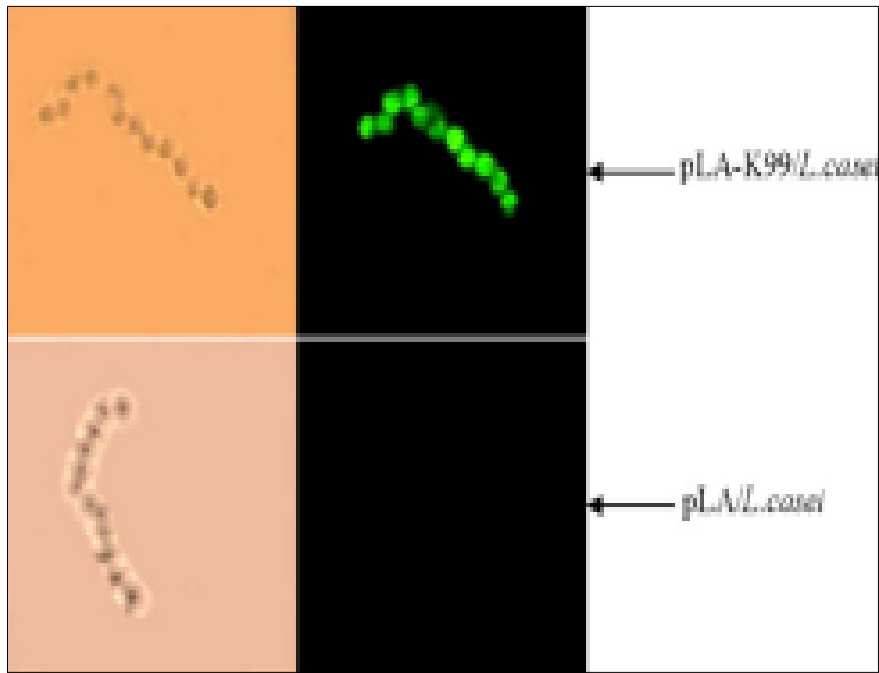


Figure 13. Images d'immunofluorescence représentatives de cellules témoins abritant pLA et de recombinantes *L. casei* cellules exprimant pgsA-K99. Les images en fond clair sont affichées sur la gauche (Wei et al., 2009).

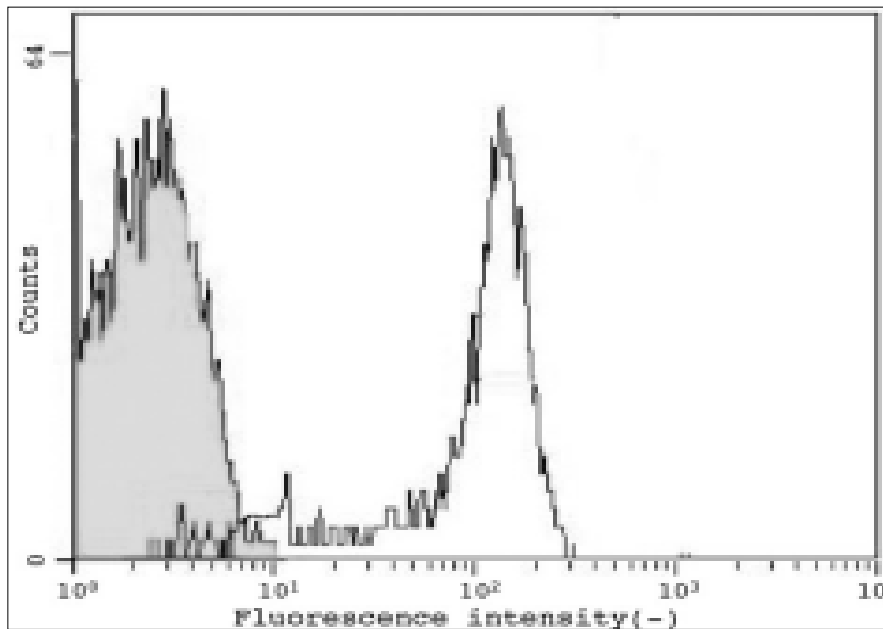


Figure 14. Histogrammes du trieur de cellules activé par fluorescence des cellules témoins abritant des cellules pLA (remplies) et recombinantes (ouvertes) de *L. casei*. Les cellules ont été sondées avec des anticorps polyclonaux anti-K99 de souris, suivis d'anticorps IgG anti-souris conjugués à la biotine et de streptavidine conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Wei et al., 2009).

III.2. Immunogénicité systémique et muqueuse des protéines hybrides exprimées sur L. casei

Pour caractériser l'immunogénicité d'ETEC K99 à la surface de *Lactobacillus casei*, des souris BALB/c (45 souris par groupe, réparties en 4 groupes), **wei et al. (2009)**, ont administrées *Lactobacillus casei* recombinant par voie orale ou intranasale à raison de 5×10^9 cellules/dose ou 2×10^9 cellules/dose. *Lactobacillus casei* contenant le plasmide parental pLA a été utilisé comme témoin négatif. Des échantillons de sérum sont utilisés pour évaluer la réponse immunitaire systémique par ELISA indirect (**Wei et al., 2009**).

Les résultats sont représenté dans la **figure 15** ; Des échantillons de sérum ont été utilisés par **Wei et al.(2009)**, pour évaluer la réponse immunitaire systémique par ELISA indirect. Au cours des deux premières séries d'immunisation, de très faibles niveaux d'IgG vis-à-vis de ETECK99 ont été détectés (Fig. 15a, jour 14). Un niveau d'IgG plus élevé a été détecté peu de temps après la troisième immunisation (jour 28, $p < 0,01$). Après la quatrième immunisation, une nouvelle augmentation du titre d'IgG a été observée (jour 56, $p < 0,01$). Des profils similaires de réponse aux anticorps sont observés pour les immunisations intranasales et orales. A la fin de l'immunisation, le titre sérique moyen d'IgG des deux groupes expérimentaux était plus de 1000 fois supérieure à celui du groupe témoin. Il n'y avait pas de différence significative dans les titres d'anticorps entre les groupes de vaccination orale et intranasale (**Wei et al., 2009**).

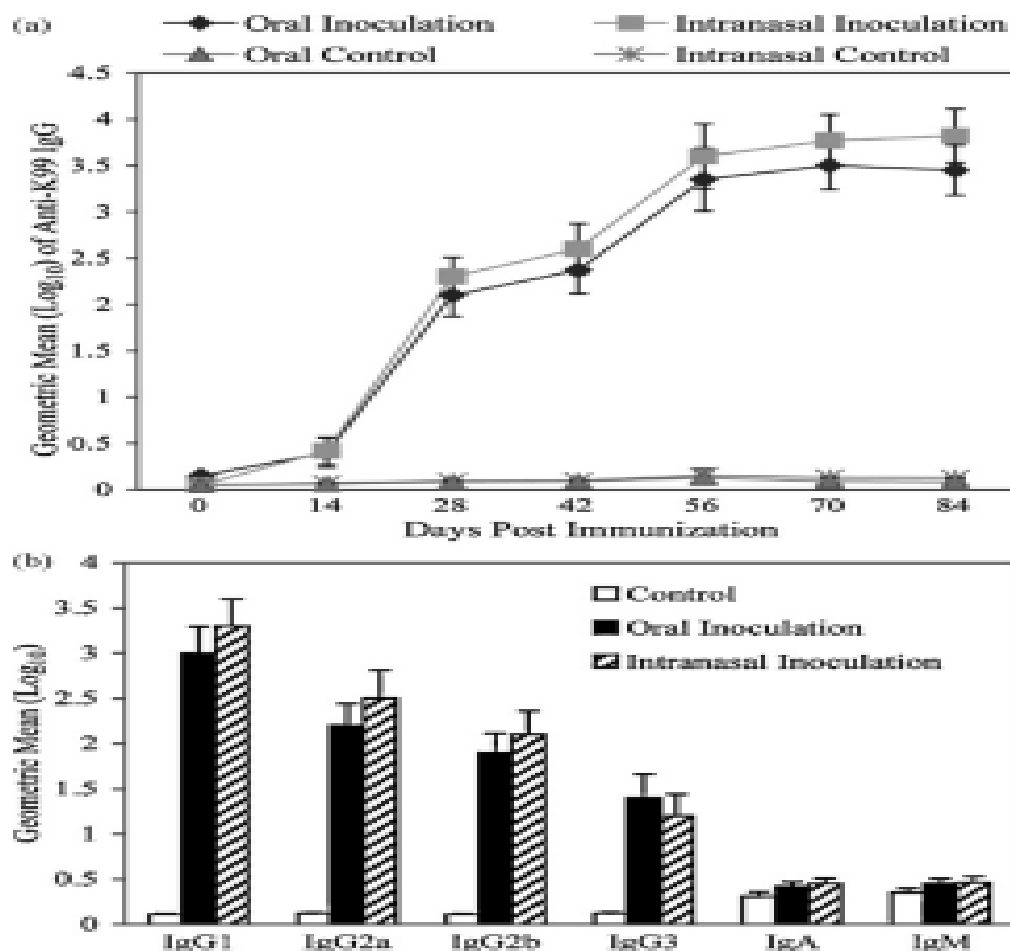


Figure 15. Réponse anti-K99 systémique après immunisation des muqueuses. Des groupes de 45 souris ont été immunisés par voie orale (losange) ou intranasale (carré) avec pLA-K99/Lcasei. Les sérums témoins provenaient de souris vaccinées avec le plasmide parental pLA. (a) Cinétique de la réponse IgG sérique anti-K99. L'ELISA a été réalisée en triple en utilisant des peptides fimbriae purifiés, et les titres sont définis comme l'inverse de la dilution maximale des sérums donnant une absorbance égale à celle des échantillons pré-immuns. (b) Profils isotypiques des anticorps sériques anti-K99. Des échantillons de sérum prélevés au jour 84 après l'immunisation ont été utilisés. Les titres au point final ont été calculés comme l'inverse des dilutions de sérum donnant la même densité optique que la dilution 1/50 des sérums pré-immuns groupés. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm écarts types. Les comparaisons statistiques entre les groupes ont été faites par le Mann-Whitney U test (Wei et al., 2009).

Pour caractériser davantage la réponse des anticorps contre les fragments de protéine K99, les niveaux de sous-classes d'IgG spécifiques à l'antigène (IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3) et d'autres isotypes d'anticorps (IgA et IgM) sont évalués par ELISA indirect en utilisant un pool d'immunsérum collecté le 84ème jour après la première vaccination. Sur la **figure 15b**, les souris immunisées par voie intranasale et orale ont produit des anticorps spécifiques contre la protéine K99, principalement IgG1 et IgG2a, avec des niveaux modérés d'IgG2b. Le titre moyen de ces sous-types était significativement différent du titre de base du groupe témoin ($p < 0,01$) ;

en revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les isotypes IgA et IgM (**Wei et al., 2009**).

Aussi pour l'évaluation de la réponse immunitaire de la muqueuse, le niveau d'IgA spécifique de K99 est déterminé dans le liquide de lavage intestinal, vaginal et broncho-alvéolaire par ELISA indirect. Des peptides de piline purifiés sont utilisés pour vérifier le liquide collecté les 56e, 70e et 84e jours après la première vaccination. Les immunisations intranasales et orales ont déclenché la spécificité K99 sous forme de barres blanches. Les barres d'erreur représentent l'écart type et les résultats sont représentés par les figures 16 et 17 (**Wei et al., 2009**). Les figures 16 et 17 montrent la réponse IgA muqueuse au site d'inoculation et au site muqueux distant. Les IgA fécales sont inférieures au liquide d'irrigation intestinale. La raison peut être que le niveau d'IgA dans les selles ne reflète pas avec précision le niveau dans l'intestin, mais les deux ont la même tendance. Les titres d'anticorps sont plus élevés au site d'immunisation chez tous les groupes alors que seuls les niveaux d'anticorps de fond ont été détectés chez les animaux témoins (**Wei et al., 2009**). Pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, la voie d'attaque est orale. Les IgA spécifiques de la muqueuse peuvent empêcher l'ETEC de coloniser l'intestin grêle, mais le niveau d'IgA spécifiques de K99 dans le liquide intestinal après immunisation intranasale est inférieur à celui après immunisation orale. Deuxièmement, des doses plus élevées de *Lactobacillus casei* (5×10^9 et 2×10^9 organismes) ont été vaccinées par voie orale. Troisièmement, le plan de vaccination optimisé pour chaque itinéraire est légèrement différent. Pour l'immunisation orale, les animaux sont immunisés pendant cinq jours consécutifs au cours des troisième et quatrième périodes d'immunisation (jours 21-25 et 49-53). En revanche, les animaux n'ont été immunisés qu'une seule fois par voie nasale au jour 21 et au jour 49. Cependant, ces différences dans le schéma vaccinal ne peuvent pas expliquer entièrement les différences dans le niveau d'immunité protectrice, car des niveaux plus élevés d'immunité sont observés. De même, s'il n'est pas supérieur, utilisez ELISA pour détecter les anticorps sériques chez les animaux immunisés par voie intranasale au lieu des animaux immunisés par voie orale (Figure 15). Une autre explication pourrait être que l'antigène est traité et/ou présenté aux cellules immunitaires différemment dans les deux compartiments muqueux (**Wei et al., 2009**). En effet, L'immunité protectrice contre ETEC dépend principalement de l'induction d'une réponse d'anticorps IgA. En effet, L'immunité protectrice contre ETEC dépend principalement de l'induction d'une réponse d'anticorps IgA sécrétoires dans la lumière de l'intestin grêle, qui est une réponse immunitaire dépendante de Th2 (**Murray et al., 1987 ; Alves et al., 1998**).

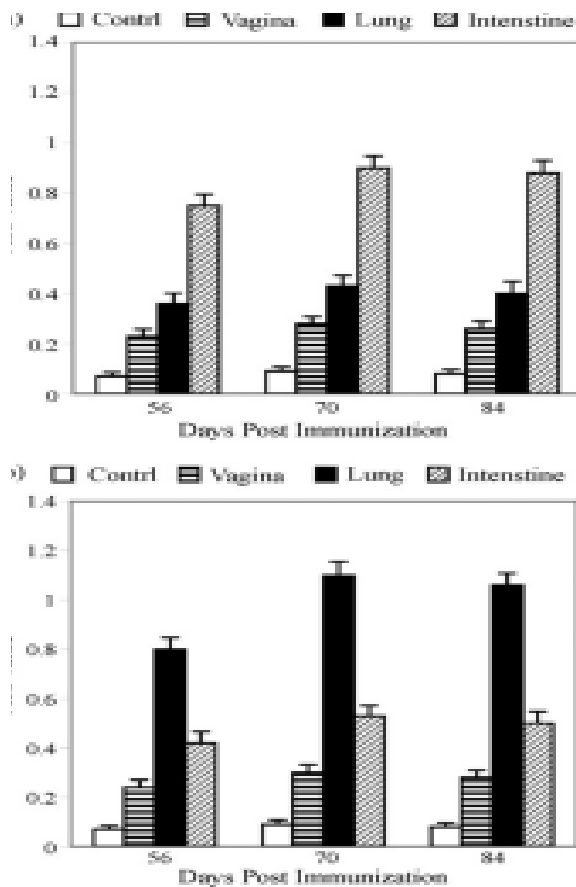


Figure 16. Réponses des anticorps IgA muqueux anti-K99. Les fluides de lavage intestinal, vaginal et pulmonaire, récoltés sur des souris sacrifiées 56, 70 ou 84 jours après l'immunisation, ont été analysés par ELISA en triple. L'absorbance à 450 nm d'échantillons d'animaux immunisés par voie orale (a) ou intranasale (b) est indiquée. Les fluides des animaux témoins sont représentés par des barres blanches. Les barres d'erreur représentent les écarts types. (Wei et al., 2009).

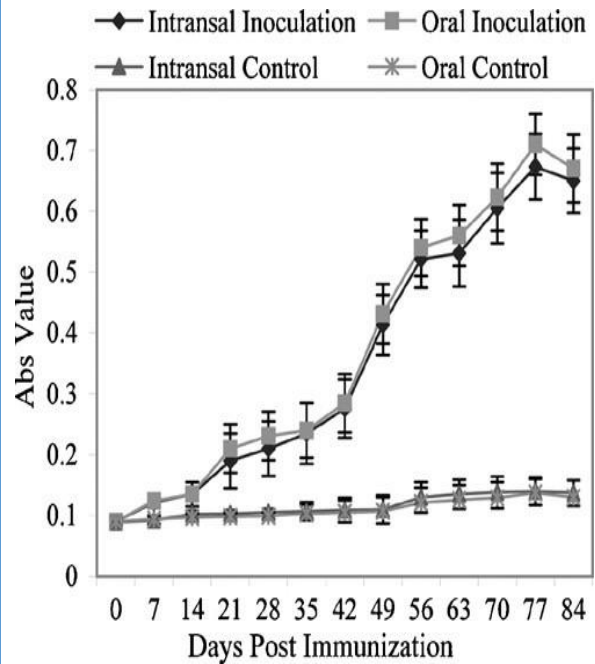


Figure 17. Réponses des anticorps IgA muqueux anti-K99. Des échantillons fécaux collectés chaque semaine après l'immunisation a été analysés par ELISA en triple. L'absorbance à 450 nm d'échantillons d'animaux immunisés par voie orale (losange) ou intranasale (carré) et d'animaux témoins (triangle) est indiquée. Les barres d'erreur représentent les écarts types. (Wei et al., 2009).

III.3. Efficacité de la protéine fimbriae ETEC K99 exprimée dans le L. casei vivant recombinant :

Pour l'évaluation in vivo du défi de Fimbriae exprimé par les *L. casei* recombinante et vivante, Le 75ème jour (3 semaines après la dernière immunisation de rappel), chaque groupe de 12 souris immunisées a reçu par voie orale 2×10^3 DL50 (6×10^{11} CFU) C83912. Les résultats de **Wei et al. (2009)** ; sont représentés dans la **figure 18**. La figure 18a compare les taux de survie de souris vaccinées et naïves après infection, et démontre clairement que 100 % des souris témoins sont morts après avoir développé une diarrhée après provocation par la souche C83912. Les intestins de ces animaux morts ont présenté après dissection de graves changements pathologiques, à partir desquels *E. coli* C83912 a été isolé (données non présentées). Quelle que soit la voie d'immunisation, plus de 90 % des souris immunisées ont survécu (**Wei et al., 2009**).

La figure 18b montre que pour prouver que la protection des souris est due à une immunité spécifique plutôt qu'à une réponse immunitaire cellulaire non spécifique médiée par la présence de souches vaccinales dans les organes de l'hôte, la même expérience et l'intervalle de temps entre le dernier rappel et les attaques répétées sont plus longues. Au jour 114 (9 semaines après que la souche vaccinale a été éliminée des souris immunisées), le groupe de 12 souris vaccinées comme décrit ci-dessus a été soumis à une provocation orale avec 2×10^3 DL50 de C83912. Quelle que soit la voie d'immunisation, plus de 80 % des souris immunisées ont survécu. Par conséquent, la réponse systémique en anticorps induite par la voie du mucus est protégée. Les souris BALB/c étaient immunisées par voie orale avec pLA-K99/L. *Casei* est suffisant pour provoquer une réponse IgA élevée dans le sérum et le tissu muqueux, ainsi que pour augmenter la réponse systémique des anticorps IgG contre les fimbriae ETEC K99 (**Wei et al., 2009**).

En effet, les IgG1 et IgG2a semblent jouer un rôle important dans la neutralisation des exotoxines produites par ETEC K99, telles que celles produites par *Diphtheria et Clostridium tetani* (**Masanori et al., 2000**). Cette observation suggère que le mécanisme des cellules T helper 2 (Th2) peut contribuer à cette réponse immunitaire. L'augmentation continue de la réponse en anticorps IgA fait davantage allusion à cette idée d'implication de Th2. Par conséquent, l'administration orale ou intranasale de *Lactobacillus casei* recombinant avec l'antigène de surface ETEC K99 induit des réponses immunitaires systémiques et muqueuses contre les pili ETEC (**Wei et al., 2009**).

Wei et al. (2009), démontrent que la protéine fimbriae ETEC K99 exposée à la surface de *Lactobacillus casei* non pathogène et résistante à l'acide gastrique peut déclencher des réponses immunitaires systémiques et muqueuses. Le vecteur vaccinal recombinant multivalent idéal devrait être capable d'induire des réponses systémiques liées à la protection contre de multiples agents pathogènes, et devrait également induire des IgA sur la surface muqueuse pour empêcher les agents pathogènes d'entrer dans le corps. *Lactobacillus casei* peut être un système d'administration muqueuse efficace pour les antigènes bactériens et viraux (Wei et al., 2009).

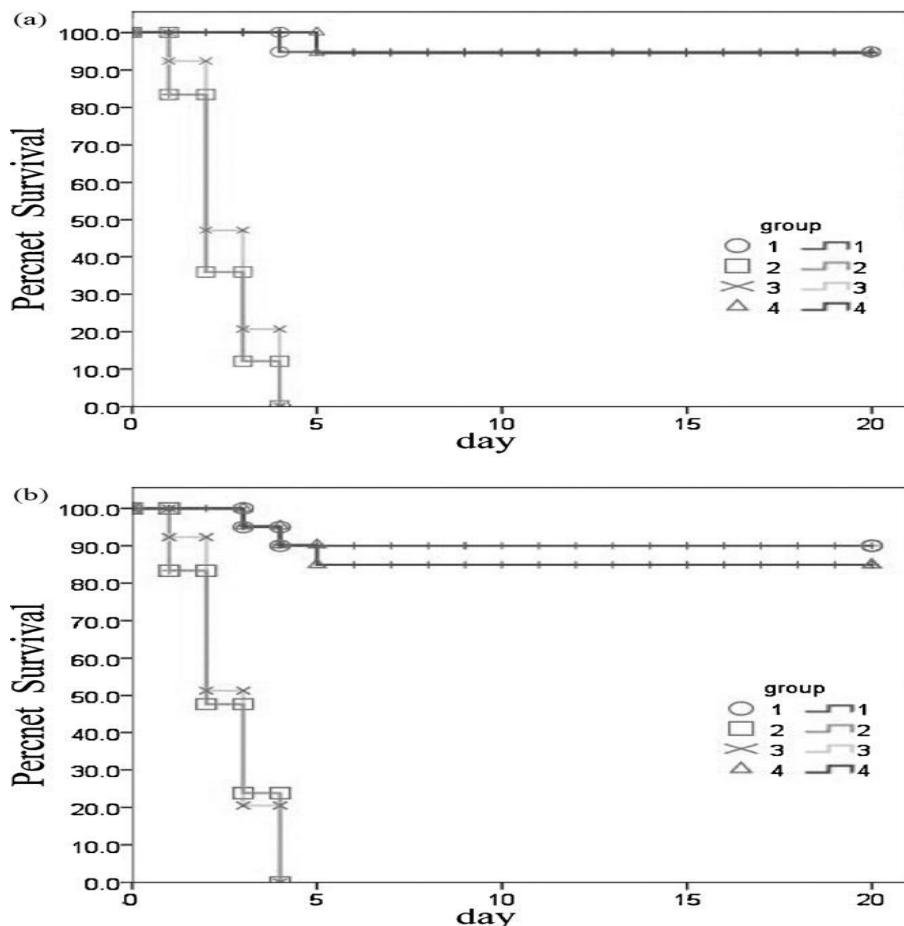


Figure 18. Survie de souris BALB/c immunisées avec pLA-K99/L. casei après une provocation ultérieure avec la souche parentale de type standard. La survie des souris immunisées est représentée par des lignes pleines, tandis que celle des souris témoins est représentée par des lignes en pointillés. (a) Douze souris par groupe ont été par voie orale avec 6×10^{11} provoquées CFU de C83912 au jour 75. (b) Douze souris par groupe ont été provoquées par voie orale avec 6×10^{11} CFU de C83912 au jour 114. Plus de 80 % ont survécu après tester avec C83912 (2×10^3 LD50), 100 % de mortalité ont été observés pour le groupe immunisé avec un contrôle pLA/L. casei (groupe 1 : vacciné par voie orale ; groupe 2 : contrôle oral ; groupe 3 : contrôle intranasal ; groupe 4 : vacciné par voie intranasale) (Wei et al., 2009).

Les résultats obtenus par Wei et ces collaborateurs (2009), confirment ceux retrouvés par différentes autres recherches selon la bibliographie. En effet, En 1990, la première tentative

d'utilisation de bactéries lactiques comme vaccin muqueux a été réalisée avec des *lactocoques* recombinants tués (*L.lactis*) produisant une forme fixée à la paroi cellulaire d'un antigène protecteur (PAC) de *Streptococcus mutans*. Les souris immunisées par voie orale avec cette souche recombinante de *L. lactis* tuée ont développé des IgG sériques spécifiques de PAC et des anticorps IgA muqueux (Iwaki et al., 1990 ; Bermudez-Humaran et al., 2011). Ensuite, en 1993, Wells et al, ont rapporté, pour la première fois, l'utilisation de *L. lactis* vivant recombinant, produisant le fragment C du tétanos (TTFC), pour protéger des souris par injection sous-cutanée contre une épreuve létale par la toxine tétanique. Par la suite, le même groupe a évalué l'effet de la voie d'immunisation (administration orale ou nasale) sur des lactocoques vivants recombinants produisant du TTFC chez la souris (Norton et al., 1997 ; Robinson et al., 1997 ; Bermúdez-Humarán LG. et al., 2011)

Par ailleurs, il a été proposé pour la première fois d'utiliser des *Lactobacillus* sp génétiquement modifiés (c'est-à-dire *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum*) pour produire des protéines hétérologues et développer une nouvelle génération de vaccins muqueux. Au cours des années 90. Environ 50 publications évaluées par des pairs ils ont publié confirmant les avantages de *Lactobacillus* en tant que vaccin muqueux vivant, car *Lactobacillus* peut durer plus longtemps dans le tube digestif et certaines souches ont des propriétés probiotiques (c'est-à-dire qu'elles sont bénéfiques pour l'activité de la flore intestinale). Santé humaine et animaux). (Seegers, 2002 ; Bermúdez-Humarán LG. et al., 2011).

Dans la même année, une étude sur l'utilisation de *L. casei* recombinante dans des modèles d'allergie au lait de vache a été étudiée par Hazebrouck et al. (2009) dont une souche recombinante de *Lactobacillus casei* capable de produire du BLG a été développée. Le pouvoir immunomodulateur de l'administration intranasale et orale de ce lactobacille recombinant sur une sensibilisation ultérieure de souris au BLG a montré que les administrations par voie orale et intranasale étaient similaires dans la production d'IL-17 par les splénocytes réactivés par BLG. Cependant, dans les splénocytes réactivés par BLG de souris prétraitées par voie intranasale, un niveau de sécrétion plus élevé de cytokines Th1 (IFN-g et IL-12) et de cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) a été détecté, suggérant un mélange Th1/Th2 réponse cellulaire ; alors que seule la production de cytokines Th1, mais pas de cytokines Th2, était améliorée dans les splénocytes réactivés par le BLG de souris prétraitées par voie orale. Ces résultats indiquent

que le mode d'administration des LAB recombinantes peut être critique pour leurs propriétés immunomodulatrices (**Hazebrouck et al., 2009 ; Bermúdez-Humarán LG. et al., 2011**).

Enfin, l'immunité contre *Lactobacillus casei* peut induire à l'inverse une réaction mixte des sous-classes IgG et T-helper, ce qui peut induire une protection contre une variété d'agents pathogènes infectieux et peut protéger plusieurs surfaces muqueuses. Cependant, avant que les bactéries lactiques recombinantes puissent être utilisées chez l'homme, il est nécessaire d'augmenter l'efficacité du système (c'est-à-dire d'obtenir un niveau élevé de réponse en anticorps contre divers antigènes à une dose plus faible) et de démontrer un niveau protecteur de réponse immunitaire dans différents modèles animaux. Il est également nécessaire de construire des souches humaines ou animales qui répondent aux exigences de sécurité des organismes de réglementation. À cette fin, le système d'expression de qualité alimentaire existant devrait être davantage développé (**De Vos, 1999 ; Wei et al., 2009**).

Conclusion

L'analyse de cet article, nous a permis de ressortir des données pertinentes qui renforcent l'intérêt d'utiliser les bactéries lactiques pour développer de nouveaux vecteurs vaccinaux pour l'administration muqueuse de protéines thérapeutiques.

Wei *et al.* (2009), démontrent en premier lieu que l'expression de la protéine de fusion pgsA-K99 à la surface cellulaire de *Lactobacillus casei* contenant pLA ne présentait pas de propriétés antigéniques, mais *Lactobacillus casei* contenant pLA-K99 pouvait être reconnu par des antisérums spécifiques. De plus, le plasmide recombinant pLA-K99 dans *Lactobacillus casei* a une bonne séparation et stabilité structurelle, et ne montre aucun réarrangement structurel dans la protéine exprimé. En second, l'immunogénicité d'ETEC K99 à la surface de *Lactobacillus casei*, des souris BALB/c (45 souris par groupe, réparties en 4 groupes) est représenté par un niveau d'IgG plus élevé, détecté peu de temps après la troisième immunisation (jour 28, $p < 0,01$), et qu'après la quatrième immunisation, une nouvelle augmentation du titre d'IgG est observée (jour 56, $p < 0,01$). En plus, des profils similaires de réponse aux anticorps sont observés pour les immunisations intranasales et orales, et à la fin de l'immunisation, le titre sérique moyen d'IgG des deux groupes expérimentaux était plus de 1000 fois supérieure à celui du groupe témoin. Il n'y avait pas de différence significative dans les titres d'anticorps entre les groupes de vaccination orale et intranasale. Aussi pour l'évaluation de la réponse immunitaire de la muqueuse, le niveau d'IgA spécifique de K99 est déterminé dans le liquide de lavage intestinal, vaginal et broncho-alvéolaire par ELISA indirect et les IgA fécales étaient inférieures au liquide d'irrigation intestinale. La raison peut être que le niveau d'IgA dans les selles ne reflète pas avec précision le niveau dans l'intestin, mais les deux ont la même tendance. Les titres d'anticorps étaient plus élevés au site d'immunisation chez tous les groupes alors que seuls les niveaux d'anticorps de fond ont été détectés chez le groupe témoin (Wei *et al.*, 2009).

Au finale, Wei *et al.* (2009), démontrent l'efficacité de la protéine fimbriae ETEC K99 exposée à la surface de *Lactobacillus casei* non pathogène et résistante à l'acide gastrique dans le déclenchement des réponses immunitaires systémiques et muqueuses. Le vecteur vaccinal recombinant multivalent idéal devrait être capable d'induire des réponses systémiques liées à la protection contre de multiples agents pathogènes, et devrait également induire des IgA sur la surface muqueuse pour empêcher les agents pathogènes d'entrer dans le corps. *Lactobacillus casei* peut être un système d'administration muqueuse efficace pour les antigènes bactériens et

viraux. Cependant, avant que les LAB recombinantes puissent être utilisées chez l'homme, il est nécessaire d'augmenter la puissance de ce système (c'est-à-dire pour obtenir réponses d'anticorps de haut niveau à une variété d'antigènes avec moins dose) et de démontrer des réponses immunitaires de niveau protecteur chez différents modèles animaux. Il est également nécessaire de construire des souches pour humain ou animal qui satisfera aux exigences de sécurité du règlement d'organes aléatoires (Wei et al., 2009).

En perspectives, il serait important d'utiliser des LAB génétiquement modifiées en essais chez l'homme, avec des améliorations devraient se produire à différents niveaux, tels que ; la nature de la molécule délivrée ; le Genre de l'espèce du groupe de bactéries lactiques (par exemple, *L. casei* semble présenter certains avantages par rapport à *L. lactis*, et le système d'expression présente des avantages en augmentant le nombre de molécules délivrées in situ. Étant donné que l'avenir des stratégies de prévention et de traitement basées sur les *Lactococcus* et *Lactobacillus* recombinants doit prouver clairement leur efficacité dans de tels essais cliniques humains, ce qui conduira à leur meilleure acceptation, et de tels efforts devraient et doivent être faits.

Reference

_A

Acres SD, Isaacson RE, Babiuk LA, Kapitany RA. (1979). Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole-cell bacterins. *Infect Immun* ;25:121–6.

Adel-Patient K, Nahori MA, Proust B, et al (2003). Elicitation of the allergic reaction in betalactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clin Exp Allergy*, 33(3): 376-85.

Alexandersen S (1996). Advantages and disadvantages of using live vaccines risks and control measures *Acta Vet Scand Suppl*, 90:89-100.

Alves AM, Lasaro MO, Almeida DF, Ferreira LCS. (1998). Immunoglobulin G subclass responses in mice immunized with plasmid DNA encoding the CFA: I fimbria of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Immunol Lett*; 62:145–9.

Ameho, C.K., Adjei, A.A., Harrison, E.K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y. et al. (1997). Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*, 41 : 487-493.

Anonyme : Actualités Pharmaceutiques ; June (2013). Volume 52, Issue 527, Pages 57-60

_B

Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D.W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J.P. et al (2006). 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*, 4(6):754-9.

Baker, C.C., Phelps, W.C., Lindgren, V., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Howley, P.M (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*, 61: 962-971.

Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., and Guédon, G. (2013). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*

Bermúdez-Humarán LG. (2009). *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Hum Vaccin* ; 5(4) : 264-7

Bermúdez-Humarán LG, Corthier G, Langella P. (2004). Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res Devel Microbiology*; 8:147-60

Bermúdez-Humarán LG, Corthier G, Langella P. (2004). Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res Devel Microbiology* ;8 :147-60

Bermúdez-Humarán LG, Pascale Kharrat, Jean-Marc Chatel, Philippe Langella (2011). Les lactocoques et les lactobacilles comme vecteurs muqueux d'administration de protéines thérapeutiques et de vaccins à ADN ; Egmond aan Zee, Pays-Bas ; p : 10

Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymege, A., Decaris, B., and Guédon, G. (2011). Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. *Mol. Microbiol.* 81, 912–925.

Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, et al (2002). Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 68(2):917-22.

Bermudez-Humaran, L.G., Langella, P., Commissaire, J., Gilbert, S., Le Loir, Y., L'Haridon, R., Corthier, G., (2003a), Controlled intra- or extracellular production of Staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 224 : 307-313.

Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, et al (2004b). 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*, 53: 427-33.

Bermudez-Humaran, L.G., Cortes-Perez, N.G., Lefevre, F., Guimaraes, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J.M., Gratadoux, J.J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S., Corthier, G., Gruss, A., Langella, P., (2005). 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. *Journal of Immunology*, 175 : 7297-7302.

Bouasria Benbouziane (2014) utilisation des bactéries lactiques lactiques comme vecteurs de de proteines d'interet medical. Université Abdelhamid Ibn Badiss-Mostaganem. P: 24-29.

Brandtzaeg P. (1994). Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulinproducing cells. In: Pearay OL, Metecky H, editors. Handbook of mucosal immunology. Boston, MA: Academic Press; p. 251–79.

Brøndsted, L. et K. Hammer. (2006). Phages of *Lactococcus lactis*. Dans: *The Bacteriophages*, Second Edition. R. Calendar. (eds) Oxford University Press. p. 572-592.

Buist G., de Jong A., Kok J., Kuipers O., Leahy S., Fitzgerald G., van Sinderen D., Wegmann U., Shearman C., Gasson M., (2002). Genome comparison of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris and ssp. lactis. Poster at Seventh symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan Zee, the Netherlands, September, 1–5.

_C

Chandry, P. S., S. C. Moore, J. D. Boyce, B. E. Davidson et A. J. Hillier. (1997). Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol. Microbiol.* **26**:49-64.

Charbonnel P., Lamarque M., Piard J.C., Gilbert C., Juillard V., Atlan D., (2003) Diversity of oligopeptide transport specificity in *Lactococcus lactis* species: A tool to unravel the role of OppA in uptake specificity, *J. Biol. Chem.* **278** 14832–14840.

Charlotte Tanguy Goarin .Virginie Cogulet. (2010). Administration des médicaments par voie sous-cutanée en soins palliatifs ; Therapies ; Volume 65, Issue 6, November–December 2010, Pages 525-532

Castellsagué X (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, **110**: S4-7
Cortes-Perez, N.G., Lefevre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P., and BermudezHumaran, L (2007). Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine*, **25**: 6581-6588.

Cesta MF (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, **34**(5):599-608.

Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells (2008). Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **52**(1) :2-12.

Cottenot F. et Merklen F.Pierre,(1968). Immunofluorescence et detection d'anticorps sériques dans la lèpre ; P : 113.

Crutz-Le Coq, A. M., B. Cesselin, J. Commissaire et J. Anba. (2002). Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages. *Microbiology* **148** :985-1001.

Cui ZD., Tristram D., La Scolea LJ., et al. (1991). Induction of antibody response to *Chlamydia trachomatis* in the genital tract by oral immunization, *Infect Immun* ; **59** : 1465- 9

_D

Davidson A.L., (2002) Structural biology. Not just another ABC transporter, *Science* **296** 1038–1040.

De Jong, A., van Poelgeest, M.I., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Fleuren, G.J., Melief, C.J. *et al* (2004). Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*, 64: 5449-5455.

De Vos WM. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol*; 2:289–95.

Denis F., Alain S., Ploy MC. (2007). Nouvelles voies d'administration Vaccinations par voie épidermique, intradermique, muqueuse *MEDECINE/SCIENCES*. 23: 379-85

Detmers F.J.M., Kunji E.R.S., Lanfermeijer F.C., Poolman B., Konings W.N., (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oli-gopeptide transport system of *Lactococcus lactis*, *Biochemistry* 37 16671–16679.

Detmers F.J.M., Lanfermeijer F.C., Abele R., Jack R.W., Tampe R., Konings W.N., Poolman B., (2000) Combinatorial peptide libraries reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 12487–12492.

Deveau, H., S. J. Labrie, M-C. Chopin et S. Moineau. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** :4338-4346.

Dimopoulou, I.D., Kartali, S.I., Harding, R.M., Peto, T.E.A., and Crook, D.W. (2007). Diversity of antibiotic resistance integrative and conjugative elements among haemophili. *J. Med. Microbiol.* 56, 838–846.

Dr. GHARBI.M. (2016). Les voies d'administration des médicaments, P : 1-5

Dupont, K., F. K. Vogensen et J. Josephsen. (2005). Detection of lactococcal 936-species bacteriophages in whey by magnetic capture hybridization PCR targeting a variable region of receptorbinding protein genes. *J. Appl. Microbiol.* **98** :1001-1009.

Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubière et A. Gruss. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* **183**:4509-4516.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E (1989). The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243 : 934-937.

_E

Eloit M. (1998). Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. *Productions animales*, Institut National de la Recherche Agronomique, (hal-02694704), 11 (1), pp.5-13.

Elleuch Zghal H. (2004). Centre Régional du Transfusion Sanguin, J.I. M. Sfax Vol.1 N°5/6 ; P : 1.

_F

Frank J., Don Chill, et Nino Maida. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey; *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4):281–370.

Furuya, E.Y., Lowy, F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 36–45.

_G

Gaillard, M., Vallaeyts, T., Vorholter, F.J., Minoia, M., Werlen, C., Sentschilo, V., Puhler, A., and van der Meer, J.R. (2006). The *clc* Element of *Pseudomonas* sp. Strain B13, a Genomic Island with Various Catabolic Properties. *J. Bacteriol.* 188, 1999–2013.

Geis, A. (2005). Perspectives of genetic engineering of bacteria used in food fermentations. Dans: *Genetically engineered food: Methods and Detection*. K. J. Heller. (eds) Wiley-VCH. p. 100-118.

Gilliland SE. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 7 (1-2) :175-88.

GOGEV S., VERSALI M.-F., THIRY E. (2003) Les chitosanes – nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHESE Ann. Méd. Vét.*, 147, 343-350

Grangette C, Muller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. (2001). Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun*; 69:1547–53.

_H

Hacker, J., and Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2, 376–381.

Hazebrouck S, Przybylski-Nicaise L, Ah-Leung S, Adel-Patient K, Corthier G, Langella P, WalJM: (2009) Influence of the route of administration on immunomodulatory properties of bovine beta-lactoglobulin-producing *Lactobacillus casei*. *Vaccine*, 27(42):5800-5805).

Hill DR; Ford L; Lallo DG. (2006). Oral cholera vaccines: use in clinical practice. *Lancet*; 6 P : 361-73.

Holmgren J, Czerkinsky C (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*, 11(4 Suppl): S45-53.

Holt, J. G., N. R. Kreig, P. H. Sneath, J. T. Staley et S. T. Williams. (1994). *Bergey's Manual of Determinative of Bacteriology*, Ninth Edition. (eds) Williams and Wilkins.

Hou XL, Yu LY, Liu JZ, Wang GH. (2007). Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine*; 26:24–31

_I

Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, et al. (1990). Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* ;58(9):2929-34.

_J

Jamet, E. (2009). Les bactéries lactiques : une composante de l'écosystème microbien des fromages. Dans : *Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles des bactéries lactiques*. D. Drider and H. Prévost. (eds) *Economica*. p. 325-348.

Juillard V., Guillot A., Le Bars D., Gripon J.C., (1998) Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 1230–1236.

_K

Kilian M, Russel MW. (1994). Functions of mucosal immunoglobulins. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego, CA: Academic Press; p. 127–43.

Kunji E.R.S., Smid E.J., Plapp R., Poolman B., Konings W.N., (1993) Di-tripeptides and oligo-peptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 175 2052–2059.

_L

Labrie, S. et S. Moineau. (2000). Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** :987-994.

Leclerc J. (2011). LA VACCINATION : Histoire et conséquences épidémiologiques, université de limoges faculté de pharmacie, P : 10

Lack G (2008). Clinical practice. Food allergy. *N Engl J Med*; 359(12) :1252-60.

Lanfermeijer F.C., Picon A., Konings W.N., Poolman B., (1999) Kinetics and consequences of binding of nona- and dodecapeptides to the oligopeptide binding protein (OppA) of *Lactococcus lactis*, *Biochemistry* 38 14441–14450.

Latorre-Guzman, B. A., C. I. Kado et R. E. Kunkee. (1977). *Lactobacillus hordniae*, a new species from the leafhopper (*Hordnia circellata*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27** :362-370

Le Loir Y, Gruss A, Ehrlich SD, et al (1996). Direct screening of recombinants in gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *J Bacteriol*, 1;178(14):4333

Lee JS, Poo H, Han DP, Hong SP, Kim K, Cho MW, et al. (2006). Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *J Virol*;80(8):4079–87.

Lichter T. et Glick Roberta P. (2012). Immunogene therapy. *Glioma*, 151-165

Lister, J. (1878). On the lactic fermentation and its bearing on pathology. *Trans Path. Soc.*29:425-467.

Ljungh A, Wadström T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*, 7(2):73-89.

Loof, M., J. Lembke et M. Teuber. (1983). Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* "subsp. *diacetylactis*" bacteriophage P008 wide-spread in german cheese factories. *Syst. Appl. Microbiol.*4 :413-423.

_M

Ma Hongbao, Shieh Kuan-Jiunn (2006). ELISA Technique ; *Nature and Science*, 4 (2), P : 36

Mammette A. (2002). *Virologie médicale*, presses universitaires de Lyon ; chapitre13 ; les vaccins viraux ; P : 245-262

Magi B. et Liberatori S. (2005). Immunoblotting techniques; *Methods Mol Biol*; 295:227-54.

Marcela A. (2013). Engineering of Lactic Acid Bacteria strains modulating immune response for vaccination and delivery of therapeutics; *Université Paris Sud*

Masanori I, Yoko Y, Satoshi K, Tooru T, Keiko M, Jun-ichi M, et al. (2000). Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*; 18:743–51.

Mater DD, Corthier G. (2004). Response of lactic acid bacteria to the digestive environment. *J Clin Gastroenterol* 38(6 Suppl): S64-6.

Maxime Bélanger, (2014) Caractérisation du système anti-phage *AbiQ* de *Lactococcus lactis*. *université Laval* ; P : 9-10.

Medina E, Guzman CA. (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitation. *Vaccine*; 19:1573–80.

Metzger DW (2009). IL-12 as an adjuvant for the enhancement of protective humoral immunity. *Expert Rev Vaccines*, 8(5) :515-8.

Mierau, I., E. R. S. Kunji, G. Venema et J. Kok. (1997). Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnol. Genet. Eng.* 14:279-301.

Miyoshi A., Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, Azevedo V. (2004). Xylose inducible expression system for *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett. 239 (2): 205-225.

Moisan, M. et S. Moineau. (2012). Multilocus sequence typing scheme for the characterization of 936like phages infecting *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:4646-4653.

Murray PD, McKenzie DT, Swain SL, Kagnoff MF. (1987). Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol*; 139:2669–74.

_N

Neutra MR, Kozlowski PA. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*; 6: 148-58.

Norton PM, Wells JM, Brown HW, Macpherson AM. (1997). Le Page RW: Protection against tetanus in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine*, 15(6-7):616-619. - 24. Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, Le Page RW: Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 1997, 15(7) :653-657.)

Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, et al. (2003). Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res*; 2(1):102-11.

_O

O'Garra A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8 :275-83.

_P

Pharmacopée européenne, (2009). Monographie : Vaccins pour usage humain. 7e édition, 01/2009 : 0153. P. 756.

Phalipon A, Sansonetti PJ. (1998). Microbial- host interactions at mucosal sites. Host response to pathogenic bacteria at mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol*; 236 P: 163-89.

Phalipon A, Sansonetti PJ. (1998). Microbial-host interactions at mucosal sites. Host response to pathogenic bacteria at mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol*; 236 P: 907.

Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, et al (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, 179(9):3068-72.

Picon A., Kunji E.R., Lanfermeijer F.C., Konings W.N., Poolman B., (2000). Specificity mutants of the binding protein of the oligo-peptide transport system of *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 182 1600–1608.

Plotkin SA. (2011). History of Vaccine Development, Springer, New York 12283-12287

_R

Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Stuart, G.S., Lamont, I.L., and Ronson, C.W. (2006). Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol.* 62, 723–734.

Robinson et coll. (1997). Vaccins recombinants vivants multivalants et vaccins ADN.P : 199–209

Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, et al (1997). Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol*;15 (7):653-657.

Rostom A.A., Tame J.R.H., Ladbury J.E., Robinson C.V. (2000). Specificity and interactions of the protein OppA: partitioning solvent binding effects using mass spectrometry, *J. Mol. Biol.* 296 269–279.

Rousseau, G. M. et S. Moineau. (2009). Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a cheese factory. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 :5336-5344.

_S

Scheppler L, Vogel M, Zuercher AW, Zuercher M, Germond JE, Miescher SM, et al. (2002) Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*; 20:2913–20.

Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, et al (2008). An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*, 26 Suppl 10: K53-61.

Schliefer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M. D. Collins et W. Fischer. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:183-195.

Sciara, G., C. Bebeacua, P. Bron, D. Tremblay, M. Ortiz-Lombardia, J. Lichière, M. van Heel, V. Campanacci, S. Moineau et C. Cambillau. (2010). Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:6852-6857.

Seegers JF. (2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol*, 20(12) :508-515.)

Siegers K, Entian KD. (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol* ;61(3) :1082-9.

Site WEB :

<https://professionnels.vaccination-info-service.fr/Aspects-scientifiques/Compositions-des-vaccins/Vaccins-inactives>

Site WEB: www.cnrs.fr

Smit G., Smit B.A., Engels Wim JM. (2005). formation de la saveur par les bactéries lactiques et profilage biochimique de la saveur des produits fromagers ; revues microbiologie FEMS, V 29, ; P : 591-610 .

Smit, B. A., W. J. Engels et G. Smit. (2009). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**:987-999.

Smotkin, D., and Wettstein, F.O (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 4680-4684.

Stackebrandt E, Teuber M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*; 70(3) :317-24.

_T

Tame J.R.H., Dodson E.J., Murshudov G.N., Higgins C.F., Wilkinson A.J., (1995). The crystal structures of the oligopeptide binding protein OppA complexed with tri- and tetrapeptide ligands, *Structure* 3 1395–1406.

Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M., and Ito, Y (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol*, 63: 1465-1469.

Tynkkynen S., Buist G., Kunji E., Kok J., Poolman B., Venema G., Haandrikman A.J., (1993) Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 175 7523– 7532)

_U

U.Heininger, NS.Bachtiar, P.Bahri, A.Danad, A.Dodoo, J.Gidudu. (2012). The concept of vaccination failure. *E. Matos dos Santos vaccin* 30 (7), P : 1265-1268.

_V

Van Asseldonk M, de Vos WM, Simons G (1993). Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous alpha-amylase. *Mol Gen Genet*, 40:428–434.

Vedamuthu, E. R., B. A. Hauser, D. R. Henning, W. E. Sandine et P. E. Elliker. (1966). Flavor and texture in Cheddar cheese. I. Role of mixed strain lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.* **49**:144-150.

Von Wright, A. (2012). Genus *Lactococcus*, Dans: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fourth Edition. S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, S. Salminen et A. Von Wright. (eds) CRC Press. p. 63-76

_W

Warrino, D.E., Olson, W.C., Knapp, W.T., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S. et al (2004). Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res*, 10: 3301-3308.

Warrino, D.E., Olson, W.C., Scarrow, M.I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R.S., Da Silva, D.M. et al (2005). Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro. *Hum Immunol*, 66: 762-772.

Wei Chun-Hua, Liu Jian-Kui, Hou Xi-Lin, Yu Li-Yun, b, Lee Jong-Soo, Kim Chul-Joong (2009). Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99; P: 4113-4118.

Wells J.M., Wilson P.W., Norton P.M Gasson J.M. (1993). *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challeng. *Mol. Microbiol.* 8: 1155-1162

Wells, JM, Mercenier, A. (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 6:349---62

Wozniak, R.A.F., and Waldor, M.K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 552

Wu C, Yang G, Bermúdez-Humarán LG, et al (2006). Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Int Immunopharmacol*, 6(4): 610-5.

Wu H. Y., Russell M. W. (1993) Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* ;61 :314–22.

Y

Yoann Perrin, (2014). Potentiel de transformation de souches d'intérêt de *Streptococcus salivarius* pour l'étude du transfert d'Eléments Intégratifs et Conjugatifs ; Université de Lorraine, P : 1-2

Z

Zwerschke, W., and Jansen-Durr, P (2000). Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res*, 78: 1-29.

Annexe

Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99

Chun-Hua Wei^a, Jian-Kui Liu^a, Xi-Lin Hou^a, Li-Yun Yu^{a,b,*}, Jong-Soo Lee^c, Chul-Joong Kim^d

^a *College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang Province, 163319, China* ^b *College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang Province, 163319, China*

^c *Department of Molecular Microbiology and Immunology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Harlyne J. Norris Cancer Research Tower, 1450 Biggy Street, Los Angeles, California 90033, USA* ^d *National Lab of Oral Vaccine, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea*

Article history:

Received 9 January 2009

Received in revised form 26 May 2009

Accepted 31 May 2009 Available online 17 June 2009

1. Introduction

Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) strains can produce fatal diarrhea in neonatal calves. These organisms possess at least two known virulence factors: production of enterotoxins, which produce diarrhea by a mechanism of villous hypersecretion [1], and surface antigens such as pili or fimbrial adhesins, which facilitate colonization of the small intestine. The K99 pilus antigen is one of the major adherence factors found on ETEC of neonatal calves [2,3]. Conventional vaccines against bovine ETEC have been shown to provide varied immunity, and the effectiveness of these vaccines has been described only in anecdotal reports [4]. Limited protection with purified K99 fimbriae or formalin-inactivated ETEC has been demonstrated [5–7], but the need for an efficacious vaccine against bovine ETEC still exists [4]. The development of effective strategies for the mucosal delivery of vaccine antigens has received considerable attention over the past decade, because this route of administration has the potential to elicit local immune responses at mucosal surfaces, the major portals of entry to the body for many pathogens [8]. The key effector molecule of the mucosal immune response is secretory immunoglobulin A (sIgA), which can play a key role in protecting against infection by inhibiting viral infectivity and bacterial colonization and by neutralizing the activity of microbial toxins [9–12]. For mucosal immunization, lactic acid

bacteria (LAB) are more attractive as delivery vehicles than other live-vaccine vectors (e.g., Shigella, Salmonella, and Listeria) [13–16] because LAB are considered safe, they exhibit adjuvant properties, and they are weakly immunogenic [17–20]. In addition, extracellularly accessible antigens expressed on the surfaces of bacteria are better recognized by the immune system than those that are intracellular [14].

For surface display of antigens on LAB, we have developed an expression vector using the pgsA gene product as an anchoring matrix. The pgsA is a synthetase complex (PGS system) of *Bacillus subtilis* [21], and functions as a fusion partner for expression of heterologous antigens on the surface of *L. casei* [22]. The K99 fimbriae were inserted into the vector pLA, then expressed on the surface of *L. casei*. Intranasal and oral vaccination of mice with the live recombinant *L. casei* elicited high levels of systemic serum antibodies and local mucosal immunity against the antigen K99 fimbriae. The results of this study suggest a potential use for the surface expression system to construct ETEC K99 and against other diarrhea pathogens and respiratory system diseases that are transmitted mucosally.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

E. coli C83912 isolated from a calf with intestinal infection in Japan was purchased from China Center of Veterinary Culture Collection (CVCC), Beijing, China. *E. coli* XL1-Blue was used for construction of the expression vectors. The bacteria were cultivated in Luria-Bertani medium or on Luria-Bertani agar plates and grown at 37 °C. *L. casei* was grown at 37 °C in MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) where appropriate antibiotics were added. For *L. casei*, chloramphenicol was used at final concentrations of 10g/ml, in case of *E. coli*, ampicillin, 100g/ml.

2.2. Plasmids and transformation

The minimal surface display plasmid, pLA-K99 were constructed. The 498bp DNA fragment encoding the fimbriae protein of K99 was amplified with 5CGCGGATCCATGAAAAAGACTCTGA3 and 5CGCAAGCTTTTACATATAAGTGACT3, digested by BamHI and HindIII, and inserted into the vector pLA which mainly includes HCE constitutive promoter and pgsA-tag gene. The resulting plasmid, in which the fusion protein of the pgsA-K99 was expressed as described previously [23], was designated pLA-K99.

L. casei isolated from Chinese food. Transformation of *L. casei* was performed by electroporation. The sample was subjected to a 2.2kV, 200-, 25-F electric pulse in a 0.2-cm cuvette, using a Gene Pulser (Bio-Rad, Richmond, Calif.). As a negative control, *L. casei* was transformed with an empty shuttle vector to generate pLA/*L. casei*.

2.3. Immunoblotting, immunofluorescence microscopy and flow cytometry

The recombinant *L. casei* cells were grown at 37 °C. Protein extractions were performed as previously described [5]. For immunodetection of fusion proteins, mouse anti-pgsA (1:1000)

and mouse anti-K99 (1:800) were used. Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin G (IgG) was used as a secondary antibody. After washing the membranes with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), the membranes were treated with Streptavidin-HRP complex (Vectastain ABC Kit, Vector Lab, USA) following the manufacturer's instructions. Visualization of immunobinding was carried out with diaminobenzidine (DAB) solution (Vector Lab, USA). For immunofluorescence microscopy, cells labeled with anti-K99 polyclonal antibodies and FITC conjugated anti-mouse antibodies were examined using a Carl Zeiss Axioskop 2 fluorescence microscope. Photographs were taken with an AxioCam high-resolution camera using identical exposure times. For flow cytometry, *L. casei* cells were cultured in MRS broth (Difco) overnight at 37 °C. The cell pellets were sequentially incubated with mouse anti-K99 polyclonal antibodies (1:800) and FITC-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies (1:5000; Sigma, St. Louis, MO). Finally, 3×10^4 cells were analyzed with FACS Calibur (Becton Dickinson, Oxnard, CA) equipped with Cell Quest software.

2.4. Immunization of mice

SPF mice (BALB/c, female, five weeks old) were obtained from Vital River Laboratories, Beijing, China. These animals were raised and used according to the animal protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Animals were placed in individual cages with autoclaved food and water available ad libitum. All animals were housed in aseptic room. Mice were acclimated to the new environment for one week after arrival prior to immunization. To study the possibility of the surface-displayed ETEC K99 proteins to induce the mucosal immunity in mice, the method of Jong-Soo Lee [22] was employed.

BALB/c mice (45 per group in 4 groups) were immunized orally or intranasally with an equal amount of live *L. casei* that express recombinant K99 protein from plasmid pLA-K99. *L. casei* harboring the parental plasmid pLA was used as a negative control. For the oral route, 5×10^9 pLA-K99/*L. casei* cells in 100 μ l suspension were administered daily via intragastric lavage on days 0–4, 7–11, 21–25 and 49–53. For the intranasal route, 2×10^9 pLA-K99/*L. casei* cells in 20 μ l suspension were administered into nostrils of lightly anesthetized mice on days 0–2, 7–9, 21 and 49.

2.5. Sampling

Blood samples were collected from the tail vein on days 0 (preimmune), 14, 28, 42, 56, 70 and 84. Sera were prepared from the blood and stored at -20 °C until they were analyzed.

Fecal samples were collected every week. Fecal pellets (100mg) were suspended in 0.5ml PBS. After centrifugation at $15,000 \times g$ for 5min, the supernatants were collected and tested for IgA by ELISA.

To obtain intestinal lavage samples, 7 mice were sacrificed on days 56, 70 or 84. Following the method of Wu and Russell [24], gut lavage fluids were obtained by flushing the excised small intestine with 3ml of PBS containing 50mM EDTA and 0.1mg/ml of soybean trypsin–chymotrypsin inhibitor (Sigma). The contents were collected and retained on ice for processing, whereupon the fluids were vortexed and centrifuged at $650 \times g$ for 10min at 4 °C. A 30 μ l volume of 100mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma) was added to the supernatants before they were vortexed and spun at $27,000 \times g$ for 20min at 4 °C. A further 20 μ l of PMSF, 100 μ l of fetal bovine serum (FBS) and 20 μ l of 1% sodium azide (Sigma) were added to the supernatants before they were dispensed into aliquots and frozen.

Lung lavage fluids were obtained post mortem by inserting a nylon cannula into the exposed trachea, which was tied in place. A hypodermic needle and syringe were attached and used to inject and withdraw 0.7ml of 2mM PMSF in PBS three times. The fluid samples were retained on ice before centrifugation at 27,000× g for 20min at 4 °C, and the supernatants were then stored in aliquots at -20 °C.

The vaginal fluids were obtained by washing the vagina three times with 0.5ml of ice-cold saline containing protease inhibitors. Samples were centrifuged at 2500× g for 20min at 4 °C, and the supernatants were stored at -20 °C until they were analyzed.

2.6. ELISA

Antibody titers in serum, fecal samples, lung lavage, intestinal lavage and vaginal fluids were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described [22].

ELISA was performed three times for each serum sample. End point titers were defined as the maximum dilutions giving an A450 measurement of 0.1. This cutoff value represents the mean optical density plus 2 standard deviations of 10 normal mouse serum samples tested at 1:50 dilution. Statistical comparison was made using the Mann-Whitney U-test.

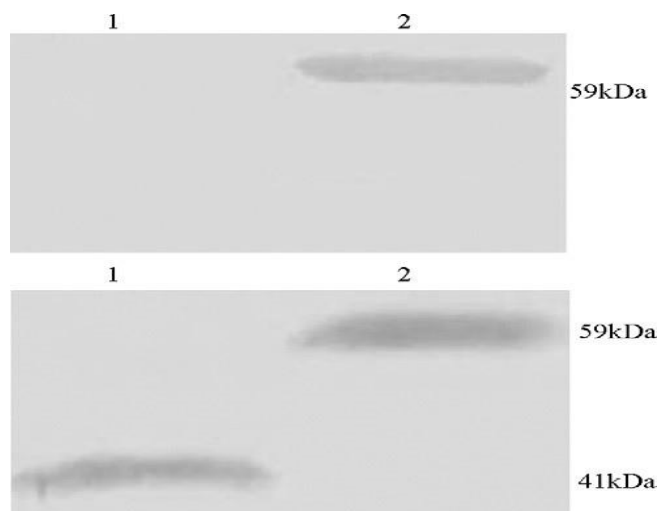


Fig. 1. Detection of pLA-K99 expressed in *Lactobacillus casei* by Western Blot with anti-K99(a) and anti-pgsA (b) polyclonal antibodies. Lane 1 shows whole-cell lysates of standard-type (parental vector); lane 2 shows the recombinant *L. casei*. Protein bands of 59kDa, corresponding to the expected size of pgsA-K99 were detected.

2.7. K99 adhesive fimbriae challenge experiment

The challenge experiment against intranasal or oral immunity was performed at when intranasal or oral immunity was at 3 week and 9 weeks after the last immunization, with 200l of C83912 which had a titer of 2×10^3 LD50 ml⁻¹ (6×10^{11} CFU). Deaths were recorded and surviving mice were maintained for 20 days post challenged. The healthy mice without signs of diarrhea were judged protected. The difference in survival was calculated by the log rank test with SPSS software.

3. Results

3.1. Expression of pgsA-K99 fusion protein on the cell surface

The pgsA-K99 fusion protein was analyzed by Western blotting. Fig. 1 shows the analysis of the whole-cell lysate of *L. casei* cells harboring the plasmid pLA-K99. The respective molecular sizes of the pgsA and ETEC K99 proteins were approximately 41kDa and 18kDa, therefore giving the pgsA-K99 fusion protein an approximate size of 59kDa. A clear band of the fusion protein was observed at the estimated molecular size, indicating the successful expression of the fusion protein.

To determine cellular localization of the recombinant protein on the surface of *L. casei* was verified by immunofluorescence microscopy and flow cytometric analysis (Figs. 2 and 3, respectively).

Immunofluorescence labeling of the cells was performed using mouse anti-K99 antibody as the primary antibody and FIT conjugated goat anti-mouse IgG as the secondary antibody. As shown in Fig. 2, the green fluorescence of the immunostained pgsA-K99 fusion protein was observed on *L. casei* cells harboring the plasmid pLA-K99, whereas cells harboring the control plasmid pLA were not immunostained. The results indicated that ETEC K99 was displayed on the cell surface of the recombinant *L. casei* cells. In most of the cells, green fluorescence was localized around the septa of cells (Fig. 2). Flow cytometry was used to quantitatively analyze the cell surface display of ETEC K99 (Fig. 3). The cell surface displayed pgsA-K99 was stained with the primary and secondary antibodies that are similar to those used for immunofluorescence, and *L. casei* cells harboring the plasmid pLA were used as a control for flow cytometry. The cells displaying pgsA-K99 showed a significantly greater intensity of fluorescence signals than the control cells. This result is consistent with the data shown in Fig. 3.

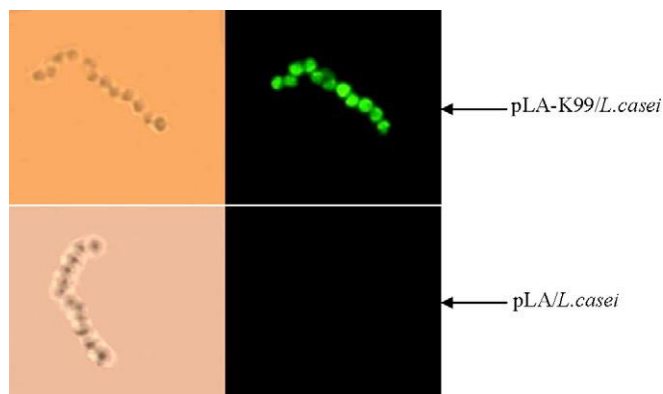


Fig. 2. Representative immunofluorescence images of control cells harboring pLA and recombinant *L. casei* cells expressing pgsA-K99. Bright-field images are shown on the left.

3.2. Systemic and mucosal immunogenicity's of hybrid proteins expressed on *L. casei*

In order to characterize the immunogenicity of ETEC K99 surface-displayed on *L. casei*, BALB/c mice (45 per group in 4 groups) were orally or intranasally administered with 5×10^9 cells/dose or 2×10^9 cells/dose of the recombinant live *L. casei*. *L. casei* harboring the parental plasmid pLA was used as a negative control. Serum samples were used for evaluating the systemic immune response by indirect ELISA. During the first two series of immunization, very low levels of IgG against ETEC K99 were detected (Fig. 4a, day 14). Higher IgG levels were detected shortly after the third immunization (day 28, $p < 0.01$). After the fourth immunization, further increase in IgG titer was observed (day 56, $p < 0.01$). Similar antibody response pattern was observed for intranasal and oral immunizations. At the end of immunization, the mean serum IgG titers in both experimental groups were over 1000 times

higher than those in the control groups. There were no significant differences in the antibody titers between the oral- and intranasal-inoculation groups.

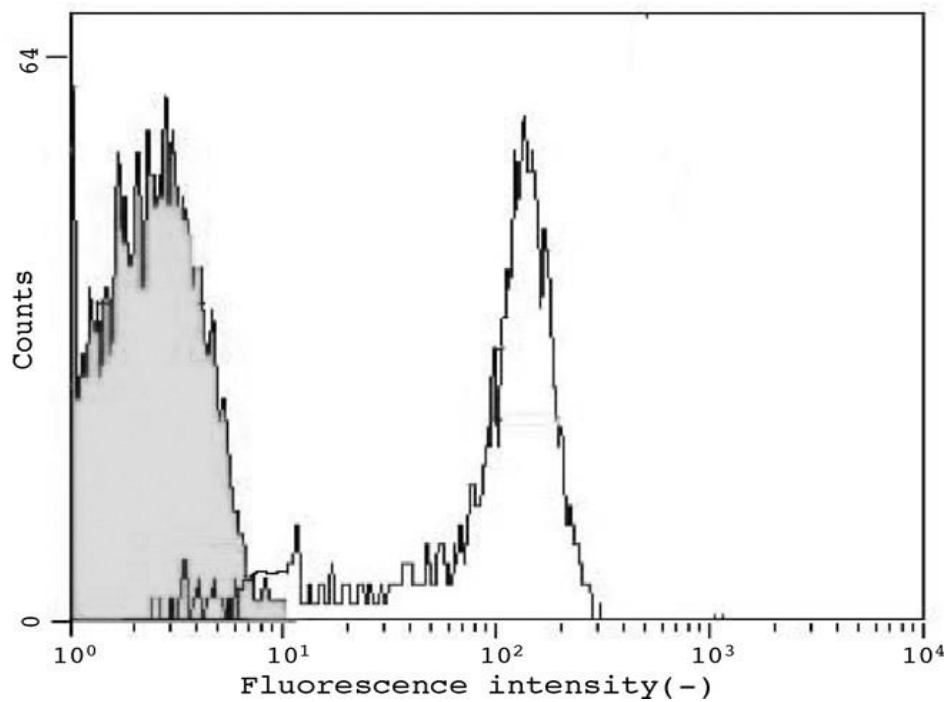


Fig. 3. Fluorescence-activated cell sorter histograms of control cells harboring pLA (filled) and recombinant (open) *L. casei* cells. The cells were probed with mouse antiK99 polyclonal antibodies, followed by biotin-conjugated anti-mouse IgG antibody and fluorescein isothiocyanate-conjugated streptavidin.

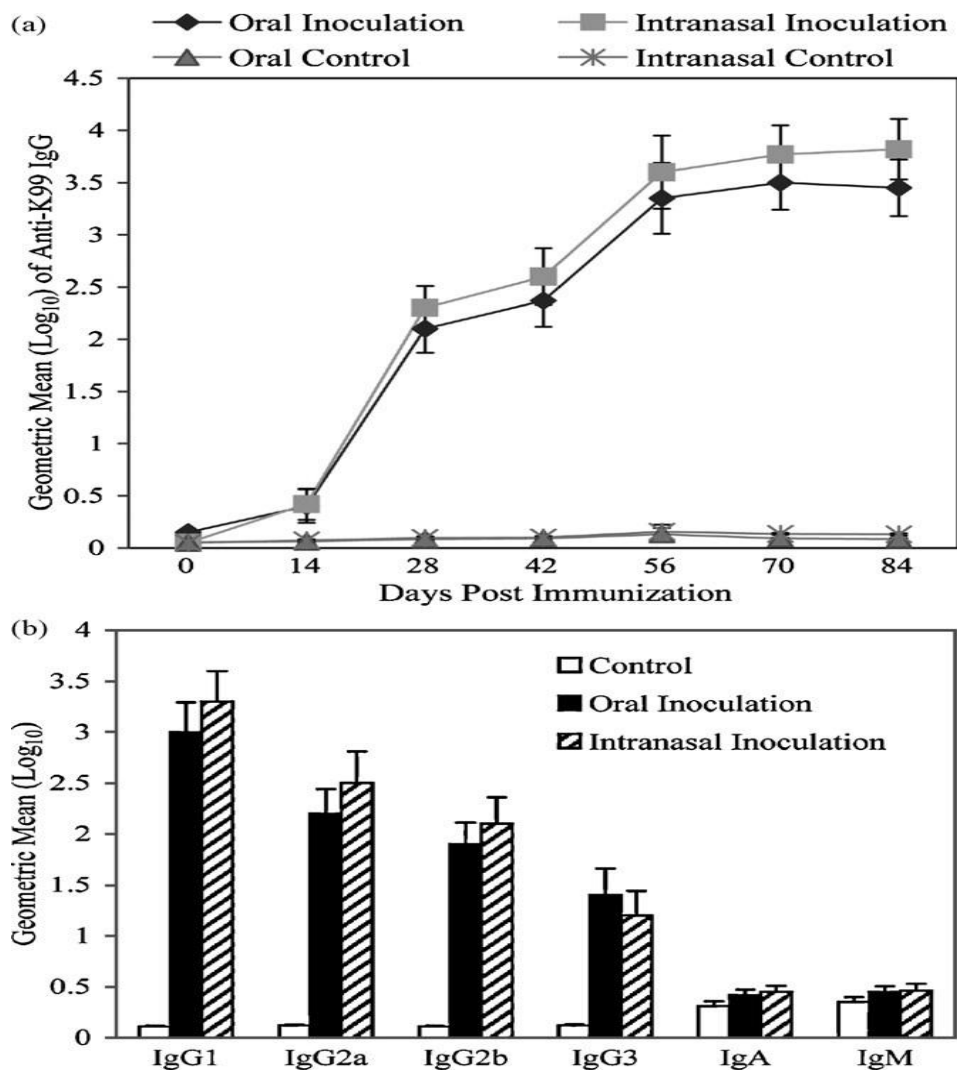


Fig. 4. Systemic anti-K99 response following mucosal immunization. Groups of 45 mice were immunized orally (rhombus) or intranasally (square) with pLA-K99/*L. casei*. Control sera were derived from vaccinated mice with parental plasmid pLA. (a) Kinetics of anti-K99 serum IgG response. ELISA was performed in triplicates using purified fimbriae peptides, and titers are defined as the reciprocal of the maximum dilution of sera yielding an absorbance equal to that of pre-immune samples. (b) Isotype profiles of anti-K99 serum antibodies. Serum samples collected on day 84 post immunization were used. End point titers were calculated as the reciprocals of serum dilutions yielding the same optical density as the 1/50 dilution of pooled pre-immune sera. The data are presented as means standard deviations. Statistical comparisons between groups were made by the Mann–Whitney U-test.

To better characterize antibody responses against K99 protein fragments, the levels of antigen-specific IgG subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) and other antibody isotypes (IgA and IgM) were assessed by indirect ELISA. Pooled immune sera collected on day 84 after the first inoculation were used. Both intranasally and orally immunized mice developed K99 protein-specific antibodies that were predominantly IgG1 and IgG2a, with moderate levels of IgG2b (Fig. 4b). The mean titers of these subtypes were significantly different from the baseline titers in the control group ($p < 0.01$). In contrast, no significant differences were observed for IgA and IgM isotypes.

To assess mucosal immune responses, K99-specific IgA levels in intestinal, vaginal and bronchoalveolar lavage fluids were determined by indirect ELISA. Fluids collected on days 56, 70 and 84 after the first inoculation was examined using purified fimbriae peptides. Both intranasal and oral immunisations elicited K99-specific

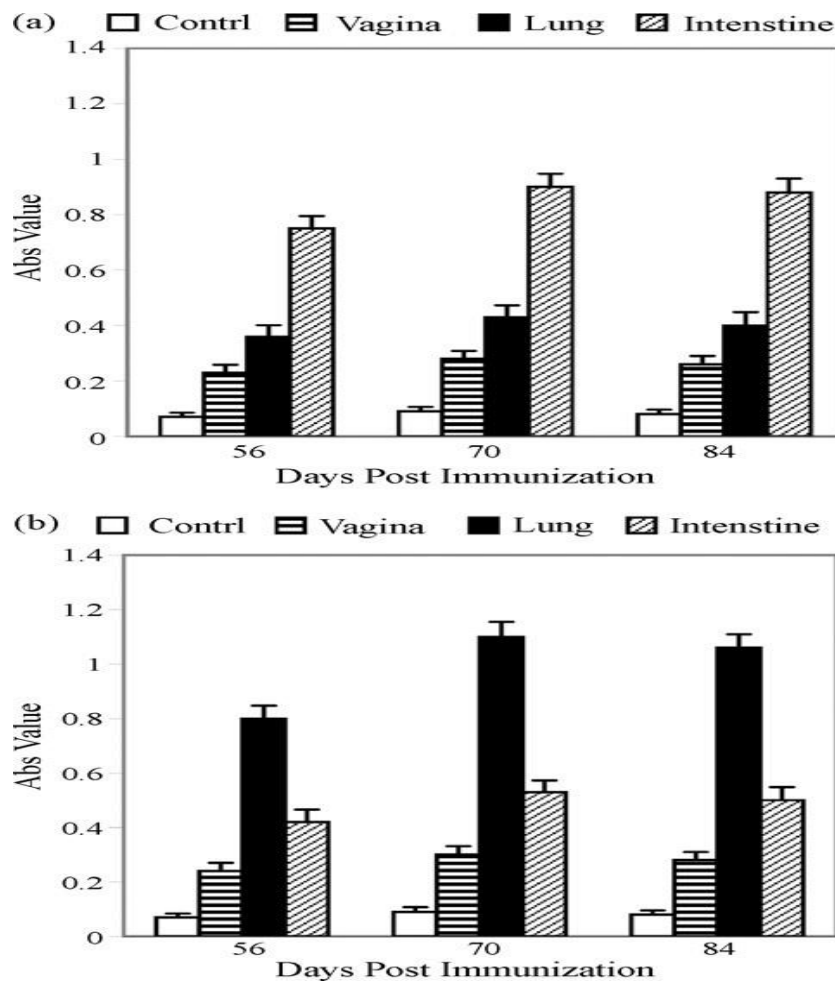


Fig. 5. Anti-K99 mucosal IgA antibody responses. Intestinal, vaginal and lung lavage fluids, harvested from mice sacrificed 56-, 70- or 84-days post immunization, were analyzed by ELISA in triplicates. Absorbance 450nm of samples from animals immunized orally (a) or intranasally (b) are shown. Fluids from control animals are shown as white bars. The error bars represent standard deviations.

mucosal IgA responses at the site of inoculation, as well as the remote mucosal site (Figs. 5 and 6). The fecal IgA was showed lower level than that of intestinal lavages. The reason may be IgA level in fecal could not accurately reflect the level in intestine, but both of

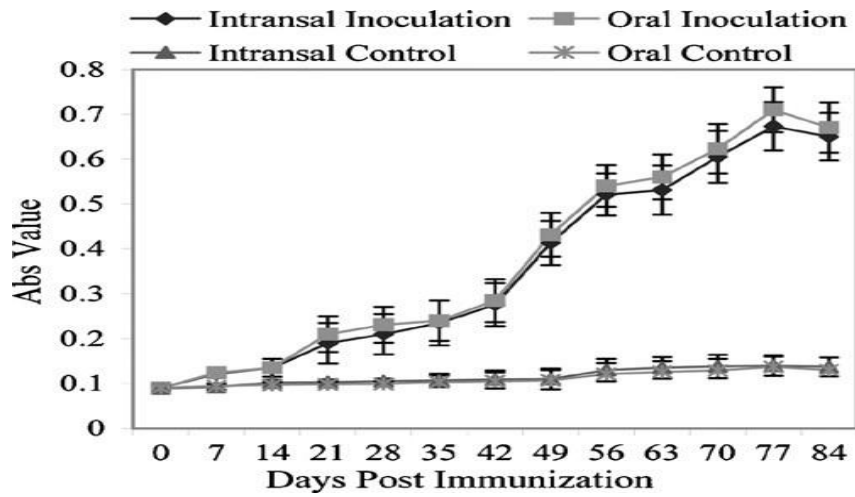


Fig. 6. Anti-K99 mucosal IgA antibody responses. Fecal samples collected every week post immunization were analyzed by ELISA in triplicates. Absorbance 450nm of samples from animals immunized orally (rhombus) or intranasally (square) and control animals (triangle) are shown. The error bars represent standard deviations.

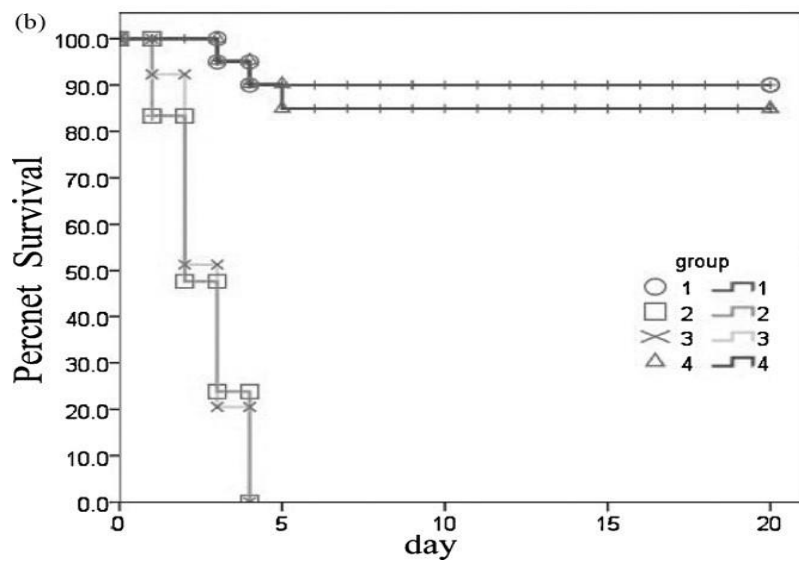
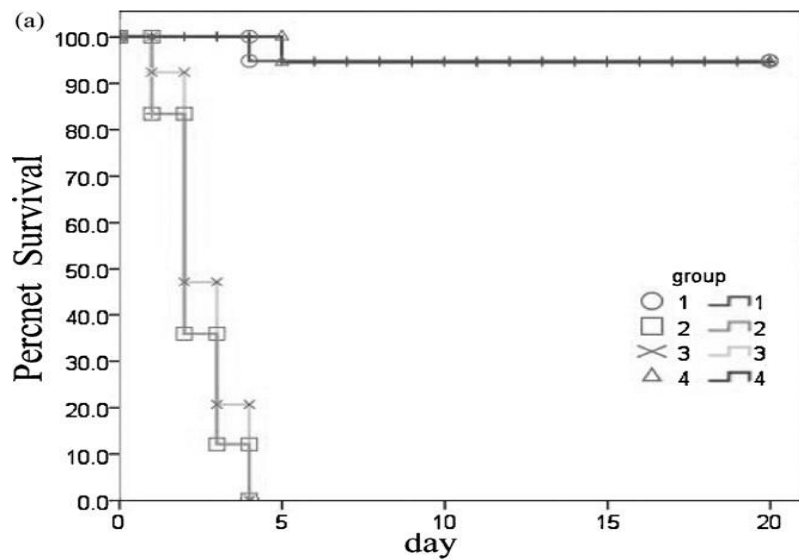


Fig. 7. Survival of BALB/c mice immunized with pLA-K99/*L. casei* following a subsequent challenge with the parental standard-type strain. Survival of immunized mice is represented with solid lines, while that of control mice is shown with dashed lines. 100% mortality were observed for the group immunized with a control pLA/*L. casei* (group 1: oral vaccinated; group 2: oral control; group 3: intranasal control; group 4: intranasal vaccinated).

them had the similar trend. Not surprisingly, greater antibody titers were detected at the locality of immunization. In contrast, only background levels of antibodies were detected in control animals.

3.3. Efficacy of the ETEC K99 fimbriae protein expressed in the recombinant live *L. casei*

On day 75 (3 week after the last booster immunization) 12 immunized mice per group were orally challenged with 2×10^3 LD₅₀ (6×10^{11} CFU) of C83912. The post infection survival rates of vaccinated and naive mice are compared in Fig. 7a. While 100% of control mice died after challenge with the C83912 strain. All the mice developed diarrhea in the control group after challenged. These died animals were dissected and the intestines appeared severe pathologic changes, which the *E. coli* C83912 were isolated (data not showed). More than 90% of immunized mice survived regardless of the immune route.

In order to prove that protection of mice was due to specific immunity and not to a nonspecific cellular immune response mediated by the presence of the vaccine strain in the host organs, the same experiment with a longer time interval between the last booster immunization and the challenge was repeated. Groups of 12 mice vaccinated as described above were orally challenged with 2×10^3 LD₅₀ of C83912 on day 114 (9 week after the vaccine strain had been cleared from the immunized mice). More than 80% of immunized mice survived regardless of the immune route (Fig. 7b). The systemic antibody responses elicited via mucosal routes were therefore protected.

4. Discussion

With many pathogens, the initial infection occurs mainly at the mucosal tissues. Therefore, it is important to develop vaccines that elicit protective immune responses to prevent the infection and replication of the pathogens at the mucosa via mucosal immunization [25].

The use of lactic acid bacteria as a live vehicle for the delivery of antigens for mucosal immunization or other therapeutic molecules has been proposed. However, only a few systems have been described previously as using *L. casei* strains as a carrier for expressing heterologous bacterial antigens in a form that can be presented to and processed by the immune system of the mammalian host [26–29]. In this study, the results indicated that *L. casei* harboring pLA did not show the antigenic properties, but *L. casei* harboring pLA-K99 could be recognized by specific antiserum. Furthermore, the recombinant plasmid pLA-K99 in *L. casei* has good segregationally and structural stability without showing any structural rearrangement.

IgA is the predominant antibody at the mucosal surface, as it is produced locally at a level that exceeds all of the other immunoglobulins [30,31]. Therefore, an efficient ETEC oral vaccine will have to induce a specific mucosal IgA response. We evaluated the immunogenicity of pLA-K99 by using BALB/c mice as an animal model. The recombinant pLA-K99/*L. casei* was shown elicit both mucosal and systemic immune responses after oral or intranasal administration. Oral immunization was more effective in eliciting protective immunity than the intranasal route. There may be three possible reasons to explain this phenomenon. Firstly, the

challenge route is oral administration, the specific mucosal IgA can prevent colonization of ETEC in the small intestine, but K99-specific IgA levels in intestinal fluids following intranasally immunization were lower than those following orally immunization. Secondly, a higher dose of *L. casei* was administered for oral immunization (5×10^9 versus 2×10^9 organisms). Thirdly, the immunization schedules, which were optimized for each route, were slightly different. For oral immunization, animals were immunized for five consecutive days during the third and fourth immunization periods (days 21 to 25 and 49 to 53). In contrast, animals were immunized nasally only once on days 21 and 49. However, these differences in the immunization regimen do not fully explain the disparity in the protective immunity levels since similar, if not greater, levels of serum antibodies were detected using ELISA in intranasally immunized animals than that in those immunized orally (Fig. 4). An alternative explanation could be that the antigens are processed and/or presented differently to immune cells in the two mucosal compartments.

Protective immunity against ETEC depends mainly on the induction of secretory IgA antibody response at the lumen of the small intestine, a Th2-dependent immune response [32,33]. The results clearly demonstrate that oral immunization of BALB/c mice with the pLA-K99/*L. casei*, was sufficient to elicit elevated IgA responses in serum and mucosal tissues as well as increases in systemic IgG antibody responses to the ETEC K99 fimbriae. In the present study, mucosal antibody responses elicited by *L. casei* immunization were investigated over a time course of 28 days in order to determine whether mucosal antibody responses could be detected at more than one mucosal site and also to discover if such responses were sustained or merely transient.

While we observed increase in IgG2a and IgG2b antibody responses in serum, dramatic increase in IgG1 K99 fimbriae specific antibody titers were also noted. IgG1 and IgG2a seem to play an important role in neutralization of exotoxins produced by ETEC K99 like neutralization of exotoxins produced by *C. diphtheriae* and *Clostridium tetani* [34]. This observation would suggest that T helper2(Th2) cell mechanisms maybe contributing to this immune response. This idea of Th2-type involvement is further suggested by the sustained increases in IgA antibody responses. Thus, oral or intranasal administration of recombinant *L. casei* displaying ETEC K99 antigens on the surface induced both systemic and mucosal immune responses against the ETEC fimbriae.

In conclusion, we have demonstrated that ETEC K99 fimbriae protein exposed on the surface of non-pathogenic strain *L. casei* that resists gastric acidity, and delivered orally to animals, elicits both systemic and mucosal immune responses. An ideal multipurpose recombinant vaccine vehicle should be capable of inducing systemic responses relevant for protection against a variety of pathogens and should also elicit IgA at mucosal surfaces to prevent the entry of pathogens into the body. We and others have shown that *L. casei* has the potential to act as an effective mucosal delivery system for bacterial and viral antigens. The present study also shows that *L. casei* immunization induces mixed IgG subclass and T-helper responses, allowing the induction of protection against a variety of infectious agents and potentially at several mucosal surfaces. However, before recombinant LAB can be used in humans, it is necessary to increase the potency of this system (i.e., to obtain high-level antibody responses to a variety of antigens with fewer doses) and to demonstrate protective-level immune responses in different animal models. It is also necessary to construct strains for human or animal that will meet the safety requirements of the regulatory bodies. The existing food grade expression systems should be further developed for this purpose [35].