

Immunsation intranasale chez la souris avec des lactocoques exportant l'interleukine-12 et l'antigène E7 du HPV-16

Luis G. BERMÚDEZ-HUMARÁN^{a,b}, Philippe LANGELLA^{a*},
Naima G. CORTES-PEREZ^{a,b}, Alexandra GRUSS^a,
Juan M. ALCOCER-GONZALES^b, Reyes S. TAMEZ-GUERRA^b,
Roberto MONTES DE OCA-LUNA^b, Yves LE LOIR^{a§}

^a Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, INRA, Domaine de Vilvert,
78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

^b Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., Mexique

Abstract – Intranasal immunization in mice with recombinant lactococci expressing the interleukin-12 and the HPV-16 E7 antigen. Interleukin-12 (IL-12), a heterodimeric cytokine, plays an important role in cellular immunity against several bacterial, viral and parasitic infections, and has adjuvant activity when co-delivered with DNA vaccines. IL-12 has also been used with success in cancer immunotherapy treatments. However, systemic IL-12 therapy has been limited by high-level toxicity. Here, we describe the inducible expression and secretion of IL-12 performed in the food-grade model lactic acid bacterium (LAB), *Lactococcus lactis*. IL-12 was expressed as 2 separate polypeptides (p35-p40), or as a single recombinant polypeptide (scIL-12). Local administration of IL-12 producing strains at the intranasal mucosal surface resulted in an antigen-specific cellular response (i.e., secretion of Th1 cytokines, IL-2 and IFN- γ) elicited by a recombinant *L. lactis* strain displaying a cell wall-anchored HPV-16 E7 antigen was dramatically increased by co-administration with an *L. lactis* strain secreting IL-12 protein. This work shows that IL-12 is produced and secreted in active form by *L. lactis* and that this strategy can be used successfully to enhance an antigen-specific immune response and to stimulate local mucosal immunity.

***Lactococcus lactis* / IL-12 / E7 antigen / IFN- γ / adjuvant**

Résumé – L'interleukine-12 (IL-12) est une cytokine hétérodimerique qui joue un rôle important dans la réponse immunitaire cellulaire lors d'infections d'origine virale, bactérienne ou parasitaire. Son adjuvantité a été démontrée lors de co-administration avec des vaccins à ADN et son utilisation est envisagée pour le développement de vaccins contre diverses maladies infectieuses. Elle a également été utilisée avec succès dans le traitement de cancers par immunothérapie. Cependant, son utilisation en traitement systémique reste délicat du fait d'effets secondaires liés à une haute toxicité. Le travail présenté ici décrit la construction de souches de *Lactococcus lactis* permettant (i) l'expression monocistronique d'une protéine de fusion regroupant les deux sous-unités de l'IL-12 et (ii) l'expression bicistronique des deux sous-unités, p35 et p40, donnant la forme

* Auteur correspondant : langella@jouy.inra.fr

§ Adresse actuelle : Laboratoire de Microbiologie, ENSA-INRA, UMR1055, 65 rue de Saint Briec, CS84215, 35042 Rennes Cedex, France

hétérodimérique native de l'IL-12. Nos résultats montrent que *L. lactis* est capable de sécréter les deux formes d'IL-12. L'analyse des surnageants de culture par électrophorèse en conditions non-dénaturantes et par test ELISA montre que les sous-unités sont correctement assemblées pour former une IL-12 native. Ceci démontre la capacité de *L. lactis* à former des ponts disulfures. Par ailleurs, nous décrivons ici la construction d'une souche de *L. lactis* produisant une forme ancrée de la protéine E7 du papillomavirus de type 16. Des essais de co-administration de souches de *L. lactis* produisant l'IL-12 et de souches ancrant l'E7 démontrent l'effet adjuvant de l'IL-12 lors d'immunisation intranasale chez la souris. Ces souches recombinantes de *L. lactis* pourraient être utilisées pour la production industrielle de cytokine ou pour l'élaboration de cocktail de souches dans le développement de vaccins vivants.

***Lactococcus lactis* / IL-12 / E7 antigène / IFN- γ / adjuvant**

1. INTRODUCTION

L'interleukine-12 (IL-12) est une cytokine hétérodimérique composée de deux chaînes (p35 et p40) liées par un pont disulfure (PDS) qui a de nombreux effets sur les lymphocytes cytotoxiques (T) et cellules tueuses (NK), aboutissant notamment à une stimulation de l'activité cytotoxique et à l'induction d'une production d'interféron γ (IFN- γ). Plusieurs études sur des modèles expérimentaux montrent que l'IL-12 est impliquée dans la protection contre des infections bactériennes, virales ou parasitaires [1, 16, 30]. Cette cytokine est également capable de bloquer l'angiogenèse [43]. Enfin, ses effets immunostimulants se révèlent bénéfiques dans le traitement du SIDA [17]. Les propriétés immunostimulantes d'IL-12 ont conduit à expérimenter son utilisation en tant qu'adjuvant lors de vaccination [6, 38]. En effet, l'IL-12 stimule la production d'anticorps de type IgG sérique [25], propriété particulièrement intéressante dans le développement de vaccins quand les antigènes se révèlent faiblement immunogènes.

L'IL-12 possède une activité anti-tumorale lorsqu'elle est administrée localement in vivo [27, 35]. Cependant, les immunothérapies à IL-12 peuvent avoir des effets toxiques chez l'animal et chez l'homme [22, 24]. Ainsi, un traitement basé sur des virus recombinants exprimant l'IL-12 au sein de tumeurs chez les souris induit une inhibition significative et encourageante de

la progression de la tumeur mais aussi des signes très nets de toxicité [7].

Plusieurs systèmes pour délivrer l'IL-12 ont été décrits. Ils sont basés sur l'utilisation de rétrovirus ou sur la technique du « gene gun » [24, 35]. Cependant, il n'existe toujours pas de moyen à la fois sûr et efficace pour délivrer l'IL-12 à des fins thérapeutiques ou vaccinales. Les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries à Gram-positif présentant une parfaite innocuité hygiénique. Elles sont de plus en plus étudiées en tant que candidats pour le développement de nouvelles stratégies de vaccination orale. *Lactococcus lactis*, la BL modèle, a été largement étudiée et manipulée pour la production de protéines hétérologues (pour revue, [28]) parmi lesquelles, quelques antigènes d'origine virale ou bactérienne [2, 12, 36]. *L. lactis* est particulièrement intéressante pour délivrer des protéines par voie orale puisqu'elle est non-commensale, alimentaire et qu'elle ne survit pas dans le tube digestif de l'homme ou des animaux modèles [11]. Dans le cas de l'administration orale d'IL-12, ces propriétés pourraient être mises à profit. L'utilisation de *L. lactis* assure en effet une expression transitoire et réduit ainsi les risques de toxicité.

La production d'IL-12 requiert l'assemblage de deux sous-unités par un PDS [33]. Chez les bactéries à Gram-positif, la formation des PDS est peu documentée. Seules quelques protéines extracytoplasmiques contenant des PDS ont été décrites et, à notre connaissance, l'exportation de protéines

hétérologues contenant des PDS n'a été décrite que chez *Bacillus subtilis* [29, 31]. Cependant, la sécrétion de protéines d'intérêt par les bactéries à Gram-positif s'effectue directement dans le surnageant ce qui offre un avantage immédiat en tant que système de délivrance par rapport aux bactéries à Gram-négatif. À notre connaissance, la production de l'IL-12 est le seul exemple de sécrétion de protéines hétérologues à PDS chez *L. lactis*. Cette partie du travail a été décrite en détail dans une publication précédente [3]. Elle démontre la capacité de *L. lactis* à produire et sécréter l'IL-12, une cytokine complexe, à deux sous-unités (SU), nécessitant la formation de PDS pour son activité [33].

De plus, nous avons testé le potentiel adjuvant de cette souche de lactocoques recombinants en l'associant à une souche de lactocoques produisant l'antigène E7 du papillomavirus humain de type 16 (HPV-16). HPV-16 est le principal agent impliqué dans le déclenchement du cancer du col de l'utérus, deuxième cause de mortalité féminine par cancer dans le monde [44]. E7, l'une de ses protéines, est considérée comme un antigène d'intérêt pour le développement de vaccins anti-cancer chez la femme. Nous avons déjà montré que la forme native d'E7 est très labile et sujette à une protéolyse cytoplasmique chez *L. lactis* [2, 4]. Par contre, nous avons également montré qu'E7 peut être stabilisée lorsqu'elle est fusionnée à une protéine stable telle que la nucléase de *Staphylococcus aureus* (Nuc). Par ailleurs, l'utilisation d'E7 n'induit qu'une faible réponse immunitaire cellulaire [26]. Nous montrons ici que l'administration d'une souche de *L. lactis* présentant à sa surface une forme ancrée d'E7 donne lieu à une réponse immunitaire largement améliorée lorsqu'elle est accompagnée d'une souche de *L. lactis* sécrétant l'IL-12. Ceci démontre tout l'intérêt de cette souche productrice d'IL-12 pour co-délivrer des protéines d'intérêt médical. Ce travail marque une avancée dans le développement de vaccin vivant en combinant des souches productrices de protéines antigéniques ou

adjuvantes pour des administrations nasales ou orales.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont listés et décrits dans le tableau I. *L. lactis* a été cultivée sur milieu M17 supplémenté en glucose à 1 % (M17Glu) à 30 °C sans agitation. *Escherichia coli* a été cultivée sur LB à 37 °C. Les constructions plasmidiques ont été effectuées chez *E. coli* puis transférées chez *L. lactis* par électrotransformation [20, 37]. Les plasmides ont été sélectionnés par addition d'antibiotiques dans les proportions suivantes (concentrations en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) : chloramphénicol 5 pour *L. lactis*, et 10 pour *E. coli*, et ampicilline 100 pour *E. coli*.

2.2. Manipulations de l'ADN

L'extraction des plasmides et les techniques de base de manipulation d'ADN découlent de techniques précédemment décrites [37].

2.3. Délétion d'un intron dans la sous-unité p35

Les gènes p35 et p40 de l'IL-12 murine ont été isolés de pWRG3169 (fourni par A. Rakhmilevich, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI, USA ; Tab. I). L'analyse de la séquence de pWRG3169 a révélé la présence d'un intron dans la SU p35 (résultat non communiqué). Or, l'épissage des introns n'existe pas chez les procaryotes. Nous avons donc procédé à une mutagenèse dirigée par PCR pour éliminer l'intron présent dans p35 (Fig. 1). Brièvement, les deux exons de p35 ont été amplifiés par PCR, sous-clonés dans un vecteur commercial pCR-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et ligaturés entre eux pour générer un fragment d'ADN spécifiant la SU p35 mature dépourvue

Souches	Génotype	Référence	
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE, hsd, Δ5, thi, Δ(lac-proAB), F'(traΔ36 proAB-lacZΔM15)</i>	[15]	
<i>L. lactis</i> MGI363	Dépourvue de plasmide	[13]	
<i>L. lactis</i> NZ9000	MGI363 (gènes <i>nisRK</i> sur le chromosome)	[18]	
Plasmides	Réplicon	Caractéristiques des plasmides et des cassettes clonées	Référence
pWRG3169	ColE1	Ap ^f , dérivé de pBS contenant les séquences codant pour les SU p35 and p40	[35]
pCR:TOPO	ori pUC	Ap ^f	Invitrogen
pCR-TOPO:Δp35exon1	ori pUC	Ap ^f , fragment d'ADN codant pour le premier exon de la SU p35, dépourvue de son peptide signal (PS)	[3]
pCR-TOPO:p35exon2	ori pUC	Ap ^f , fragment d'ADN codant pour le second exon de la SU p35	[3]
pCR-TOPO:Δp35	ori pUC	Ap ^f , fragment d'ADN codant pour la partie mature de la SU p35, dépourvue d'intron	[3]
pVE8001	ColE1	Ap ^f , dérivé de pBS contenant <i>trpA</i> , un terminateur de transcription de lactococque	[34]
pBS:Δp40:trpA	ColE1	Ap ^f , fragment d'ADN codant pour la partie mature de la SU p40, dépourvue de PS et fusionnée à <i>trpA</i>	[3]
pVE8022	ColE1/pAMβ	Ap ^f /Em ^r , dérivé de pFUN contenant la fusion Exp4-ΔPS _{Nuc}	[34]
pBS:SP _{Exp4}	ColE1	Ap ^f , fragment PCR codant pour le peptide signal PS _{Exp4}	[3]
pBS:SP _{Exp4} :p40:trpA	ColE1	Ap ^f , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour la fusion PS _{U_{sp}} -p40:trpA	[3]
pSEC:E7	pWV01	Cm ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour le précurseur PS _{U_{sp}} -E7	[2]
pSEC:p35	pWV01	Cm ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour la fusion PS _{U_{sp}} -p35	[3]
pSEC:p35-p40	pWV01	Cm ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour la fusion PS _{U_{sp}} -p35-p40	[3]
pCDNA3:IL-12	ColE1	Ap ^f , fragment PCR codant pour l'IL-12 mono-chaîne	P. Melby ^a
pCR:TOPO:scIL-12	ori pUC	Ap ^f , fragment PCR codant pour <i>scIL-12</i> , l'IL-12 mono-chaîne dépourvue de son PS	[3]
pSEC:scIL-12	pWV01	Cm ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour le précurseur SP _{U_{sp}} -IL-12	[3]
pSEC-E7	pWV01	Cm ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour le précurseur SP _{U_{sp}} -E7	[2]
pBS:E7	ColE1	Ap ^f , fragment PCR codant pour la partie mature d'E7	[8]
pVE5547	pIL252	Ery ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour le précurseur SP _{U_{sp}} -Nuc-CWA _{M6}	[10]
pCWA-E7	pIL252	Ery ^r , gène, sous le contrôle transcriptionnel de P _{nisA} , code pour le précurseur SP _{U_{sp}} -E7-CWA _{M6}	[8]

← **Tableau I.** Souches et plasmides utilisés.
Table I. Bacterial strains and plasmids used.
^a The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA.

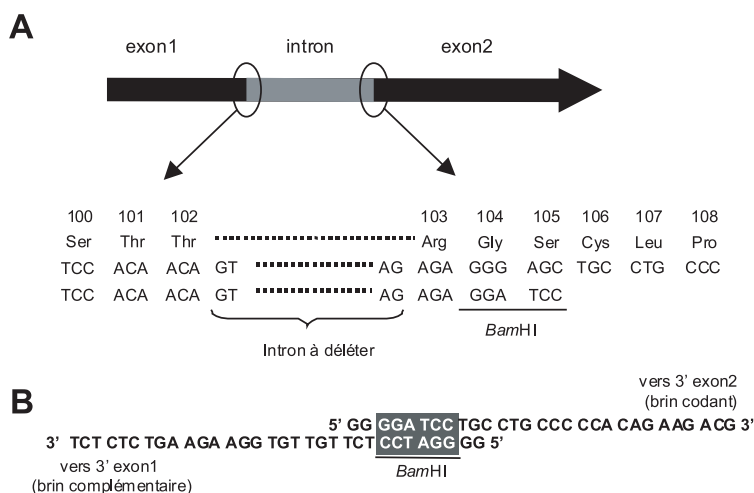


Figure 1. Élimination de l'intron de p35 par mutagenèse dirigée. **A.** Structure schématique de la séquence codant p35. La séquence des codons correspondant aux acides aminés 100 à 108 de la SU p35 est donnée. La séquence nucléotidique des jonctions exon/intron à éliminer est indiquée. Le site *Bam*HI (souligné) a été introduit en 5' de l'exon 2 sans modification du cadre ouvert de lecture (des codons spécifiant Arg, Gly, Ser). **B.** Séquences des amorces contenant le site *Bam*HI pour l'amplification de deux fragments p35 (utilisant les amorces 5'-p35start et 3'-p35stop comme compléments à la réaction) et la construction d'un fragment p35 dépourvu d'intron.

Figure 1. Site-specific mutagenesis. **A.** Schematic structure of the p35 coding sequence. Nucleotide sequence of the codons corresponding to amino acids 100 to 108 is given. Nucleotide sequence of the exon/intron junctions to be eliminated is shown. The *Bam*HI restriction site (underlined) has been inserted in frame at the 5' end of exon 2 without modifying the three codons to the right of the intron (encoding Arg, Gly, Ser). **B.** Sequence of the primers designed to PCR-amplify two fragments of p35 that were joined at the *Bam*HI site, such that p35 was reconstituted but intron-free.

de son intron et de son peptide signal (PS) (Δ p35). Le premier exon a été amplifié à l'aide des amorces suivantes 5'-p35-start (5'-GATGCATCAGAGAGGGTCATTC CAGTCTCTGGA-3') pour le brin codant et 5'-p35 (5'-GGGGATCCTCTTGTGTTG TGAAGAAGTCTCT-3') pour le brin complémentaire (Fig. 1). Le second exon a été amplifié à l'aide des amorces 3'-p35-start (5'-GGGGATCCTGCCTGC CCCCACAGAAGACG-3') pour le brin

codant et 3'-p35-stop (5'-GGAATTCTC AGGCGGAGCTCAGATAGCCCA-3') pour le brin complémentaire (Fig. 1). Les amorces jouxtant l'intron ont été dessinées de sorte à introduire un site *Bam*HI sans modifier la séquence peptidique de p35. Ces deux exons ont été fusionnés et clonés sur un vecteur pCR-TOPO pour donner pCR-TOPO: Δ p35. Ce plasmide spécifie une SU p35 mature rigoureusement identique à l'originale [3].

2.4. Construction de la souche de *L. lactis* produisant les SU p35 et p40

Un fragment spécifiant la SU p40 mature (sans son PS, $\Delta p40$) a été amplifié par PCR à partir du plasmide pWRG3169 et sous-cloné dans pVE8001 préalablement digéré par *HincII*- (Tab. I, fourni par I. Poquet, URLGA, INRA, Jouy-en-Josas, France) pour donner pBS: $\Delta p40$:trpA. Le vecteur pVE8001 porte un terminateur de transcription (trpA) et a déjà été utilisé pour exprimer des protéines hétérologues chez *L. lactis* [2, 34]. Les séquences des amorces utilisées sont 5'-p40 (5'-GATG CATCAGAGATGTGGGAGCTGGGAAA GAC-3') pour le brin codant et 3'-p40 (5'-GGAGCTCCTAGGATCGGACCCTGCA GGGAA-3') pour le brin complémentaire. Ensuite, différentes constructions ont été effectuées pour fusionner des PS de *L. lactis* aux SU p35 et p40. Pour p40, un fragment d'ADN a été amplifié par PCR à partir de pVE8022 (un dérivé du vecteur pFUN, dans lequel le gène rapporteur ΔSP -Nuc est fusionné à Exp4, une protéine sécrétée potentielle de *L. lactis* de fonction inconnue, [34]). Ce fragment contient le site d'attachement du ribosome (RBS) et le PS de Exp4 (SP_{Exp4} , [34]). Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes : 5'-Exp4 (5'-GGGTACCTTAAGGAGATA TAAAAATGAA-3') pour le brin codant et 3'-Exp4 (5'-GATGCATCATCAGCAAA TACAACGGC-3') pour le brin complémentaire. Le produit PCR a été fusionné à la SU p40 pour donner pBS: SP_{Exp4} [3]. Pour la SU p35, le fragment $\Delta p35$ a été isolé de pCR-TOPO: $\Delta p35$ et cloné dans un vecteur pSEC pour donner pSEC:p35 (Tab. I, [2]). Dans ce vecteur, le gène *p35* est fusionné au RBS et au PS du gène *usp45*, spécifiant la protéine majoritairement sécrétée chez *L. lactis* [42]. L'expression est contrôlée par le promoteur inductible P_{nisA} , dont l'activité dépend de la concentration en nisine utilisée [9, 18]. Finalement, pour obtenir le plasmide exprimant les deux SU p35 et p40, une cassette spéci-

fiant SP_{Exp4} :p40:trpA a été isolée de pBS: SP_{Exp4} :p40:trpA et clonée dans le vecteur pSEC:p35 pour donner pSEC:p35-p40 (Tab. I, Fig. 2). Ce vecteur, sur lequel l'expression des deux SU est contrôlée par le promoteur P_{nisA} , a été introduit chez *L. lactis* NZ9000 portant les gènes régulateurs *nisR* and *nisK* [18]. Cette souche est appelée NZ(pSEC:p35-p40) (Fig. 2).

2.5. Construction d'une souche de *L. lactis* produisant IL-12 mono-chaîne

Le gène *IL-12* mono-chaîne (*scIL-12*) a été amplifié par PCR à partir du plasmide pcDNA3:IL-12 (fourni par P. Melby, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA). La séquence des amorces utilisées est la suivante 5'-IL-12 (5'-GATGCATCAGAGATGTGGGAG CTGGAGAAAGAC-3') pour le brin codant et 3'-IL-12 (5'-GGAATTCTCAGGCGGA GCTCAGATAGCCCA-3') pour le brin complémentaire. L'amorce 5'-IL-12 a été conçue de façon à éliminer les 22 premiers codons dans la séquence codante de scIL-12. Ces codons correspondent au PS eucaryote de p40 et ils ont été remplacés par SP_{Usp45} . Pour cela, le produit PCR a été cloné dans pCR:TOPO (Invitrogen) pour donner pCR:TOPO:scIL-12 (Tab. I). La cassette *scIL12* a été purifiée et clonée dans un vecteur pSEC. Dans le plasmide résultant, pSEC:scIL12 (Tab. I, Fig. 2), la partie mature de scIL-12 est fusionnée en phase avec un fragment d'ADN spécifiant le RBS et le PS_{Usp45} . L'expression est contrôlée par le promoteur P_{nisA} . Ce plasmide a été introduit chez la souche *L. lactis* NZ9000 pour donner NZ(pSEC:scIL12).

2.6. Construction d'une souche produisant la protéine E7 ancrée

Pour ancrer la protéine E7 à la surface de *L. lactis*, E7 a été fusionnée à un fragment de la séquence d'ancrage pariétal (CWA) de la protéine M6 de *Streptococcus pyogenes* [32]. Brièvement, le gène *E7* a été amplifié par PCR à partir du vecteur

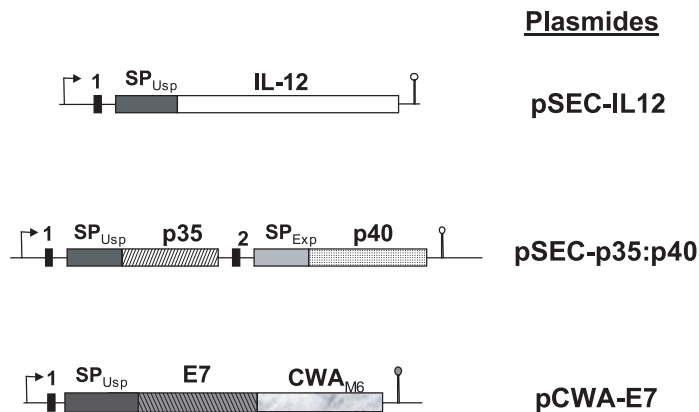


Figure 2. Cassettes d'expression pour la production et la sécrétion d'IL-12 et de E7-CWA chez *L. lactis*. Les structures schématiques des cassettes IL-12 mono-chaîne, SU p35 et p40 et E7-CWA dont l'expression est contrôlée par le promoteur de lactocoque P_{nis} (à gauche) et les noms des vecteurs correspondants (à droite) sont indiqués. Pour les détails sur la construction des plasmides, se référer au texte et au tableau I. Les flèches indiquent la séquence P_{nisA} , promoteur inductible à la nisine isolé de *L. lactis*; les barres noires indiquent les sites d'attachement du ribosome (RBS) du gène *usp45* (1) ou du gène *exp4* (2); les rectangles indiquent la séquence du peptide signal du gène *usp45* (gris foncé), la séquence du peptide signal du gène *exp4* (gris clair), la séquence de la partie mature de p35 (rayé clair), la séquence de la partie mature de p40 (pointillé), la séquence de l'IL-12 mono-chaîne (blanc), la séquence d'E7 (rayé foncé) et celle de CWA_{M6} (marbré); les structures tiges-boucles indiquent le terminateur de transcription du gène *trpA* (l'échelle n'est pas respectée).

Figure 2. Expression cassettes to produce and secrete IL-12 in *L. lactis*. Schematic structures of p35 and p40 subunits, single chain IL-12, or E7-CWA cassettes expressed under the lactococcal P_{nisA} promoter and carried by the indicated plasmids. For details of plasmid constructions, see text and Table I. Arrows indicate the presence of the nisin-inducible promoter (P_{nisA}); solid vertical bars indicate the Ribosome Binding Site of the *usp45* gene (1) or of the *exp4* gene (2); dark gray bars indicate signal peptide of the *usp45* gene; the light gray bar indicates signal peptide of the *exp4* gene; the light gray striped bar indicates p35 mature coding sequence; the dotted bar indicates p40 mature coding sequence; the open bar indicates single chain IL-12 coding sequence; the dark gray striped bar indicates E7 mature moiety; the marbled bar indicates the cell wall anchor of the M6 protein (CWA_{M6}); stem-loop structures indicate *trpA* transcription terminators (not to scale).

pSEC-E7 [2]. Les amorces utilisées sont : 5'E7CWA (5'-AGTCGACCCATTGCATG GAGATACACCTACATTG-3') pour le brin codant et 3'E7CWA (5'-CGATAT CTCTGGTTTCTGAGAACAGATGGGGC A-3') pour le brin complémentaire. Le produit PCR a été cloné dans un dérivé de pVE8001 *Hinc*-II (fourni par I. Poquet) pour donner le plasmide pBS:E7 (Tab. I). La cassette E7 a ensuite été clonée dans pVE5547 (Tab. I) pour donner pCWA-E7 (Tab. I, Fig. 2). Dans ce vecteur, le gène E7

est fusionné en aval du RBS d'*usp45*, en phase avec le PS_{Usp45} [42] côté N-terminal et en phase avec un fragment d'ADN codant l'ancrage pariétale de M6 (CWA_{M6}) de *S. pyogenes* côté C-terminal (Fig. 2, [32]). Le précurseur hybride attendu de cette fusion présente une masse moléculaire (MM) théorique de 38 kg.mol⁻¹. L'expression est contrôlée par le promoteur P_{nisA} [9]. Le plasmide pCWA-E7 a été introduit dans *L. lactis* NZ9000 (Tab. I, [18]). L'induction de l'expression de

CWA-E7, la préparation des échantillons de protéines et les immunodétections ont été menées comme décrit précédemment [2].

2.7. Expression et détection de l'IL-12

Pour l'induction du promoteur P_{nisA} , les souches ont été cultivées jusqu'à $DO_{600} \sim 0,6$, puis induites avec 10 ng de nisine/mL (Sigma, Saint Louis, MO, USA) pendant 1 h. Ces paramètres, les concentrations en nisine et les temps d'induction, ont été précédemment déterminés comme optimaux [4]. Les extraits de protéines à partir de culture de *L. lactis*, les western blots et les immunodétections ont été effectués comme décrit précédemment [21], en utilisant des anticorps de souris anti-IL-12 pour l'immunodétection (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La concentration d'IL-12 sécrétée dans la culture a été estimée par un kit ELISA reconnaissant spécifiquement la forme native de l'hétérodimère IL-12 (R&D Systems).

2.8. Préparation des surnageants de culture pour obtenir de l'IL-12 non dénaturée

Les échantillons de surnageant de cultures induites ont été concentrés 50 fois à l'aide de membrane Ultrafree Biomax NMWL (Millipore, Billerica, MA, USA), de 4 mL de volume. Après centrifugation, 10 μ L de tampon de chargement non-dénaturant (c'est-à-dire sans DTT et SDS) ont été ajoutés à 10 μ L de concentrat. Les électrophorèses ont été menées selon Laemmli [19] à ceci près que le SDS est absent de toutes les solutions.

2.9. Animaux

Les souris C57BL/6 ont été achetées à Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Les souris ont été élevées dans l'animalerie du Laboratoire d'Immunologie et de Virologie de l'Université du Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L., Mexique. Les expériences ont été menées selon des procédures approuvées par le comité d'éthique.

2.10. Administration intranasale de souches de *L. lactis* produisant l'IL-12

Des groupes de trois souris de 6 à 8 semaines ont été inoculés par voie intranasale (i.n.) avec des lactocoques recombinants ou sauvages, ou du PBS. Avant traitement, les souris ont été partiellement anesthésiées par voie intrapéritonéale avec une combinaison de Xilacine et de Ketamine (Cheminova de México, Ejidos de Santa Ursula Coapa, Mexique). Un total de 5×10^8 UFC (unité formant colonie) de chaque souche induite de *L. lactis* a été resuspendu dans 10 μ L de PBS et 5 μ L ont été administrés à l'aide d'une micropipette dans chaque narine aux jours 0, 14 et 28.

2.11. Test d'induction d'IFN- γ

Les animaux traités avec les lactocoques recombinants ont été sacrifiés au jour 35. Les splénocytes ont été isolés et cultivés selon la méthode décrite par Bermudez-Humaran et al. [3]. La quantité d'IFN- γ a été estimée par ELISA selon les recommandations du fournisseur (R&D Systems [3]). Tous les échantillons ont été préparés en triplets.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Les SU p35 et p40 sont sécrétées par *L. lactis* et correctement assemblées

La capacité de *L. lactis* à produire et sécréter les deux SU d'IL-12 a été testée sur la souche NZ(pSEC:p35-p40). Après induction à la nisine, les cultures de NZ(pSEC:p35-p40) (DO_{600} finale ~ 1) ont été séparées en culot et surnageant et la sécrétion de p35 et p40 a été analysée par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-IL-12 après transfert par Western (Fig. 3). Un profil de protéines de différents PM est révélé dans la fraction cellulaire de la culture induite. Ceci suggère une accumulation des précurseurs de p35 et p40 ainsi qu'une protéolyse dans le cytoplasme ou à

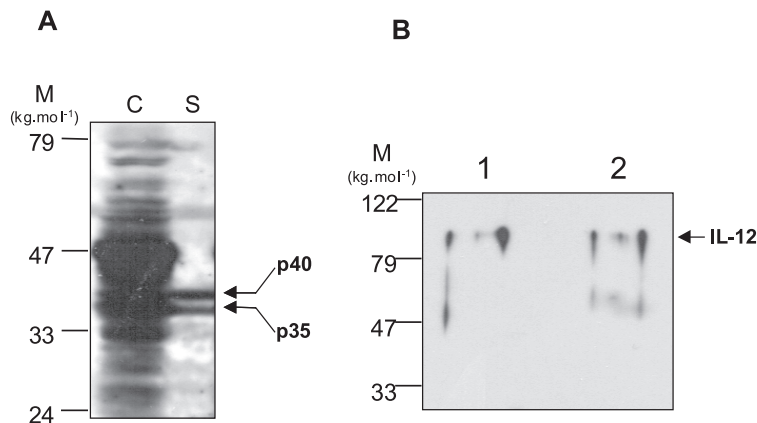


Figure 3. Production d'IL-12p35-p40 par *L. lactis*. **A.** Analyse par immunodétection des échantillons de *L. lactis* NZ(pSEC:p35-p40) produisant les SU p35 et p40 (IL-12p35-p40). C, fraction cellulaire ; S, surnageant. **B.** Analyse de la production d'IL-12p35-p40 sur des surnageants de NZ(pSEC:p35-p40) par migration en PAGE en conditions non dénaturantes. 1, IL-12 recombinante (R&D Systems) utilisée comme contrôle ; 2, échantillons de surnageant de NZ(pSEC:p35-p40) produisant IL-12p35-p40. Les positions des tailles correspondant au marqueur de masses moléculaires (M) sont indiquées à gauche.

Figure 3. IL-12p35-p40 production in *L. lactis*. **A.** Production of the two IL-12 subunits was analyzed by Western blot after SDS-PAGE and immunodetection using anti-IL-12 antibodies. Samples were prepared on NZ(pSEC:p35-p40) induced cultures producing the IL-12p35-p40. C, NZ(pSEC:p35-p40) cell fraction; S, supernatant. **B.** Analysis of IL-12p35-p40 production after non-denaturing PAGE. 1, commercial recombinant IL-12 (R&D Systems); 2, supernatant sample of induced NZ(pSEC:p35-p40). Positions and sizes of molecular mass marker (M) are indicated on the left.

la surface de la bactérie. Par contre, le surnageant ne contient que deux bandes migrant à la taille attendue pour les SU p35 et p40. Pour chaque SU, l'efficacité de sécrétion (la proportion de forme mature sécrétée dans le surnageant) est faible (<15 %, Fig. 3A). Les analyses effectuées sur les cultures non-induites n'ont révélé aucune bande (non montré). Les deux SU sont d'intensité comparable suggérant que les deux SU sont produites à la bonne stoechiométrie pour former un hétérodimère actif d'IL-12. Ces résultats montrent que *L. lactis* est capable de produire et sécréter les deux SU d'IL-12.

Nous avons ensuite vérifié que les deux SU sont correctement assemblées pour former un hétérodimère d'IL-12p35-p40. Des échantillons de protéines ont été collectés

sur des cultures induites et analysés par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-IL-12 après migration sur gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes. Dans ces conditions, une bande co-migre avec l'IL-12 recombinante commerciale utilisée en contrôle (Fig. 3B). Cette bande peut correspondre soit à la forme hétérodimérique attendue IL-12p35-p40, soit à un homodimère de p40. Il a en effet été montré que la SU p40 est capable de s'homodimériser pour former p40₂, de MM 80 kg.mol⁻¹ et ayant une action d'antagoniste de l'IL-12 in vivo [23]. Cette ambiguïté a été levée par analyse des surnageants de cultures induites en ELISA, à l'aide d'un test spécifique de l'IL-12 native [3]. Ces résultats montrent (i) que *L. lactis* est capable de sécréter les SU p35 et p40 de

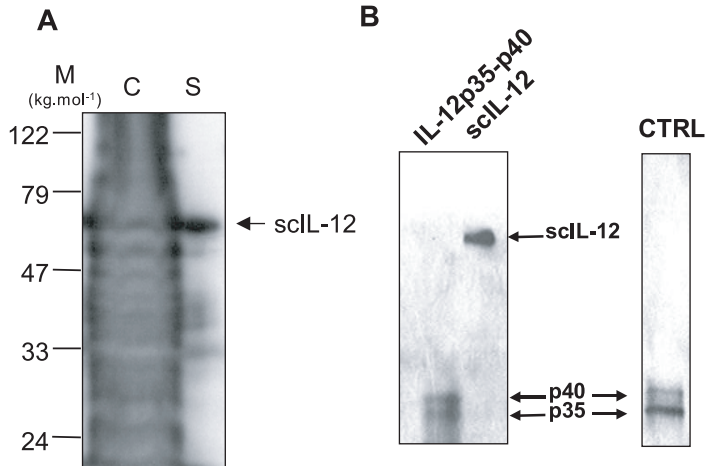


Figure 4. Production de scIL-12 chez *L. lactis* et comparaison des niveaux de production d'IL-12p35-p40 et de scIL-12. **A.** La production de l'IL-12 mono-chaîne a été analysée par immunodétection sur des échantillons préparés à partir de cultures induites de *L. lactis* NZ(pSEC:scIL-12). C, fraction cellulaire de la souche NZ(pSEC:scIL-12) produisant scIL-12 ; S, surnageant. **B.** Comparaison des niveaux de sécrétion d'IL-12 sur des échantillons de surnageants des souches NZ(pSEC:scIL-12) produisant scIL-12 et NZ(pSEC:p35-p40). CTRL, IL-12 recombinante commerciale utilisée comme contrôle. Le profil de migration et les tailles correspondant aux bandes du marqueur de masses moléculaires (M) sont indiqués à gauche.

Figure 4. scIL-12 production in *L. lactis* and comparison of IL-12p35-p40 and scIL-12 production yields. **A.** Single chain IL-12 production was analyzed by Western blot on protein samples of induced NZ(pSEC:scIL-12). C, cell fraction; S, supernatant. **B.** Comparison of IL-12 production yields in NZ(pSEC:scIL-12) producing scIL-12 and NZ(pSEC:p35-p40) producing IL-12p35-p40. CTRL, commercial recombinant IL-12. Positions and sizes of molecular mass marker (M) are indicated on the left.

l'IL-12 murine et (ii) qu'au moins une partie de ces deux SU est correctement assemblée dans le surnageant.

3.2. Production de l'IL-12 mono-chaîne chez *L. lactis*

Le moyen le plus sûr d'assurer la stœchiométrie des deux SU et de favoriser ainsi un assemblage correct de l'IL-12 est de fusionner p35 et p40 en un seul polypeptide (scIL-12 pour single chain IL-12). Cette stratégie a déjà prouvé son efficacité dans des systèmes eucaryotes. La production de scIL-12 par *L. lactis* a été testée sur la souche NZ(pSEC:scIL-12). Des échantillons de protéines ont été préparés sur la fraction cellulaire et le surnageant de cultures induites de NZ(pSEC:scIL-12) puis

analysés par Western blot et immunodétection à l'aide d'anticorps anti-IL-12 (Fig. 4). Dans la fraction cellulaire, l'immunodétection révèle un profil de bandes de différentes tailles attribuables à une accumulation de précurseur de scIL-12 et à une hydrolyse intracellulaire. Comme précédemment pour l'IL-12p35-p40, le profil obtenu dans le surnageant de culture induite est beaucoup plus simple et comprend une bande majoritaire migrant à la taille attendue pour la protéine de fusion scIL-12 (70 kg.mol⁻¹, Fig. 4A). Le niveau de production de scIL-12 a ensuite été comparé à celui de l'IL-12p35-p40 par l'analyse en Western blot de surnageant de cultures induites de NZ(pSEC:scIL-12) et de NZ(pSEC:p35-p40). À niveau d'induction égal, la quantité de scIL-12 sécrétée dans le surnageant est deux à trois fois

supérieure à celle d'IL-12p35-p40 (Fig. 4B). L'analyse de ces échantillons par ELISA (test spécifique de la forme native d'IL-12) a confirmé ces résultats et a permis de montrer que scIL-12 était sécrétée par *L. lactis* sous une conformation correcte (non montré). Les immuno-détections après Western et les ELISA menés sur des échantillons de cultures non-induites, utilisés comme contrôles négatifs, n'ont donné aucun signal. Ces résultats montrent que *L. lactis* est capable de produire et de sécréter scIL-12 dont une partie au moins est correctement repliée, suggérant que scIL-12 produite par *L. lactis* est potentiellement active. Le rendement de production de scIL-12 est nettement supérieur à celui de la forme hétérodimérique suggérant une meilleure stabilité de la forme mono-chaîne. Par ailleurs, la production d'une forme mono-chaîne permet de pallier les problèmes liés à une association inefficace des SU produites indépendamment ou à la formation d'homodimères de p40. Pour ces raisons, la souche NZ(pSEC:IL-12) sera utilisée pour les expériences d'immunisation chez la souris. L'ensemble de ces résultats démontrent la capacité de *L. lactis* à former des PDS. Or, la formation de PDS est souvent un frein à la production de protéines hétérologues dans les systèmes procaryotes, notamment chez les bactéries à Gram-positif qui produisent elles-mêmes très peu de protéines contenant des PDS [5, 29, 31]. Il est possible que l'acidification qu'entraîne la croissance de *L. lactis* favorise ici la formation de PDS dans les protéines sécrétées. Bien que le mécanisme de cette formation reste à découvrir, ces résultats sont prometteurs pour l'exploitation de *L. lactis* à la production d'autres protéines nécessitant la formation de PDS.

En dépit d'une efficacité de traitement à l'IL-12 démontrée par des essais sur l'animal pour certains cancers ou certaines infections, l'administration systémique d'IL-12 engendre des effets secondaires inacceptables [7, 22]. Pour contourner ce problème, nous avons testé un système d'apport d'IL-12 par voie mucosale en utilisant *L. lactis*,

bactérie non-invasive et non-colonisatrice, comme vecteur [11]. Récemment, une souche de *L. lactis* délivrant de l'interleukine IL-10 administrée par voie orale a permis d'obtenir des effets très positifs dans le traitement de l'inflammation chronique du colon chez la souris. Ce type d'administration a permis d'utiliser une quantité d'IL-10 estimée dix fois inférieure à celle requise pour les administrations systémiques [40]. L'administration ciblée vers le tractus digestif d'autres interleukines, comme ici l'IL-12, à l'aide de bactéries alimentaires, comme *L. lactis*, pourrait aussi réduire les effets secondaires néfastes et se révéler avantageux par rapport au traitement systémique.

3.3. Production d'E7-CWA par *L. lactis*

L'expression de E7-CWA a été analysée par Western blot et immunodétection sur des extraits cellulaires totaux à l'aide d'anticorps anti-E7 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Allemagne). Une construction plasmidique portant un gène E7 fusionné à la glutathione S-transférase (GST, fourni par V. Bermúdez, Université Autonome du Nuevo León, Monterrey, Mexique), a permis la production et la purification d'une protéine de fusion E7-GST chez *E. coli*. E7-GST a été ensuite utilisée comme contrôle positif. Dans les extraits cellulaires de la souche *L. lactis* (pCWA-E7) (Fig. 5), une bande majoritaire a été détectée autour de $38 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, la taille attendue pour le précurseur $\text{SP}_{\text{Usp}}\text{-E7-CWA}_{\text{M6}}$. Deux autres bandes de MM inférieures ont été détectées et correspondent à une forme E7-CWA_{M6} résultant du clivage de PS_{Usp} et dont la MM théorique est de $32 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, et à une forme ancrée de E7 (E7-ancrée) de MM inférieure ($\sim 27 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) et générée par le clivage de CWA_{M6} (suivi de l'établissement d'une liaison covalente entre E7 et la paroi, Fig. 5). Des expériences de fractionnement subcellulaire (séparation protoplaste/paroi/surnageant) ont permis de confirmer ces

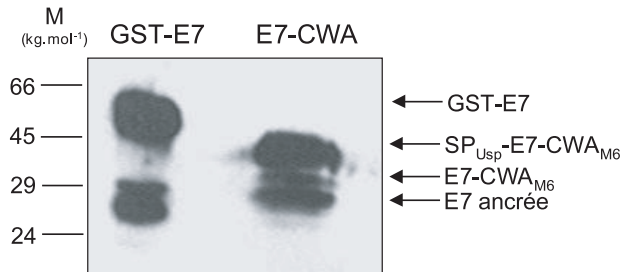


Figure 5. Production de E7-CWA par *L. lactis*. La production d'E7-CWA par la souche *L. lactis* NZ(pCWA-E7) a été analysée par Western blot et immuno-révélation à l'aide d'anticorps anti-E7 sur des extraits cellulaires de cultures induites. Les flèches indiquent la position du précurseur SP_{Usp} -E7-CWA $_{M6}$, du produit issu d'un premier clivage (E7-CWA $_{M6}$) et la forme mature (E7-ancrée). La ligne GST-E7 correspond à la migration d'extraits cellulaires d'une souche d'*Escherichia coli* produisant une protéine de fusion E7 couplée à la GST utilisée comme contrôle positif. Les positions des bandes du marqueur de masses moléculaires (M) sont indiquées à gauche.

Figure 5. E7-CWA production in *L. lactis*. E7-CWA production was analyzed by Western blot and immunodetection using anti-E7 antibodies on protein samples prepared from induced NZ(pCWA-E7). Arrows indicate positions of SP_{Usp} -E7-CWA $_{M6}$ precursor, E7-CWA $_{M6}$, resulting from a first cleavage of the precursor, and mature E7-anchored. Track GST-E7 contains cell extracts from *Escherichia coli* producing a GST-E7 fusion protein used as a positive control. Positions and sizes of molecular mass marker (M) are indicated on the left.

observations [8]. Ces résultats montrent que E7-CWA $_{M6}$ est efficacement produite par *L. lactis* et est correctement exportée à la surface. Ils confortent de précédents travaux montrant que Nuc, une autre protéine hétérologue, peut être adressée vers la paroi de *L. lactis* lorsqu'elle est fusionnée à CWA $_{M6}$ [10].

3.4. Co-administration i.n. de souches de *L. lactis* recombinantes produisant de l'IL-12 active et la protéine E7 du HPV16

Afin de démontrer les propriétés adjuvantes de la souche NZ(pSEC:scIL-12), nous avons analysé la réponse immunitaire déclenchée par l'administration i.n. d'une souche de *L. lactis* produisant E7 (antigène faiblement immunogène) avec ou sans NZ(pSEC:scIL-12). Des groupes de cinq souris C57BL/6 ont été immunisés par voie i.n. avec trois doses (aux jours 0, 14 et 28) de 5×10^8 UFC de NZ(pSEC:E7-CWA) seules ou en combinaison avec 5×10^8 UFC

de NZ(pSEC:scIL-12). La production d'IL-2 et IFN- γ , cytokines caractéristiques d'une réponse immune de type Th1 [38] a ensuite été analysée en ELISA (R&D Systems) selon les recommandations du fournisseur (Fig. 6). Les splénocytes qui ont été extraits une semaine après la dernière inoculation de lactocoques recombinants (jour 35) et ont été restimulés à l'aide d'un peptide E7 synthétique (RAHYNIVTF). Ces splénocytes produisaient des niveaux élevés d'IL-2 (Fig. 6A) et d'IFN- γ (Fig. 6B). Des splénocytes restimulés avec du PBS seul ont été utilisés comme contrôle. Comme attendu, les réponses ont été significativement meilleures chez les animaux immunisés avec les souches produisant E7-CWA qu'avec la souche sauvage de *L. lactis* utilisée comme contrôle négatif. Les réponses cellulaires spécifiques de l'antigène E7, mesurées via la sécrétion de cytokines Th1 (IL-2 et IFN- γ) ont été nettement améliorées par la co-administration de NZ(pSEC:scIL-12) (Fig. 6). Ainsi, l'IL-12 produite et délivrée par *L. lactis* au niveau de la muqueuse possède une

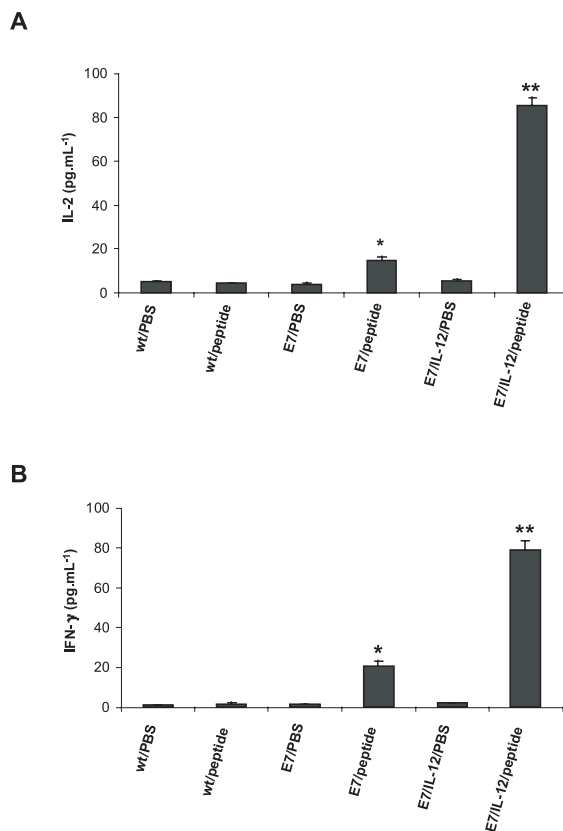


Figure 6. Analyse de la production de cytokines Th1 chez des souris immunisées à l'aide de lactocoques recombinants produisant E7-CWA seul ou avec scIL-12. Les cytokines de type Th1 (IL-2 et IFN- γ) ont été dosées après sacrifice (jour 35) des souris immunisées avec 5×10^8 UFC de *L. lactis* sauvage (wt, contrôle négatif), de *L. lactis* produisant E7-CWA, seule (E7) ou en combinaison avec la souche NZ(pSEC:scIL-12) produisant scIL-12 (E7/IL-12). Les splénocytes ont été cultivés pendant 24 h avec 2 μ g de peptide E7 synthétique (RAHYNIVTF, peptide), ou du tampon PBS. Les cytokines IL-2 (A) et IFN- γ (B) ont été dosées par ELISA. Cette figure présente une des trois expériences d'immunisation menées indépendamment et donnant des résultats similaires. Les valeurs indiquées sont les valeurs moyennes obtenues pour des groupes de trois souris. Les différences statistiquement significatives ($P < 0,05$) par rapport au groupe immunisé avec E7/PBS sont indiquées par un astérisque (*). Les différences significatives par rapport aux groupes E7/IL-12/PBS ou E7/peptide sont indiquées par deux astérisques (**).

Figure 6. Production of Th1 cytokines by splenocytes of mice immunized with recombinant *L. lactis*. Levels of Th1 cytokines were assayed following sacrifice on day 35 from mice immunized with 5×10^8 CFU of wild-type *L. lactis* (wt), recombinant *L. lactis* displaying E7 antigen (E7) and mice co-immunized with *L. lactis* displaying E7 and *L. lactis* strain secreting active murine IL-12 (E7/IL-12). Spleen cells were cultured for 24 h with 2 μ g of E7 peptide (RAHYNIVTF, peptide) or PBS and Th1 cytokines IL-2 (A) and IFN- γ (B) determined from culture supernatant by ELISA. This represents one of three separate experiments showing similar results. Values were recorded as the mean and standard deviation of $n =$ three mice per treatment group. Statistically significant differences ($P < 0.05$) in relation to E7/PBS group are denoted by one asterisk (*) or two asterisks (**) for differences in relation to E7/IL-12/PBS or E7/peptide.

réelle activité adjuvante. Ceci avait déjà été montré pour certains vaccins à ADN où l'IL-12 était co-exprimée avec un antigène [6]. L'IL-12 pourrait également minimiser les risques de développement de tolérance immunitaire à un antigène donné [39]. Ceci pourrait être particulièrement intéressant pour le développement de certains vaccins vivants utilisant des bactéries lactiques capables de persister au niveau de la muqueuse de l'hôte.

4. CONCLUSION

Il existe un intérêt croissant pour le développement de vaccins vivants oraux contre divers pathogènes dont le papillomavirus humain de type 16. L'utilisation de vecteurs bactériens vivants pour délivrer à la muqueuse la protéine d'intérêt dans des traitements de tumeur ou à des fins vaccinales pourrait également réduire le risque de toxicité résultant d'administration systémique. Dans ce travail, nous avons montré l'effet adjuvant d'une souche de *L. lactis* produisant l'IL-12 en mesurant l'amélioration de la réponse à un antigène. La production d'IL-2 et d'IFN- γ en réponse à l'administration d'une souche de *L. lactis* présentant une forme d'E7 ancrée à sa surface a été sensiblement améliorée par la co-administration de la souche produisant l'IL-12. Il est clairement établi que l'IL-12 joue un rôle essentiel dans l'orientation de la réponse immune en induisant les cellules Th1 et en réduisant les réponses Th2 [41]. Or, lors de cancer du col de l'utérus, la densité de cellules Th2 est élevée alors que celle de cellules Th1 chute fortement [14]. Un des effets recherchés pour un traitement par immunothérapie est donc de rétablir une réponse immune vers le type Th1. En se basant sur ces données, des souches de *L. lactis* sécrétant l'IL-12 ainsi qu'un antigène spécifique représentent des candidats prometteurs pour envisager de nouvelles perspectives de prévention ou de traitement du cancer du col de l'utérus.

RÉFÉRENCES

- [1] Barth H., Klein R., Berg P.A., Wiedenmann B., Hopf U., Berg T., Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HbeAg during treatment with IL-12 in a patient with respiratory-refractory chronic hepatitis B, *Hepato-Gastroenterol.* 48 (2001) 553–555.
- [2] Bermúdez-Humarán L.G., Langella P., Miyoshi A., Gruss A., Taméz-Reyes R.S., Montes de Oca-Luna R., Le Loir Y., Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 917–922.
- [3] Bermúdez-Humarán L.G., Langella P., Cortez-Perez N., Gruss A., Tamez-Guerra R.S., Oliveira S.C., Saucedo-Cardenas O., Montes de Oca-Luna R., Le Loir Y., Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production, *Infect. Immun.* 71 (2003) 1887–1896.
- [4] Bermúdez-Humarán L.G., Cortez-Perez N.G., Le Loir Y., Gruss A., Rodríguez-Padilla C., Saucedo-Cardenas O., Langella P., Montes de Oca-Luna R., Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in *Lactococcus lactis*, *Biotechnol. Progr.* 19 (2003) 1101–1104.
- [5] Bolhuis A., Tjalsma H., Smith H.E., de Jong A., Meima R., Venema G., Bron S., van Dijk J.M., Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2934–2941.
- [6] Boyaka P.N., McGhee J.R., Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 51 (2001) 71–79.
- [7] Chen B., Timiryasova T.M., Gridley D.S., Andres M.L., Dutta-Roy R., Fodor I., Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated IL-2 and IL-12 antitumor immunotherapy, *Cytokine* 15 (2001) 305–134.
- [8] Cortez-Perez N.G., Bermúdez-Humarán L.G., Langella P., Rodríguez-Padilla C., Gruss A., Le Loir Y., Montes de Oca-Luna R., Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV16-E7 oncoprotein, *FEMS Microbiol. Lett.* 229 (2003) 37–42.
- [9] de Ruyter P.G., Kuipers O.P., de Vos W.M., Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3662–3667.

- [10] Dieye Y., Usai S., Clier F., Gruss A., Piard J.C., Optimizing protein targeting in lactic acid bacteria, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 4157–4166.
- [11] Drouault S., Corthier G., Ehrlich S.D., Renault P., Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4881–4886.
- [12] Enouf V., Langella P., Commissaire J., Cohen J., Corthier G., Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1423–1428.
- [13] Gasson M.J., Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing, *J. Bacteriol.* 154 (1983) 1–9.
- [14] Ghim S.J., Sundberg J., Delgado G., Jenson A.B., The pathogenesis of advanced cervical cancer provides the basis for an empirical therapeutic vaccine, *Exp. Mol. Pathol.* 71 (2001) 181–185.
- [15] Gibson T.J., Studies of the Eppstein-Barr virus genome, Ph.D. thesis, University of Cambridge, Cambridge, England, 1984.
- [16] Hultgren O.H., Stenson M., Tarkowski A., Role of IL-12 in *Staphylococcus aureus*-triggered arthritis and sepsis, *Arthrit. Res.* 3 (2001) 41–47.
- [17] Jacobson M.A., Hardy D., Connick E., Watson J., DeBruin M., Phase 1 trial of a single dose of recombinant human interleukin-12 in human immunodeficiency virus-infected patients with 100-500 CD4 cells/microL, *J. Infect. Dis.* 182 (2000) 1070–1076.
- [18] Kuipers O.P., de Ruyter P.G., Kleerebezen M., de Vos W.M., Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria, *J. Biotechnol.* 64 (1998) 15–21.
- [19] Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [20] Langella P., Le Loir Y., Ehrlich S.D., Gruss A., Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 5806–5813.
- [21] Le Loir Y., Gruss A., Ehrlich S.D., Langella P., A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 1895–1903.
- [22] Leonard J.P., Sherman M.L., Fisher G.L., Buchanan L.J., Larsen G., Atkins M.B., Sosman J.A., Dutcher J.P., Vogelzang N.J., Ryan J.L., Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production, *Blood* 90 (1997) 2541–2548.
- [23] Ling P., Gately M.K., Gubler U., Stern A.S., Lin P., Hollfelder K., Su C., Pan Y.C.E., Hakimi J., Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity, *J. Immunol.* 154 (1995) 116–127.
- [24] Lui V.W., Falo L.D., Huang L., Systemic production of IL-12 by naked DNA mediated gene transfer: toxicity and attenuation of transgene expression in vivo, *J. Gene Med.* 3 (2001) 384–393.
- [25] Metzger D.W., McNutt R.M., Collins J.T., Buchanan J.M., van Cleave V.H., Dunnick W.A., Interleukin-12 acts as an adjuvant for humoral immunity through interferon-gamma-dependent and -independent mechanisms, *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 1958–1965.
- [26] Michel N., Osen W., Gissmann L., Schumacher T.N., Zentgraf H., Muller M., Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination, *Virology* 294 (2002) 47–59.
- [27] Nastala C., Edington H., McKinney T., Tahara H., Nalesnik M., Brunda M., Gately M.K., Wolf S., Schreiber R., Storkus W., Lotze M., Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production, *J. Immunol.* 153 (1994) 1697–1703.
- [28] Nouaille S., Ribeiro L.A., Miyoshi A., Pontes D., Le Loir Y., Oliveira S.C., Langella P., Azevedo V., Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*, *Genet. Mol. Res.* 2 (2003) 102–111.
- [29] Paik S.H., Chakicherla A., Hansen J.N., Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23134–23142.
- [30] Park A.Y., Hondowicz B., Kopf M., Scott P., The role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*, *J. Immunol.* 168 (2002) 5771–5777.
- [31] Payne M.S., Jackson E.N., Use of alkaline phosphatase fusions to study protein secretion in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 2278–2282.
- [32] Piard J.C., Jimenez-Diaz R., Ehrlich S.D., Fischetti V.A., Gruss A., The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria, *Adv. Exp. Med. Biol.* 418 (1997) 545–550.
- [33] Podlaski F.J., Nandouri V.B., Hulmes J.D., Pan Y.C., Levin W., Danho W., Chizzonite R., Gately M.K., Stern A.S., Molecular

- characterization of interleukin-12, Arch. Biochem. Biophys. 294 (1992) 230–237.
- [34] Poquet I., Ehrlich S.D., Gruss A., An export-specific reporter designed for Gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*, J. Bacteriol. 7 (1998) 1904–1912.
- [35] Rakhmilevich A.L., Turner J., Ford M.J., McCabe D., Sun W.H., Sondel P.M., Grotta K., Yang N.Y., Gene gun-mediated skin transfection with interleukin-12 gene results in regression of established and metastatic murine tumors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 6291–6296.
- [36] Ribeiro L.A., Azevedo V., Le Loir Y., Oliveira S.C., Dieye Y., Piard J.C., Gruss A., Langella P., Efficient targeting of the *Brucella abortus* immunodominant antigen L7/L12 by *Lactococcus lactis*: a first step towards new live vaccines against brucellosis, Appl. Environ. Microbiol. 68 (2002) 910–916.
- [37] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.
- [38] Sin J.I., Kim J.J., Arnold R.L., Shroff K.E., McCallus D., Pachuk C., McElhiney S.P., Wolf M.W., Pompa-de Bruin S.J., Higgins T.J., Ciccarelli R.B., Weiner D.B., IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4⁺ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge, J. Immunol. 162 (1999) 2912–2921.
- [39] Sinkovics J.G., Horvath J.C., Vaccination against human cancers, Int. J. Oncol. 16 (2000) 81–96.
- [40] Steidler L., Hans W., Schotte L., Neirynek S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., Remaut E., Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10, Science 289 (2000) 1352–1355.
- [41] Trinchieri G., Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity, Annu. Rev. Immunol. 13 (1995) 251–276.
- [42] van Asseldonk M., Rutten G., Oteman M., Siezen R.J., de Vos W.M., Simons G., Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363, Gene 95 (1990) 155–160.
- [43] Voest E.E., Kenyon B.M., O'Reilly M.S., Truitt G., D'Amato R.J., Folkman J., Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin-12, J. Natl. Cancer Inst. 19 (1995) 581–586.
- [44] zur Hausen H., Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer, Virology 184 (1991) 9–13.