



I N S T I T U T O D E E S P A Ñ A

LA RECHERCHE DE NOUVELLES
STRATÉGIES ANTI-INFECTIEUSES
CONTRE LA TUBERCULOSE,
UNE ODYSÉE ENTRE LES MONDES
DE LA GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNES
ET DE L'IMMUNOLOGIE

POR LA ACADÉMICA ELECTA

EXCMA. SRA. D^a BRIGITTE GICQUEL

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN COMO ACADÉMICA DE HONOR
EL DÍA 16 DE MAYO DE 2024

LAUDATIO POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO

ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS



REAL ACADEMIA DE MEDICINA
ZARAGOZA
2024



I N S T I T U T O D E E S P A Ñ A

LA RECHERCHE DE NOUVELLES
STRATÉGIES ANTI-INFECTIEUSES
CONTRE LA TUBERCULOSE,
UNE ODYSÉE ENTRE LES MONDES
DE LA GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNES
ET DE L'INMUNOLOGIE

POR LA ACADÉMICA ELECTA

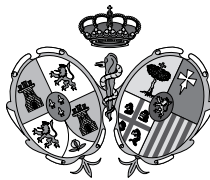
EXCMA. SRA. D^a BRIGITTE GICQUEL

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN COMO ACADÉMICA DE HONOR

EL DÍA 16 DE MAYO DE 2024

LAUDATIO POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO

ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS



REAL ACADEMIA DE MEDICINA

ZARAGOZA

2024

Depósito Legal: Z-919-2024

Edita y distribuye:

Real Academia de Medicina
Plaza Basilio Paraíso, 4 – 50005 Zaragoza

Composición e impresión:

Navarro & Navarro Impresores. Corona de Aragón, 28, local – 50009 Zaragoza

SUMARIO

Laudatio	
<i>Carlos Martín Montañés</i>	7
Conferencia	
“La recherche de nouvelles stratégies anti-infectieuses contre la tuberculose, une odysée entre les mondes de la génétique bactériennes et de l’immunologie”	
<i>Brigitte Gicquel</i>	17
Conferencia	
“La búsqueda de nuevas estrategias antiinfecciosas contra la tuberculosis, una odisea entre los mundos de la genética bacteriana y la inmunología”	
<i>Brigitte Gicquel</i>	33

LAUDATIO

DE LA

EXCMA. SRA. D^a BRIGITTE GICQUEL

ACADÉMICA DE HONOR

DE LA

REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE ZARAGOZA

POR EL

ILMO. SR. D. CARLOS MARTÍN MONTAÑÉS

ACADÉMICO DE NÚMERO

LAUDATIO

Excelentísimo Sr. presidente de la Real Academia de Medicina de Zaragoza;
Excmos e Ilmos; Señoras y Señores Académicos;
Autoridades presentes;
Señoras y señores;
Amigas y amigos,
Querida Brigitte,

En primer lugar, expresar mi agradecimiento a la Junta de Gobierno de esta Real Academia por haberme encomendado la presentación de nuestra invitada, en esta solemne sesión de recepción como Académica de Honor de la Ilustre Profesora Brigitte Gicquel. La Profesora Brigitte Gicquel es una investigadora reconocida en el campo de la microbiología y pionera en la investigación de la genética del bacilo de la tuberculosis.

Década de 1970, comienza el desarrollo de la ingeniería genética de las bacterias.

En los años 70 se establece la técnica de ADN recombinante por microbiólogos como Stanley Cohen. Esto abre las puertas a la modificación genética de bacterias de crecimiento rápido como *Escherichia coli* y otros organismos para diversos fines, como la producción de medicamentos y la investigación fundamental. Mientras tanto, pocos investigadores se planteaban la manipulación genética de las bacterias del género *Mycobacterium*, que incluye especies de importantes patógenos humanos como *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis. Estos son microorganismos de crecimiento muy lento y que tardan en crecer semanas o meses y cuya alta patogenicidad y transmisión respiratoria obligaba a trabajar en laboratorios de seguridad biológica P3, un enorme reto que dificulta enormemente su estudio. A esto añadimos que la Organización Mundial de la Salud en estos años, era muy optimista respecto al control de la tuberculosis, proyectando su posible erradicación para el año 2000, dado que existía un tratamiento que, aunque largo, muy eficaz, contra la tuberculosis sensible a los fármacos. Hoy en el año 2024 la tuberculosis es la enfermedad infecciosa que sigue causando mayor número de muertes en el

mundo, superando de nuevo a los causados por la Covid 19 en los años 2020 y 2021.

Década de los 1980, el inicio de la investigación de la genética del bacilo de la tuberculosis.

En los años 80, tan solo dos grupos de investigación se interesan por el estudio de la genética del bacilo de la tuberculosis. Un grupo en Estados Unidos, dirigido por el Profesor Bill Jacobs en el Albert Einstein Institute de Nueva York y el grupo europeo, dirigido por nuestra Académica de Honor, la Profesora Brigitte Gicquel, en el Instituto Pasteur de Paris. Se aventuran a desarrollar y poner en marcha técnicas de ingeniería genética para poder manipular el agente causal de la tuberculosis *M. tuberculosis*, descrito en 1882 por el científico alemán Robert Koch y que es el patógeno que más enfermedad y muerte ha causado a la humanidad a lo largo de la historia, y que hasta la fecha no había sido posible su manipulación genética.

En la década de los 1990 la irrupción del virus del VIH, y la extensión de la pandemia de SIDA dará la razón a nuestra pionera investigadora sobre la enorme importancia de desarrollar herramientas genéticas para la lucha contra el bacilo de la tuberculosis. Antes de disponer del tratamiento antirretroviral contra el VIH, el diagnóstico de SIDA era una condena a muerte segura y la asociación de SIDA y tuberculosis resultaba ser letal como sucede hoy en día en los países que no tienen acceso al tratamiento antirretroviral y antituberculoso. El virus del VIH destruye los linfocitos CD4 disminuyendo la inmunidad celular y por lo tanto el control del bacilo de la tuberculosis. En los años 90 aparecen epidemias de tuberculosis multirresistentes como la causada por la “cepa W” en Nueva York extendida en Estados Unidos y luego por todo el mundo que era resistente al tratamiento antituberculoso, causando una enorme mortalidad en pacientes con SIDA.

Esta nueva realidad con las dificultades de diagnóstico y tratamiento en países con gran incidencia de tuberculosis, como África, India, Indonesia entre otros, la asociación de SIDA /tuberculosis y la aparición de cepas multirresistentes, nos hace volver a la realidad y la OMS hoy plantea el acabar con la epidemia de tuberculosis como una de las metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). En la reunión de alto nivel de las Naciones Unidas sobre la tuberculosis de 2018, la OMS alerta de que se necesitan grandes inversiones internacionales para mejorar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis, a fin de alcanzar la meta mundial del control de la enfermedad proyectada para el año 2030. En septiembre del pasado año, de nuevo los líderes mundiales que participan en la segunda reunión de Alto Nivel de la Asamblea General de las Naciones Unidas sobre la Tuberculosis en Nueva

York aprobaron una declaración política con nuevas y ambiciosas metas para los próximos cinco años con el fin de avanzar en los esfuerzos mundiales por acabar con la epidemia de tuberculosis y acelerar el desarrollo de una nueva vacuna más eficaz que la actual BCG en la prevención de las formas respiratorias y formas multirresistentes responsables de la transmisión y en el tratamiento de la enfermedad.

Década de los 1980, creación de la Unidad de “Génie Génétique” en el Instituto Pasteur de París.

Volvemos a la década de los años 1980 en los que la Dra Brigitte Gicquel inicia sus investigaciones en micobacterias liderando la línea de genética de micobacterias y se incorpora a la Unidad de reciente creación de “Génie Génétique”, creada y dirigida por el profesor Julian Davies en el edificio de Biotecnología en el Instituto Pasteur de Paris. En dicha unidad que se está formando en el Instituto Pasteur, también se trabaja con otras líneas de investigación que incluyen otros dos microorganismos de difícil manipulación. Por un lado, el género *Streptomyces*, que incluye bacterias productoras de antibióticos que dirige el Dr Charles Thomson y por otro el género *Listeria*, patógeno intracelular que las profesoras Brigitte Gicquel y Pascale Cossart estudiaron en colaboración con el grupo de Fernando Baquero en Madrid. El estudio fue desarrollado principalmente por Pascale Cossart y es considerado hoy un modelo de la patogenicidad molecular bacteriana en microbiología. El nombre en francés de la unidad en la que trabaja la Profesora Brigitte Gicquel “Génie Génétique”, representa un juego de palabras, que podríamos traducir como “Ingeniería Genética” pero también como el “Ingenio Genético”, que nos recuerda al “Genio e Ingenio” de nuestro escritor aragonés del siglo de oro, Baltasar Gracián y que nos indica que la sabiduría debe aplicarse a la creatividad ingeniosa, y que es precisamente esa mezcla de “genio e ingenio” la que debe llevarnos a tomar las decisiones correctas en la elección de nuestro camino, “el necio yerra, la persona prudente elige su camino de forma adecuada”.

Brigitte Gicquel es hoy Profesora Emérita del Instituto Pasteur y Profesora investigador visitante en el Centro de Control de Enfermedades Crónicas del distrito de Nashan en Senzhen, en China. Entre los numerosos cargos que la Dra Brigitte Gicquel ha ocupado durante su carrera investigadora tras su etapa de estudiante de posgrado, en el Centro Universitario del Hospital Cochin, de París y tras obtener su doctorado, en 1998 ella creó y dirigió la “Unidad de Genética de Micobacterias”, Instituto Pasteur de París. La Profesora Gicquel ha sido Profesor Titular del Instituto Pasteur, y jefe de la Unidad de Genética de Micobacterias, Instituto Pasteur de París. Ella ha dirigido la Unidad de Patógenos Bacterianos Emergentes del Instituto Pasteur de Shanghai. La Profesora Gicquel

ha sido codirectora científica interina del Instituto Pasteur de Shanghai y jefe del Departamento de Patogenicidad Microbiana Instituto Pasteur de Shanghai.

Sus más de trescientas publicaciones científicas incluyen artículos originales en las revistas del mayor impacto en investigación como Nature, Science, Journal Experimental Medicine, Lancet o PNAS (154 desde 1998). Entre los Honores y premios recibidos por la profesora Gicquel podemos destacar, en el año 2008 Premio Canetti, Francia. En el año 2004 le es otorgado el título de “Caballero de la Legión de Honor” de Francia. En el año 2002 Premio Alexandre Joannides de la Academia Francesa de Ciencias. Es miembro de la Academia Europea de Ciencias en la sección de Bioquímica y Biología molecular en el año 2018. En nuestro país, es Académica Correspondiente extranjera de la Real Academia de Medicina de Zaragoza en el año 1995. En el año 2006 recibió el Premio Desarrollo Sostenible de la Fundación Ecología y Desarrollo, que estoy orgulloso de compartir con ella.

Aportaciones de la profesora Brigitte Gicquel al diagnóstico y epidemiología de la tuberculosis.

La Profesora Brigitte Gicquel, es pionera de la genética del bacilo de la tuberculosis, describiendo las primeras herramientas de biología molecular del patógeno. Estas herramientas genéticas, permiten transferir ADN a micobacterias tanto a los aislados clínicos de *M. tuberculosis* que permiten la construcción de mutantes como a la actual centenaria vacuna contra la tuberculosis BCG (Bacilo de Calmette y Guerin). Su descubrimiento de la Secuencia de Inserción *IS6110* de *M. tuberculosis* permitió disponer de una diana específica, y que es utilizada para las primeras pruebas de diagnóstico rápido molecular basado en la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR de la tuberculosis. Hoy el diagnóstico molecular en uso GeneXpert sigue utilizando *IS6100* como diana de diagnóstico.

La Profesora Gicquel mostró que esta secuencia *IS6110* aun siendo específica de *M. tuberculosis*, era capaz de transponer y saltar en distintos lugares del genoma del bacilo. Fue su equipo junto al del Profesor de Jan Van Embden quien mostró la posibilidad de su uso como herramienta para el genotipado molecular, diferenciando aislados clínicos de *M. tuberculosis* por su diferente localización debido a la presencia de esta secuencia en regiones variables del genoma de cada aislado clínico, mostrando así su utilidad para la epidemiología molecular de la tuberculosis y el estudio de su transmisión.

Aportaciones de la Profesora Brigitte Gicquel a los estudios genéticos de *M. tuberculosis*, estudio de su virulencia e inactivación selectiva de genes.

La Profesora Gicquel y su equipo construyeron la primera librería de mutantes de *M. tuberculosis* utilizando transposones y descubrió los primeros genes de virulencia de *M. tuberculosis* adaptando la mutagénesis de transposones (STM) que permiten identificar los genes inactivados. Descubrieron mutantes que no provocaron infección pulmonar en ratones asociados con la inactivación de un grupo de genes responsables de la síntesis y el transporte de phthiocerol dimicoserosato (PDIM) a través de la pared celular. Previamente habían aislado el primer gen de virulencia de *M. tuberculosis* cuyo producto también está asociado a la pared celular.

Formación de investigadores: la escuela de Brigitte Gicquel y su impacto en la investigación en nuestro país.

La Profesora Gicquel ha formado investigadores que ahora dirigen importantes grupos de investigación que son referentes en genética de micobacterias a nivel mundial como los Doctores Christophe Guillhot , Mary Jackson, Jean-Marc Reytrat, Vladimir Pelicic y Olivier Neyrolles entre otros.

En los años 80 el Profesor Gómez Lus, con su visión pionera de la investigación trabajaba en la Universidad de Zaragoza desde hacía años, con lo que hoy la OMS considera será la próxima pandemia, la resistencia a antibióticos. Se interesa en la transposición y transmisión por plásmidos de estos genes colaborando con el Profesor Julian Davies que está formando la Unidad de UGM (“Unité Génie Génétique”). En la parte que a mí me atañe el profesor Gómez Lus tras finalizar mis estudios de Medicina me envía a una estancia de 5 años a la Universidad de Cantabria a formarme para la realización de mi tesis doctoral en la transposición de los genes de resistencia de los plásmidos que se aíslan en los Hospitales de Zaragoza bajo la dirección del Dr Juan María García Lobo y como investigador postdoctoral bajo la dirección del Dr Fernando de la Cruz.

A las pocas semanas de mi vuelta a la Universidad de Zaragoza, y tras conversaciones entre el Profesor Julian Davies y el Profesor Gómez Lus, la Profesora Gicquel visita nuestra Universidad buscando investigadores para trabajar en Genética de micobacterias con experiencia en marcadores de resistencia. Vuelvo a hacer las maletas y a París. Al inicio del grupo de investigación de Brigitte en el Instituto Pasteur de París, de 1987 a 1992, formé parte del equipo de Brigitte Gicquel, como primer investigador postdoctoral como becario de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y posteriormente como investigador permanente en el Instituto Pasteur. Compartí 5 años de intenso y duro trabajo

y que considero fueron los mejores años de investigador senior, en los que publicamos importantes artículos. En este período aislamos el transposón *Tn610* y demostramos por primera vez la transposición en micobacterias. En esta etapa de París no solo cambió mi vida científica sino cambió mi vida personal: me casé con mi mujer María José Iglesias (Chus) iniciando la familia y tuvimos en París a nuestro hijo Carlos.

Durante este periodo se forman otros investigadores postdoctorales en el equipo de Brigitte creciendo la colonia española en el Instituto Pasteur como la Dra Isabel Otal de la Universidad de Zaragoza y la Dra Marivi Mendiola de la Universidad de Cantabria, quienes inician y ponen en marcha el tipado molecular de la tuberculosis.

Impacto de la Dra Brigitte Gicquel en la formación del Grupo de Investigación de Genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza en los años 90.

A mi vuelta a España en el año 1992 iniciamos nuestros trabajos de epidemiología molecular TB utilizando la Secuencia de Inserción *IS6110* y en la búsqueda de genes de virulencia en cepas epidémicas. Para la formación del Grupo de investigación la generosidad y ayuda de la Dra Gicquel no tuvo límites.

En estos inicios miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad realizan estancias de formación en el Instituto Pasteur como José Antonio Aínsa, Esther Pérez, Jesús Gonzalo entre otros, muchas veces realizando los experimentos de Ingeniería Genética con *Escherichia coli* en la Universidad de Zaragoza y las manipulaciones en *M. tuberculosis* en el laboratorio P3 de Seguridad Bilógica de Pasteur hasta que pudimos disponer de las actuales instalaciones de laboratorio de Seguridad Biológica en nuestra Universidad.

Las investigaciones de grupo fueron posibles y financiadas principalmente al formar parte de los dos primeros proyectos europeos de vacuna de tuberculosis, proyectos europeos coordinados por la Profesora Brigitte Gicquel desde su inicio, como el proyecto del Tercer Programa Marco de la Unión Europea (UE) FP3 entre los años 93-96 “Construction of stable Recombinant BCG and other Live Mycobacterial Vaccines“ (CT/92-0520) y el proyecto del Cuarto Programa Marco de la UE FP4 “Development of Novel Vaccines by Attenuation of *M. tuberculosis*” (FP4 997-1999 BIOMED 2 CT/96-213) y a partir del año 2000 los grandes consorcios europeos de decenas de universidades y centros de investigación europeos como el del Quinto Programa Marco de la UE FP5 “A Cluster for Tuberculosis Vaccine Development” que Brigitte coordinaba y fueron el inicio de los Grandes proyectos de Consorcios Europeos financiados

por la UE como TBVAC, NEWTBVAC, TBVAC2020 and HORIZON TBVAC que hoy continúan.

Concluiré remarcando que la Dra. Brigitte Gicquel ha jugado un papel significativo en la investigación y el avance de la genética de las micobacterias, particularmente en el contexto de la tuberculosis. Hoy contamos con la presencia de la más reconocida experta en la Genética y Genómica del bacilo de la tuberculosis a nivel internacional, Entre sus contribuciones destacadas se encuentran sus investigaciones sobre la virulencia y la patogénesis del bacilo de la tuberculosis, así como su trabajo en la identificación de genes involucrados en la resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento de esta enfermedad. Además, ha sido pionera en el desarrollo de nuevas herramientas genéticas y enfoques para estudiar y abordar la tuberculosis desde una perspectiva molecular.

La Dra Gicquel ha desempeñado un papel clave contribuyendo y haciendo posible la construcción del candidato a vacuna frente a tuberculosis MTBVAC. Seleccionamos la inactivación del gen *phoP*, que codifica para un factor de transcripción, que regula uno de los mayores circuitos de virulencia de *M. tuberculosis*. Su importancia fue descubierta por nuestro grupo de investigación de la Universidad de Zaragoza al estudiar una epidemia de tuberculosis multirresistente de la cepa “B” que causó más de cien muertos en los años 90 en nuestro país entre pacientes con SIDA. La segunda mutación independiente de MTBVAC se realizó en el gen *fadD26* que codifica para uno de los mayores lípidos de virulencia (PDIM) y fue seleccionado por haber sido descrito en el laboratorio de la Dra Gicquel como esencial para virulencia de *M. tuberculosis*. A día de hoy MTBVAC ha demostrado ser segura y más inmunogénica que la actual centenaria vacuna BCG en adultos y bebés recién nacidos e iniciará los estudios de eficacia en adolescentes adultos en África a finales del presente año. MTBVAC hoy se encuentra en Fase 3, última fase de estudio de seguridad, inmunogenicidad y eficacia en recién nacidos en países endémicos como son Senegal, Madagascar y Sudáfrica, antes de su aprobación por las agencias del medicamento.

Sin más dilación, señoras y señores, les dejo con la protagonista de nuestro acto de recepción de la Académica de Honor la Profesora Brigitte Gicquel que nos hablará de “*La recherche de nouvelles stratégies anti-infectieuses contre la tuberculose, une odyssée entre les mondes de la génétique bactériennes et de l’immunologie*”.

Très chère Brigitte “la parole est à toi”

Querida Brigitte, “La palabra es suya”

DISCURSO DE RECEPCIÓN

LA RECHERCHE DE NOUVELLES
STRATÉGIES ANTI-INFECTIEUSES
CONTRE LA TUBERCULOSE,
UNE ODYSÉE ENTRE LES MONDES
DE LA GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNES
ET DE L'INMUNOLOGIE

POR LA

EXCMA. SRA. D^a BRIGITTE GICQUEL
ACADÉMICA DE HONOR

**LA RECHERCHE DE NOUVELLES STRATÉGIES ANTI-INFECTIEUSES
CONTRE LA TUBERCULOSE, UNE ODYSÉE ENTRE LES MONDES
DE LA GÉNÉTIQUE BACTÉRIENNES ET DE L'IMMUNOLOGIE**

D^a Brigitte Gicquel

Son Excellence Monsieur le Président de l'Académie Royale de Médecine de Saragosse ;
Ses Excellences Mesdames et Messieurs membres de l'Académie;
Mesdames et Messieurs,
Chers amis,

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma gratitude au Conseil d'Administration de cette Académie pour m'avoir proposé comme Académicienne Honoraire de l'Académie Royale de Médecine de Saragosse.

Aujourd'hui, on ne parle que d'intelligence artificielle. Je voudrais parler d'abord d'une autre sorte d'intelligence, l'intelligence augmentée. On définit l'intelligence augmentée comme le rapport entre la somme de résultats obtenue par un groupe de personnes travaillant ensemble et la somme de résultats obtenus par ces personnes travaillant séparément. Ce rapport est généralement supérieur à 1, ce qui montre que l'on obtient plus de résultats et plus d'avancées quand on a travaillé à plusieurs, et même davantage si l'on vient d'horizons différents. C'est cette sorte d'intelligence qui est la source de la plupart des découvertes scientifiques aujourd'hui. L'attitude du chercheur isolé criant Euréka le conduit rarement à une grande découverte. De plus une découverte a souvent nécessité plusieurs outils technologiques conduisant au but, après un long voyage dans différentes sphères que je qualifierais d'odyssée, en raison des embûches chaque fois rencontrées.

Je voudrais dire aujourd'hui, comment au cours de ma carrière scientifique, les différentes découvertes faites par mon équipe de recherche ont souvent été

les fruits d'intelligence augmentée et aussi de rencontres non programmées à l'avance.

D'abord. Les débuts dans l'ombre des grands savants

J'ai eu le privilège d'arriver à l'Institut Pasteur pour commencer une thèse sur la régulation de l'expression génétique chez la bactérie modèle *Escheriechia coli* dans l'ancien laboratoire de Jacques Monod qui avait éclaté en plusieurs groupes dont celui d'Agnès Ullmann avec qui je commençai ma thèse. Le génie génétique était en train de pointer son nez, les enzymes de restriction venaient d'être découverts et dans la foulée, le clonage puis le séquençage d'ADN. Ainsi, j'ai pu terminer ma thèse en séquençant le premier gène de régulation positive de l'expression génétique, le récepteur de l'AMP cyclique encore appelée la protéine CAP. J'avais auparavant mis au point la technique de repérage des gènes clonés par la reconnaissance de son produit par des anticorps dans le laboratoire de Philippe Kourilsky. A cette époque, on pensait ainsi pouvoir avancer rapidement dans la connaissance des gènes de tout organisme vivant en les clonant dans la bactéries modèle *E. coli* puisque le code génétique est universel. En fait nous avons vite rencontré le premier obstacle, les gènes eucaryotes ont des introns, ce qui ne permet pas d'avoir accès à leur expression à partir de n'importe quel fragment cloné chez *E. coli* où les gènes n'ont pas d'introns (sauf exception) et par conséquent pas de mécanisme les éliminant avant le décodage des ARN messagers. Même si le code génétique est universel, la structure des gènes ne l'est pas. Nous avons cloné et exprimé le gène de la beta-galactosidase de *E. coli* en construisant un phage lambda recombinant exprimant ce gène dans une bactérie qui en était dépourvu, mais nous n'avons pas pu exprimer le gène de l'ovalbumine de poule qui avait des introns bloquant le décodage au niveau de ses introns transcrit dans l'ARN messagers et non maturés avant la lecture. Pourtant, la plupart des chercheurs se tournait vers l'étude des gènes eucaryotes et le développement des organismes supérieurs, ce qui a permis d'en découvrir les spécificités comme les introns, puis d'autres types de régulation de l'expression inconnus chez les microorganismes au moment du prix Nobel reçu par François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff pour la l'étude de la régulation de l'expression des gènes par répression

de la transcription. A cette époque, la régulation c'était la répression comme le décrivent nos trois prix Nobel français, en étudiant la régulation de l'opéron lactose, et la lysogénie du phage Lambda, deux systèmes bactériens. L'étude de la régulation de l'expression génétique chez les organismes pluricellulaires montra qu'il ne s'agissait pas toujours d'un mécanisme de répression mais souvent d'un mécanisme d'induction par un régulateur positif et même parfois de réarrangements génétiques de cellules somatiques comme le montra très tôt Barbara MacClintock avec le maïs puis Susumu Tonegawa avec les cellules productrices d'anticorps chez les mammifères.

Le choix de *Mycobacterium tuberculosis* comme sujet d'étude

Dans les années 80, plus particulièrement dans le domaine médical, la mode n'était plus à l'étude de la microbiologie puisque la découverte de plusieurs antibiotiques de différentes classes de molécules faisait espérer la guérison de toutes les maladies d'origine bactérienne. On sait aujourd'hui que ce ne fut pas le cas et qu'une maladie d'origine bactérienne comme la tuberculose est loin d'être éradiquée. Elle est même l'agent pathogène provoquant le plus de décès dans le monde en dehors d'années d'épidémie comme celle du COVID 19 récemment. Dans les années 80, j'ai décidé, un peu à contre-courant de la mode, de m'intéresser aux microorganismes pathogènes et en particulier à *M. tuberculosis* responsable de la tuberculose humaine, et qui provoque toujours environ 1,5 million de morts par an et l'infection d'environ 1/3 de la population mondiale qui reste ainsi à risque de tuberculose. Dans les années 80 on assista à l'émergence de l'épidémie de SIDA, maladie qui n'a pas pu être éradiquée à ce jour faute de la possibilité de mettre au point un vaccin efficace. L'immunodéficience induite par le SIDA augmente le passage du statut d'infecté par le bacille de la tuberculose à celui de malade tuberculeux, ce qui a augmenté dramatiquement l'incidence de la tuberculose. Les virus du SIDA sont très polymorphes et leur diversité est en constante augmentation après chaque infection, déjouant les réponses immunitaires induites qui sont spécifiques. Le succès de la mise en place d'une tri-thérapie a considérablement diminué le nombre de malade, qui restent cependant infectés et dépendant d'une thérapie à vie. Pour vaincre la tuberculose, un traitement standardisé de six mois est

efficace pourvu qu'il soit bien suivi. Il existe depuis peu un traitement oral de six mois pour la tuberculose multi résistante aux antibiotiques, comprenant un nouvel antibiotique ainsi que d'autres antibiotiques non utilisés encore pour la tuberculose. Cependant, la tuberculose reste un problème de santé publique en raison des difficultés rencontrées par les patients pour un accès au soin et le suivi, nécessaires pour un traitement qui dure plusieurs mois et l'émergence de résistances aux antibiotiques est toujours d'actualité. Un vaccin plus efficace que le BCG contre la tuberculose reste donc une priorité. Les travaux que nous avons entrepris dans les années 80 ont permis de développer les approches génétiques, qui ont rendu possible la mise en évidence de facteurs de virulence bacillaires et la construction d'un candidat vaccin, MTBVAC, avec nos collègues espagnols ici présents. Ces travaux ont aussi caractérisé des éléments génétiques mobiles, l'un d'entre eux a été utilisé pour le typage des bacilles de la tuberculose et est toujours utilisé comme sonde pour le diagnostic de la tuberculose. Je vais maintenant décrire ces travaux.

Un plasmide hybride pour le transfert de gènes chez les mycobactéries

Pour transférer des gènes chez les mycobactéries et réaliser des recombinaisons génétiques, il fallait un vecteur, ce qui fut fait dans notre laboratoire. Les rencontres d'une équipe portugaise, celle de Maria-Odetta Santos Ferrera à Lisbonne qui découvrit plus tard le VIH2 et de Jose Moniz qui vint faire sa thèse chez Hugo David, le chef de l'Unité des mycobactéries à l'Institut Pasteur, furent déterminantes pour que je me rende compte que le monde des mycobactéries ne comprenait pas uniquement des pathogènes comme *M. tuberculosis*, mais aussi des espèces à croissance rapide non pathogènes comme *M. smegmatis*, les deux espèces pouvant permettre la réplication de mycophages et par conséquent, sans doute de plasmides. Daisy Roulland-Dussoix et Abdel Akim Labidi du laboratoire de Hugo David venaient d'isoler le plasmide pAL5000 de *M. fortuitum*, une autre mycobactérie à croissance rapide. Nous avons pu construire un plasmide hybride avec pAL500 et le plasmide pBR322 qui se réplique chez *E. coli*. Puis nous avons pu transférer cet hybride chez *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* grâce à l'électroporation que l'équipe de Bill Jacob à New York avait montré être efficace pour transférer des gènes chez

les mycobactéries. Tout semblait donc prêt pour entamer un voyage dans les mycobactéries avec des approches génétiques, que nous avons mises au point chez *E. coli* et d'autres bactéries modèle comme *M. smegmatis* pour les mycobactéries. Je déposais donc ma première demande de crédit pour séquencer le petit plasmide pAL5000 et construire des outils génétiques pour l'étude de *M. tuberculosis*. Pour y parvenir cela prit beaucoup plus de temps que prévu. On s'amuserait aujourd'hui de savoir qu'il nous fallut plus d'un an pour séquencer 5 000 paires de bases. En fait le génome des mycobactéries est riche en G+C et il fallut modifier les protocoles de séquençage et multiplier les essais. De plus le séquençage était manuel et la technique PCR n'avait encore pas vu le jour. Dans les années 80, il fallait donc beaucoup d'effort pour séquencer 5 000 paires de bases alors qu'aujourd'hui on séquence de l'ADN ancien et que l'on peut accumuler plusieurs milliards de paires de bases en une journée.

La connaissance de la séquence du génome de pAL5000 facilita la construction d'un vecteur hybride avec pBR322 dont la séquence du génome était connue. A ce vecteur hybride furent ajoutés un marqueur de sélection positive et un marqueur de sélection négative. Le marqueur de sélection positive est un gène de résistance aux antibiotiques qui permet d'isoler les bactéries qui ont inséré la cassette d'ADN portant ce gène de résistance aux antibiotiques et confèrent aux bactéries un phénotype de résistance à l'antibiotique utilisé. Le marqueur de sélection négative est un marqueur de contre sélection comme le gène *sac B* qui permet en présence de sucrose d'isoler les bactéries recombinantes qui ont inséré le fragment d'ADN portant le marqueur de sélection positif, mais se sont débarrassées du vecteur portant le gène *sac B* qui provoque la mort de la bactérie en présence de sucrose (le gène *sac B* est responsable de la formation de polymère de sucrose toxique pour la bactérie). Il ne restait plus qu'à y inclure un élément génétique mobile pour effectuer une mutagenèse par insertion au hasard de cet élément pour rechercher les gènes impliqués dans différents phénotypes ou insérer certains gènes modifiés pour en étudier les fonctions.

La transposition chez les mycobactéries

Dans les années 80 la possibilité d'étudier le bacille de la tuberculose et son pouvoir pathogène était une petite révolution et nos travaux de l'époque - qui avançaient plus lentement que prévu - nous donna cependant, d'emblée beaucoup de visibilité. L'étape clef restait à franchir, l'isolement de mutants affectant des fonctions de pathogénicité du bacille de la tuberculose et leur repérage. Nous étions encore loin de la méthode CRISP R/CAS9 et peu de séquences d'ADN génomiques étaient disponibles. Nous nous sommes tournés vers les éléments génétiques mobiles qui pouvaient inactiver des gènes en s'y insérant au hasard dans le chromosome. Ces éléments mobiles sont souvent associés à une résistance aux antibiotiques qui peut servir de marqueur pour détecter l'insertion de ces éléments et l'endroit du génome où ils se sont insérés. Pour isoler de telles éléments mobiles chez les mycobactéries, nous nous sommes donc adressés à la résistance aux antibiotiques souvent associée à de tels éléments génétiques mobiles comme les transposons. C'est là que ce fit la rencontre avec nos collègues espagnols ici présents aujourd'hui. Mon groupe de recherche faisait partie du laboratoire de Julian Davies qui étudiait la résistance aux antibiotiques. Julian revenait d'un meeting où il avait rencontré Raphael Gomez Luz qui avait décrit la découverte d'activités acetyl-transférase ou phosphotransférase vraisemblablement responsables de résistances aux antibiotiques chez des mycobactéries à croissance rapide, ce qui laissait présager l'existence de transposons chez cette famille de bactéries. Nous contactâmes rapidement Don Raphael et une collaboration démarra très rapidement, collaboration qui persiste toujours.

Chez *M. tuberculosis*, seules des résistances aux antibiotiques chromosomiques non transférable horizontalement avaient été décrites. Elles correspondent à des modifications de la cible des antibiotiques et non pas à des gènes codant pour des fonctions inactivant les antibiotiques et généralement localisés sur des éléments génétiques mobiles. Il était donc intéressant d'explorer l'hypothèse d'élément génétique mobile associé à des résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* ou d'autres mycobactéries, à la fois pour l'étude de la résistance aux antibiotiques chez ces espèces bactérienne et pour rechercher des transposons actifs chez les mycobactéries, par conséquent

utiles pour entamer des études génétiques chez ces espèces bactériennes. Nous avons pris contact avec Raphael Gomez Luz qui nous présenta un chercheur de son équipe, Carlos Martin, qui pourrait venir à Paris travailler sur ce sujet. Très vite je pris l'avion pour Saragosse et nous sommes tombés d'accord pour que Carlos Martin vienne à Paris avec une bourse qui serait demandée à l'EMBO. Une bourse de trois mois fut octroyée. Carlos vint dans le labo 2 ans en tant que postdoctorant à IOMMS puis en tant que chercheur permanent à l'Institut Pasteur. Au total Carlos y resta cinq ans. Il vint avec sa femme María José Iglesias, épidémiologiste et qui travailla dans une équipe de l'INSERM. Ils repartirent avec une famille agrandie d'un fils Carlos qui naquit à Paris. Pendant les cinq années, nous avons construit les outils génétiques qui nous ont permis d'entamer les études génétiques chez les mycobactéries, puis de construire un vaccin candidat contre la tuberculose, aujourd'hui toujours à l'étude à Saragosse.

Quand Carlos est arrivé au laboratoire pour rechercher des éléments mobiles détectables d'après leur association avec des gènes de résistance aux antibiotiques, nous avons ensemble découvert le premier élément mobile fonctionnel chez les mycobactéries. Pour cela nous avons utilisé des sondes ADN correspondant à des gènes de résistance aux antibiotiques provenant d'autres transposons isolés d'espèces non mycobactériennes, responsables de dissémination horizontale de résistances aux antibiotiques dans le monde bactérien, ce qui est la base de la transmission nosocomiale des infections résistantes aux antibiotiques. En utilisant ces sondes ADN de résistance aux antibiotiques nous avons isolé un fragment d'ADN d'une mycobactérie, mais qui ne contenait pas de gène de résistance correspondant aux sondes que nous avons utilisées. Ce fut une surprise, mais en séquençant un fragment plus large de la région génomique hybridant avec les sondes, nous avons découvert la séquence d'une transposase. Cette transposase faisait partie d'un transposon qui ne contenait qu'un seul gène de résistance aux antibiotiques, la résistance aux sulfamides. C'était en fait un transposon ancestral de la famille Tn21 qui comprend des transposons avec des résistances aux antibiotiques correspondant aux sondes que nous avons utilisées en plus de la résistance aux sulfamides. Cela fut possible parce qu'à l'époque, nous ne disposions pas de la technologie PCR permettant d'utiliser des sondes plus restreintes et plus

précises. C'est donc la région adjacente à la sonde antibiotique, un fragment de la transposase que nous avons repérée. C'est ainsi un peu par erreur que nous avons identifié le premier transposon mycobactérien qui s'avéra fonctionnel. La transposition utilisée chez les mycobactéries et plus précisément *M. tuberculosis* nous a permis d'entamer une approche génétique de la virulence et de caractériser de nombreux loci de virulence qui sont aujourd'hui toujours étudiés dans les laboratoires. Pour cela nous avons utilisé la transposition avec un marqueur polymorphes (une série de polynucléotides ou tags) déjà mise au point pour l'étude de *Salmonella typhimurium* par David Holden, et avons isolé des mutants de *M. tuberculosis* ayant intégré le transposon et présentant un phénotype atténué chez la souris après infection ou dans les macrophages humains en culture. Plusieurs loci furent mis en évidence. Lun d'entre eux est l'ensemble de gènes impliqués dans la biosynthèse des mycocérosates.

IS6110, un élément génétique mobile utile au typage des souches et au diagnostic de la tuberculose

L'étude des éléments génétiques mobiles chez *M. tuberculosis* nous a aussi permis d'identifier un autre élément mobile IS6110 et qui a été utilisé pour typer les bacilles de la tuberculose. Il s'agit d'une séquence d'ADN que nous avons isolée en recherchant des séquences répétitives spécifiques d'espèce dans le but de découvrir une sonde diagnostique pour la tuberculose qui soit plus sensible, afin d'éviter l'utilisation de la technologie PCR encore couverte par un brevet. La séquence d'ADN que nous avons découverte en utilisant de l'ADN total marqué de *M. tuberculosis* pour cribler une banque de séquences d'ADN clonées chez *E.coli* nous a fait découvrir une séquence d'insertion grâce à ses éléments caractéristiques, séquence d'une transposase et éléments inversées bordant la séquence (que nous avons nommée IS6110) présente en différents nombres de copie mais aussi insérée à des endroits différents dans le chromosome de *M. tuberculosis* comme cela a été montré ensuite par le laboratoire de Jan Van Embden aux Pays Bas. Une coupure du chromosome de *M. tuberculosis* par un enzyme de restriction génère de nombreux fragments de tailles différentes qui peuvent être séparés par migration sur gel dans un champs électrique. Les fragments contenant tout ou partie d'une séquence

IS6110 peut être reconnu par hybridation avec une sonde marquée comprenant des séquences de *IS6110*, ce qui permet de générer une empreinte spécifique pour une famille de souches de *M. tuberculosis* qui ont peu ou pas évolué pendant un temps relativement court et récent de leur évolution au cours de transmissions successives. Une empreinte identique caractérise ainsi les souches faisant partie d'une chaîne de transmission récente entre malades tuberculeux. Ce typage que nous appelons moléculaire est utilisé pour suivre la transmission en traitant les malades avec la combinaison d'antibiotiques approprié pour la souche infectantes possiblement résistante aux antibiotiques et interrompre la transmission. Pour effectuer un typage permettant de comparer les souches du monde entier et ainsi étudier à grande échelle les chaînes de transmission et l'évolution des bacilles de la tuberculose concomitante avec l'évolution et les migrations humaines, il fallait standardiser la méthode de typage à utiliser et constituer des banques d'empreintes génomiques échangeables d'un laboratoire à l'autre, de même que des collections de souches bactériennes. Ces échanges internationaux ont été favorisés par un programme européen, dirigé par Jan Van Embden et rassemblant les laboratoires effectuant les typages des bacilles de la tuberculose et dont nous avons fait partie ainsi que nos collègues de Saragosse pour qui c'était le premier financement européen du laboratoire. Cette méthode qui a été beaucoup utilisée est maintenant remplacée par l'étude d'autres régions polymorphes et aussi par les SNPs détectés par séquençage des génomes entiers. Par contre, *IS6110* est toujours utilisé pour diagnostiquer l'infection tuberculeuse dans les tests PCR en raison de sa spécificité et du nombre multiple de copies de cet élément mobile augmentant la sensibilité des sondes.

Le candidat vaccin MTBVAC

Nos outils génétiques reposant sur l'utilisation d'un petit plasmide hybride comme vecteur contenant un marqueur de sélection positif et un marqueur de sélection négative, permet de réaliser une mutagénèse au hasard avec un transposon, mais aussi d'insérer des mutations de façon ciblée en utilisant des fragments de gènes modifiés. L'inactivation de gènes repérés par similarité de séquences avec des gènes connus chez d'autres bactéries furent inactivés

par échange allélique. Ainsi avons-nous ciblé le gène *phoP*, caractérisé chez d'autres bactéries comme régulateur positif de gènes de virulence, et qui s'avéra réguler un grand nombre de loci de virulence sans pour autant altérer la viabilité du bacille de la tuberculose dans des conditions de croissance in vitro dans des milieux nutritifs. Le gène *phoP* est donc aussi un gène majeur pour l'expression de la pathogénicité de *M. tuberculosis*. Après avoir inactivé le gène *phoP* chez *M. tuberculosis* nous avons montré que ce mutant *phoP* est capable de se multiplier dans des milieux de culture in vitro mais qu'il est affecté pour sa multiplication dans des cultures de macrophages in vitro et in vivo chez la souris et le cobaye après infection. Par contre, il est capable de protéger la souris et le cobaye d'une infection par la souche bacillaire virulente de *M. tuberculosis*. Des mutants auxotrophes dépourvus de voies de synthèse d'acides aminés se sont avérés incapables de se multiplier chez la souris. Cependant ils ne se sont pas avérés protecteurs contre une infection par *M. tuberculosis* de type sauvage. Le mutant *phoP* que nous avons créé s'est donc avéré un bon candidat pour la construction d'une souche vaccinale.

Le gène *phoP* est un gène majeur pour l'expression d'un grand nombre de gènes de virulence chez *M. tuberculosis* comme cela a été montré par d'autres laboratoires qui ont étudié le transcriptome d'un mutant *phoP* de *M. tuberculosis* en comparaison des transcrits chez la souche de type sauvage. Nous avons montré que certains gènes régulés par PhoP et impliqués dans la pathogénicité des bacilles de la tuberculose sont aussi importants pour la transmission des bacilles puisqu'une insertion d'une séquence d'insertion *IS6110* au niveau du promoteur du gène *phoP*, entraînant sa surexpression, a été observée chez une souche multirésistante aux antibiotiques (MDR pour multidrug resistant) de *M. tuberculosis* responsable d'une épidémie, et alors que de telles souches sont souvent affectées dans leur fitness et sont moins épidémiques que les souches de type sauvage. Il faut cependant dire qu'à l'époque de cette découverte en Espagne, il y avait beaucoup de malades tuberculeux infectés par le virus du SIDA parce que la tri-thérapie n'était pas encore mise au point et utilisée dans la thérapie contre le SIDA. La tuberculose était l'une des maladies opportunistes développées par les malades du SIDA et souvent celle qui signalait le passage du statut séro-positif au statut de malades chez les personnes infectées par le virus du SIDA. La mutation par insertion de *IS6110* retrouvée au niveau

du promoteur du gène *phoP* a pour conséquence d'augmenter l'expression du gène *phoP* et par conséquent d'augmenter l'expression des gènes de virulence qu'il contrôle et de provoquer une pathogénicité plus importante ainsi qu'une augmentation de la transmission de la tuberculose. L'inactivation de *phoP* est la base de l'atténuation du candidat vaccin MTBVAC aujourd'hui en cours d'essais cliniques d'efficacité de phase 3 chez les nouveau-nés en Afrique du Sud, à Madagascar et au Sénégal et en phases 1 et 2 de sécurité et d'immunogénicité chez les adolescents et les adultes en Afrique du Sud et en Inde.

Enfin une mutation supplémentaire a été introduite dans la souche vaccinale MTBVAC, il s'agit de l'inactivation de l'opéron responsable de la synthèse des dimycosérosates de phthiocérol (PDIM) et, des polysaccharides branchés qui sont localisés dans la paroi de *M. tuberculosis* et sont essentiels pour la virulence de *M. tuberculosis* comme nous l'avons montré lors de l'obtention d'une collection de mutants dépourvus de virulence chez la souris par transposition au hasard dans le génome. Nos résultats avaient confirmé les travaux de Pappachan Kolattukudy qui étudiait la biosynthèse des dimycosérosates et avait obtenus des mutants dépourvus de dimycosérosates qui s'étaient avérés avirulents.

La souche vaccinale MTBVAC est donc une souche atténuée de *M. tuberculosis* possédant deux mutations affectant des gènes de virulence, l'une d'entre elle entraînant la diminution drastique de l'expression d'un grand nombre de gènes de virulence et l'autre inactivant la production de polysaccharides de surface, indispensables à la pathogénicité du bacille. L'utilisation de plusieurs mutations réduit considérablement la possibilité de réversion vers un génotype virulent d'une souche atténuée utilisée comme vaccin. C'est une disposition répondant aux critères de sécurité recommandés par le consensus GINEBRA.

L'étude des réponses immunitaires protectrices induites après infection de souris par *M. tuberculosis* avait montré que seule la réponse anticorps n'est pas protectrice au contraire de la réponse cellulaire, surtout la réponse Th1 consistant en la différenciation et l'expansion de cellules T CD4+, qui est essentielle. L'étude des réponses immunitaires induites chez les animaux de laboratoire, souris, cobaye et macaques après vaccination par MTB-VAC a été effectuée par nos collègues de Saragosse en collaboration avec d'autres

équipes du consortium Européen TB-VAC que nous avons créé, ainsi qu'avec d'autres groupes comme celui de Mihai Netea qui avait mis en évidence la réponse entraînée induite par le BCG et consistant en une reprogrammation épigénétique de plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire ainsi qu'une modification du métabolisme cellulaire. La vaccination d'animaux de laboratoires, souris ou macaques rhésus, a montré une induction de la prolifération de cellules T CD4+ multifonctionnelles et produisant soit de l'IFN-gama, de l'IL-2, et du TNF-alpha soit de l'IFN-gama et de l'IL-2 pour les lymphocytes connus pour être protecteurs. Ces réponses sont dirigées contre des antigènes du complexe *M. tuberculosis* en particulier certains antigènes dominants absent du BCG. De plus une réponse immunitaire entraînée est observée chez la souris et les macrophages humains ayant phagocyté MTBVAC. Elle est aussi observée chez le macaque rhésus.

Les travaux réalisés pour la construction du candidat vaccin MTBVAC a bénéficié du consortium européen que nous avons créé. Il était composé de microbiologistes, d'immunologistes et d'experts dans les essais précliniques et cliniques de vaccins candidats contre la tuberculose. Deux plateformes d'essais pré-cliniques avec deux modèles animaux différents ont été mis en place, reposant sur les réponses immunitaires l'un de cobays et l'autre de macaques rhésus. Ces plateformes ont testé les candidats vaccins de notre consortium et les ont comparés entre eux, permettant de déterminer les priorités pour l'utilisation de modèles animaux puis de mises en place d'essais cliniques. C'est à ma connaissance le seul consortium qui a confrontés les résultats obtenus avec différents vaccins, permettant de diminuer la quantité d'animaux utilisée et aussi d'entamer des essais cliniques avec le vaccin candidat le plus prometteur. C'est ainsi que le candidat vaccin MTBVAC a pu être sélectionné et entamer l'odyssée des essais cliniques toujours en cours.

La recherche de nouveaux moyens thérapeutiques contre la tuberculose

La dernière odyssée que je mentionnerai est la recherche de nouvelles molécules anti-tuberculeuses. La recherche de nouveaux antibiotiques fut facilitée par notre installation en Chine à Shanghai puis à Shenzhen où la

nécessité d'éliminer la tuberculose est plus prégnante que dans d'autres pays développés en raison d'une incidence plus élevée qu'en France (50/100 000 habitants versus 7/100 000 habitants) et d'un pourcentage de multi-résistance aux antibiotiques aussi plus élevé. Nous avons isolé plusieurs candidats antibiotiques par criblage de banques de molécules issues de la chimie. L'une d'entre elle s'est avérée plus prometteuse avec une cible déjà connue. Il s'agit d'un composé comprenant une partie adamantane et une partie hydrazide-hydrazone dont la cible est Mmp13, un transporteur membranaire de lipides essentiels pour la pathogénicité du bacille de la tuberculose. Cette nouvelle molécule thérapeutique et ses dérivés continueront leur chemin, je l'espère, en association avec des partenaires industriels.

J'arrêterai là mon odysée dans ce monde des maladies infectieuses en espérant que les nouvelles avancées dans les domaines de la biologie comme de l'analyse des données par des intelligences artificielles permettront de faire des progrès définitifs dans le cas de la tuberculose comme cela a pu être fait pour la variole.

Je vous remercie de votre attention.

DISCURSO DE RECEPCIÓN

LA BÚSQUEDA DE NUEVAS
ESTRATEGIAS ANTIINFECCIOSAS
CONTRA LA TUBERCULOSIS,
UNA ODISEA ENTRE LOS MUNDOS
DE LA GENÉTICA BACTERIANA
Y DE LA INMUNOLOGÍA

POR LA

EXCMA. SRA. D^a BRIGITTE GICQUEL
ACADÉMICA DE HONOR

**LA BÚSQUEDA DE NUEVAS ESTRATEGIAS ANTIINFECCIOSAS
CONTRA LA TUBERCULOSIS, UNA ODISEA ENTRE LOS MUNDOS
DE LA GENÉTICA BACTERIANA Y LA INMUNOLOGÍA**

D^a Brigitte Gicquel

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina de Zaragoza;
Excelentísimos e Ilustrísimos miembros de la Academia;
Señoras y Señores,
Queridos amigos,

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Junta Directiva de esta Academia por proponerme como Académico de Honor de la Real Academia de Medicina de Zaragoza.

Hoy en día, solo hablamos de inteligencia artificial. En primer lugar, me gustaría hablar de otro tipo de inteligencia, la inteligencia aumentada. La inteligencia aumentada se define como la relación entre la suma de los resultados obtenidos por un grupo de personas que trabajan juntas y la suma de los resultados obtenidos por estas personas que trabajan por separado. Esta proporción suele ser superior a 1, lo que demuestra que se obtienen más resultados y más progreso cuando se ha trabajado con otros, y más aún si se viene de diferentes orígenes. Este tipo de inteligencia es la fuente de la mayoría de los descubrimientos científicos actuales. La actitud del investigador solitario que grita “Eureka” rara vez lo lleva a un gran descubrimiento. Además, un descubrimiento ha requerido muchas veces de varias herramientas tecnológicas que han conducido a la meta, después de un largo recorrido por diferentes ámbitos que yo describiría como una odisea, por los escollos encontrados en cada ocasión.

Me gustaría decir hoy cómo durante mi carrera científica, los diversos descubrimientos realizados por mi equipo de investigación han sido a menudo

el resultado de la inteligencia aumentada y también de reuniones no programadas de antemano.

Inicios a la sombra de los grandes científicos

Tuve el privilegio de llegar al Institut Pasteur para iniciar una tesis sobre la regulación de la expresión génica en la bacteria modelo *Escheriechia coli* en el antiguo laboratorio de Jacques Monod, que se había dividido en varios grupos, entre ellos el de Agnès Ullmann, con quien comencé mi tesis. La ingeniería genética estaba en auge, se acababan de descubrir las enzimas de restricción y, en el proceso, la clonación y la secuenciación del ADN. Así, pude completar mi tesis secuenciando el primer gen que regula al alza la expresión génica, el receptor AMP cíclico, también conocido como proteína CAP. Anteriormente había desarrollado la técnica para identificar genes clonados mediante el reconocimiento de su producto por anticuerpos en el laboratorio de Philippe Kourilsky. En ese momento, se pensó que sería posible avanzar rápidamente en el conocimiento de los genes de cualquier organismo vivo clonándolos en la bacteria modelo de *E. coli*, ya que el código genético es universal. De hecho, rápidamente nos encontramos con el primer obstáculo, los genes eucariotas tienen intrones, lo que no permite acceder a su expresión a partir de ningún fragmento clonado en *E. coli* donde los genes no tienen intrones (con algunas excepciones) y por lo tanto no tienen mecanismo para eliminarlos antes de la decodificación de los ARN mensajeros. A pesar de que el código genético es universal, la estructura de los genes no lo es. Habíamos clonado y expresado la beta-galactosidasa *de E. coli* mediante la construcción de un fago lambda recombinante que expresaba este gen en una bacteria que carecía de él, pero no pudimos expresar el gen de la ovoalbúmina de pollo que tenía intrones que bloquean la decodificación en sus intrones transcritos en ARN mensajero y que no maduraron antes de la lectura. Sin embargo, la mayoría de los investigadores se volcaron al estudio de los genes eucariotas y al desarrollo de organismos superiores, lo que permitió descubrir sus especificidades como los intrones, y luego otros tipos de regulación de la expresión desconocidos en los microorganismos en la época del Premio Nobel recibido por François Jacob, Jacques Monod y André Lwoff para el estudio de la regulación de la expresión

génica por represión de la transcripción. En aquella época, la regulación era la represión, como la describen nuestros tres premios Nobel franceses, estudiando la regulación del operón de la lactosa y la lisogenia del fago Lambda, dos sistemas bacterianos. El estudio de la regulación de la expresión génica en organismos multicelulares mostró que no siempre se trataba de un mecanismo de represión, sino a menudo de un mecanismo de inducción por un regulador positivo e incluso a veces de reordenamientos genéticos de células somáticas, como lo demostraron muy pronto Barbara MacClintoch con el maíz y luego Susumu Tonegawa con células productoras de anticuerpos en mamíferos.

La elección de *Mycobacterium tuberculosis* como objeto de estudio

En la década de 1980, especialmente en el campo de la medicina, el estudio de la microbiología ya no estaba de moda, ya que el descubrimiento de varios antibióticos de diferentes clases de moléculas daba esperanzas de una cura para todas las enfermedades de origen bacteriano. Ahora sabemos que no fue así y que una enfermedad bacteriana como la tuberculosis está lejos de ser erradicada. Incluso es el patógeno que más muertes causa en el mundo fuera de años de epidemia como la del COVID 19 recientemente. En el decenio de 1980, decidí, un poco a contracorriente, centrarme en los microorganismos patógenos y, en particular, en *M. tuberculosis*, que es responsable de la tuberculosis humana y que todavía causa alrededor de 1,5 millones de muertes al año y la infección de aproximadamente 1/3 de la población mundial, que por lo tanto sigue en riesgo de tuberculosis. En la década de 1980 surgió la epidemia del SIDA, una enfermedad que aún no ha sido erradicada debido a la falta de posibilidad de desarrollar una vacuna eficaz. La inmunodeficiencia inducida por el SIDA aumenta la transición del bacilo de la tuberculosis a los pacientes con tuberculosis, lo que ha aumentado drásticamente la incidencia de la tuberculosis. Los virus del SIDA son altamente polimórficos y su diversidad aumenta constantemente después de cada infección, frustrando las respuestas inmunitarias inducidas que son específicas. El éxito de la aplicación de la triple terapia ha reducido considerablemente el número de pacientes, que sin embargo siguen infectados y dependen de la terapia de por vida. Para vencer a la tuberculosis, un tratamiento estandarizado de seis meses es eficaz

si se sigue bien. Recientemente, existe un tratamiento oral de seis meses para la tuberculosis multirresistente (MDR-TB), que incluye un nuevo antibiótico, así como otros antibióticos que aún no se utilizan para la tuberculosis. Sin embargo, la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública debido a las dificultades que enfrentan los pacientes para acceder a la atención y al seguimiento necesario para un tratamiento que dura varios meses y la aparición de resistencia a los antibióticos sigue presente.

Por lo tanto, una vacuna que sea más eficaz que la BCG contra la tuberculosis sigue siendo una prioridad. El trabajo que realizamos en la década de 1980 condujo al desarrollo de enfoques genéticos que permitieron identificar los factores de virulencia bacilar y construir un candidato vacunal, MTBVAC, con nuestros colegas españoles aquí presentes. En este trabajo también se caracterizaron elementos genéticos móviles, uno de los cuales se utilizó para la tipificación de bacilos de tuberculosis y todavía se utiliza como sonda para el diagnóstico de tuberculosis. A continuación describiré este trabajo.

Un plásmido híbrido para la transferencia de genes en micobacterias

Para transferir genes a micobacterias y realizar la recombinación genética, se necesitaba un vector, lo que se hizo en nuestro laboratorio. Los encuentros de un equipo portugués, el de Maria-Odette Santos Ferrera en Lisboa, que más tarde descubrió el VIH2, y el de José Moniz, que vino a hacer su tesis con Hugo David, jefe de la Unidad de Micobacterias del Instituto Pasteur, fueron decisivos para que me diera cuenta de que el mundo de las micobacterias no solo incluía patógenos como *M. tuberculosis*, sino también especies no patógenas de rápido crecimiento como *M. smegmatis*, las cuales pueden permitir la replicación de micófitos o plásmidos. Daisy Roulland-Dussoix y Abdel Akim Labidi, del laboratorio de Hugo David, acababan de aislar el plásmido pAL5000 de *M. fortuitum*, otra micobacteria de rápido crecimiento. Pudimos construir un plásmido híbrido con pAL500 y el plásmido pBR322 que se replica en *E. coli*. Luego pudimos transferir este híbrido a *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* gracias a la electroporación, que el equipo de Bill Jacob en Nueva York había demostrado ser efectiva en la transferencia de genes en micobacterias. Así que parecía que el escenario estaba listo para un viaje de micobacterias con

enfoques genéticos que desarrollamos en *E. coli* y otras bacterias modelo como *M. smegmatis* para micobacterias. Así que presenté mi primera solicitud de crédito para secuenciar el pequeño plásmido pAL5000 y construir herramientas genéticas para el estudio de *M. tuberculosis*. Para lograrlo, se tardó mucho más de lo esperado, visto desde hoy ya que nos llevó más de un año secuenciar tan solo 5.000 pares de bases. De hecho, el genoma de las micobacterias es rico en G+C y los protocolos y pruebas de secuenciación tuvieron que ser modificados. Además, la secuenciación era manual y aún no se había desarrollado la técnica de PCR. En la década de 1980, se necesitaba mucho esfuerzo para secuenciar 5.000 pares de bases, mientras que hoy en día es posible secuenciar el ADN antiguo aislado de restos prehistóricos y podemos secuenciar varios miles de millones de pares de bases en un solo día!

El conocimiento de la secuencia del genoma del plásmido pAL5000 facilitó la construcción de un vector híbrido con el plásmido pBR322 cuya secuencia genómica se conocía. A este vector híbrido se le añadieron un marcador de selección positivo y un marcador de selección negativo. El marcador de selección positiva es un gen de resistencia a antibióticos que aísla las bacterias que han insertado el casete de ADN portador de este gen de resistencia a antibióticos y confiere un fenotipo de resistencia al antibiótico utilizado. El marcador de selección negativa es un marcador de contra selección como el gen del *sacB* que permite, en presencia de sacarosa, aislar bacterias recombinantes que han insertado el fragmento de ADN portador del marcador de selección positivo, pero que se han deshecho del vector portador del gen *del sacB* que causa la muerte de la bacteria en presencia de sacarosa (el gen *del sacB* es responsable de la formación de polímero de sacarosa que es tóxico para las bacterias). Lo único que quedaba era incluir un elemento genético móvil para realizar la mutagénesis mediante la inserción aleatoria de este elemento para buscar genes implicados en diferentes fenotipos o insertar ciertos genes modificados para estudiar sus funciones.

Transposición en micobacterias

En la década de 1980, la posibilidad de estudiar el bacilo de la tuberculosis y su poder patógeno fue una pequeña revolución, y nuestro trabajo en ese

momento, que avanzaba más lentamente de lo esperado, nos dio mucha visibilidad desde el principio. Quedaba por dar el paso clave, el aislamiento de los mutantes que afectan a las funciones de patogenicidad del bacilo de la tuberculosis y su identificación. Todavía estábamos muy lejos del método CRISP R/CAS9 y había pocas secuencias genómicas de ADN disponibles. Recurrimos a elementos genéticos móviles que podían inactivar genes insertándose aleatoriamente en el cromosoma. Estos elementos móviles a menudo se asocian con resistencia a los antibióticos, que se pueden utilizar como marcador para detectar la inserción de estos elementos y la ubicación en el genoma donde se han insertado. Por lo tanto, para aislar estos elementos móviles de las micobacterias, recurrimos a la resistencia a los antibióticos, que a menudo se asocia con elementos genéticos móviles como los transposones. Allí nos hemos reunido hoy con nuestros colegas españoles.

Mi grupo de investigación formaba parte del laboratorio de Julian Davies que estudiaba la resistencia a los antibióticos. Julián acababa de regresar de una reunión en la que se había reunido con Rafael Gómez Luz, quien había descubierto las actividades acetiltransferasas o fosfotransferasas responsables de la resistencia a los antibióticos en micobacterias de crecimiento rápido, lo que sugería la existencia de transposones en esta familia de bacterias. Rápidamente nos pusimos en contacto con Don Rafael y comenzó una colaboración muy rápidamente, una colaboración que aún hoy continúa

En *M. tuberculosis* solo se ha descrito resistencia a antibióticos cromosómicos que no son transferibles horizontalmente. Corresponden a cambios en la diana de los antibióticos y no a genes que codifican funciones que modifican o inactivan los antibióticos y generalmente están localizados en elementos genéticos móviles. Por lo tanto, fue interesante explorar la hipótesis de un elemento genético móvil asociado con la resistencia a antibióticos en *M. tuberculosis* u otras micobacterias, tanto para el estudio de la resistencia a antibióticos en estas especies bacterianas como para buscar transposones que sean activos en micobacterias y, por lo tanto, útiles para iniciar estudios genéticos en estas especies bacterianas.

Nos pusimos en contacto con Don Rafael Gómez Lus, quien nos presentó a un investigador de su equipo, Carlos Martín, que podría venir a París a

trabajar en este tema. Muy pronto volé a Zaragoza y acordamos que Carlos Martín vendría a París con una beca que se pediría a la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO). Se concedió una beca para tres meses de estancia. Posteriormente Carlos estuvo en el laboratorio durante 2 años más como becario postdoctoral con una beca de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y luego como investigador permanente en el Instituto Pasteur. En total, Carlos permaneció allí durante cinco años. Vino con su esposa María José Iglesias, epidemióloga que trabajaba en un equipo del INSERM. Se fueron con una familia aumentada, con su hijo, Carlos, que nació en París. Durante los cinco años, construimos las herramientas genéticas que nos permitieron iniciar estudios genéticos en micobacterias y luego construir una vacuna candidata contra la tuberculosis, que todavía se estudia hoy en Zaragoza.

Cuando Carlos llegó al laboratorio para buscar elementos móviles que pudieran ser detectados por su asociación con genes de resistencia a antibióticos, juntos descubrimos el primer elemento móvil funcional en micobacterias. Para ello, se utilizaron sondas de ADN correspondientes a genes de resistencia a antibióticos de otros transposones aislados de especies no micobacterianas, responsables de la diseminación horizontal de la resistencia a los antibióticos en el mundo bacteriano, que es la base de la transmisión nosocomial de infecciones resistentes a antibióticos. Utilizando estas sondas de ADN de resistencia a antibióticos, aislamos un fragmento de ADN de una micobacteria, pero no contenía un gen de resistencia correspondiente a las sondas que utilizamos. Fue una sorpresa, que al secuenciar un fragmento más grande de la región genómica hibridándose con las sondas, descubrimos la secuencia de una transposasa. Esta transposasa formaba parte de un transposón que contenía un solo gen de resistencia a los antibióticos, la resistencia a la sulfonamida. En realidad, se trataba de un transposón ancestral de la familia *Tn21* que incluye transposones con resistencia a antibióticos correspondientes a las sondas que habíamos utilizado, además de resistencia a sulfonamidas. Esto fue posible porque en ese momento no teníamos la tecnología de PCR para usar sondas más pequeñas y precisas. Esa es la región adyacente al tubo de antibiótico, un fragmento de la transposasa que habíamos detectado.

Por lo tanto, fue un poco por azar o serendipia que identificamos el primer transposón micobacteriano que resultó ser funcional. La transposición utilizada en micobacterias y más concretamente en *M. tuberculosis* nos permitió iniciar una aproximación genética a la virulencia y caracterizar muchos loci de virulencia que todavía hoy se estudian en laboratorios. Para ello, utilizamos la transposición con un marcador polimórfico (una serie de polinucleótidos o tags) ya desarrollado para el estudio de *Salmonella typhimurium* por David Holden, y se aislaron mutantes de *M. tuberculosis* que habían integrado el transposón y tenían un fenotipo atenuado en ratones tras la infección o en macrófagos humanos cultivados. Se identificaron varios loci. Uno de ellos es el conjunto de genes implicados en la biosíntesis de lípidos micocerosatos (PDIM).

***IS6110*, un elemento genético móvil útil para la tipificación de cepas y el diagnóstico de tuberculosis**

El estudio de los elementos genéticos móviles en *M. tuberculosis* también permitió identificar otro elemento móvil, *el IS6110*, que se utilizó para tipificar los bacilos de la tuberculosis. Se trata de una secuencia de ADN que aislamos mediante la búsqueda de secuencias repetitivas específicas de la especie con el objetivo de descubrir una sonda diagnóstica más sensible para la tuberculosis, evitando el uso de la tecnología de PCR aún cubierta por una patente. La secuencia de ADN que descubrimos utilizando ADN total marcado de *M. tuberculosis* para examinar una biblioteca de secuencias de ADN clonadas en *E. coli* condujo al descubrimiento de una secuencia de inserción (a la que llamamos *IS6110*) presente en diferentes números de copias, pero también insertada en diferentes lugares del cromosoma de *M. tuberculosis* como se demostró más tarde en el laboratorio de Jan Van Embden en los Países Bajos.

Una ruptura del cromosoma de *M. tuberculosis* por una enzima de restricción genera muchos fragmentos de diferentes tamaños que pueden separarse por migración de gel en un campo eléctrico. Los fragmentos que contienen la totalidad o parte de una secuencia *de IS6110* puede reconocerse por hibridación con una sonda marcada que contiene secuencias de *IS6110*, lo que permite la generación de una huella dactilar específica para una familia

de *cepas de M. tuberculosis* que han evolucionado poco o nada durante un tiempo relativamente corto y reciente de su evolución durante transmisiones sucesivas. De este modo, una huella dactilar idéntica caracteriza a las cepas que forman parte de una cadena reciente de transmisión entre enfermos de tuberculosis. Este tipo de epidemiología molecular es de especial interés para el estudio de cepas multirresistentes, así como para estudiar a gran escala las cadenas de transmisión y la evolución de los bacilos de la tuberculosis concomitantes con la evolución y migración humana. Para ello fue necesario estandarizar el método de tipado y establecer bancos de huellas genómicas que pudieran intercambiarse de un laboratorio a otro, así como colecciones de cepas bacterianas. Estos intercambios internacionales fueron fomentados por un programa europeo, dirigido por Jan Van Embden y que reunía a los laboratorios que realizaban la tipificación de bacilos tuberculosos y del que formábamos parte, así como a nuestros compañeros de Zaragoza para los que esta fue la primera financiación europea del laboratorio. Este método, que ha sido ampliamente utilizado, está siendo sustituido ahora por el estudio de otras regiones polimórficas y también por SNPs detectados por secuenciación del genoma completo. Por otro lado, *IS6110* todavía se utiliza para diagnosticar la infección tuberculosa en pruebas de PCR debido a su especificidad y al número de copias múltiples de este elemento móvil que aumenta la sensibilidad de las sondas.

La vacuna candidata MTBVAC

Nuestras herramientas genéticas, basadas en el uso de un plásmido híbrido como vector que contiene un marcador de selección positivo y otro negativo, permitieron realizar mutagénesis aleatoria con un transposón, pero también insertar mutaciones de forma selectiva utilizando fragmentos de genes modificados. La inactivación de genes identificados por similitud de secuencia con genes conocidos en otras bacterias fue inactivada por intercambio alélico. Por lo tanto, nos dirigimos al gen *phoP*, que se ha caracterizado en otras bacterias como un regulador positivo de los genes de virulencia y que se ha demostrado que regula un gran número de loci de virulencia sin alterar la viabilidad del bacilo de la tuberculosis en condiciones de crecimiento in vitro

en medios nutritivos. Por lo tanto, el gen *phoP* es también un gen importante para la expresión de la patogenicidad de *M. tuberculosis*. Tras inactivar el gen *phoP* en *M. tuberculosis*, demostramos que este mutante *phoP* es capaz de multiplicarse en medios de cultivo in vitro, pero que se ve afectado por su multiplicación en cultivos de macrófagos in vitro e in vivo en ratones y cobayas tras la infección. Sin embargo, es capaz de proteger a ratones y cobayas de la infección por la virulenta cepa bacilar de *M. tuberculosis*. Se encontró que los mutantes auxotróficos que carecían de vías de síntesis de aminoácidos no podían multiplicarse en ratones. Sin embargo, no se ha demostrado que protejan contra la infección por *M. tuberculosis de tipo salvaje*. Por lo tanto, el mutante *phoP* que habíamos creado demostró ser un buen candidato para la construcción de una cepa vacunal.

El gen *phoP* es un gen importante para la expresión de un gran número de genes de virulencia en *M. tuberculosis*, como han demostrado otros laboratorios que han estudiado el transcriptoma de un mutante *phoP* de *M. tuberculosis* en comparación con las transcripciones en la cepa de tipo salvaje. Hemos demostrado que ciertos genes regulados por PhoP e implicados en la patogenicidad de los bacilos de la tuberculosis también son importantes para la transmisión de bacilos, ya que se observó una inserción de una secuencia de *inserción IS6110* en el promotor del gen *phoP* que conduce a su sobreexpresión en una cepa multirresistente (MDR) de *M. bovis* responsable de una epidemia, mientras que estas cepas a menudo se ven afectadas en su aptitud y son menos epidémicas que las cepas de tipo salvaje. Hay que decir, sin embargo, que en el momento de este descubrimiento en España, había muchos enfermos de tuberculosis infectados con el virus del SIDA porque la triple terapia aún no se había desarrollado ni utilizado en la terapia del SIDA. La tuberculosis era una de las enfermedades oportunistas desarrolladas por los enfermos de SIDA y, a menudo, la que señalaba la transición del estado seropositivo al estado enfermo en las personas infectadas por el virus del SIDA. La mutación de inserción de *IS6110* encontrada en el promotor del gen *phoP* da lugar a un aumento de la expresión del gen *phoP* y, en consecuencia, a un aumento de la expresión de los genes de virulencia que controla, provocando una mayor patogenicidad y un aumento de la transmisión de la tuberculosis. La inactivación de *phoP* es la base para la atenuación de la vacuna candidata

MTBVAC que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de eficacia de fase 3 en neonatos en Sudáfrica, Madagascar y Senegal y en ensayos de seguridad e inmunogenicidad de fase 1 y 2 en adolescentes y adultos en Sudáfrica y la India.

Por último, se introdujo una mutación adicional en la cepa vacunal MTBVAC, a saber, la inactivación del operón responsable de la síntesis de ftiocerol dimicoserosatos (PDIM) y polisacáridos ramificados que se encuentran en la pared de *M. tuberculosis* y son esenciales para la virulencia de *M. tuberculosis* como hemos demostrado al obtener una colección de mutantes carentes de virulencia en ratones mediante transposición aleatoria al genoma. Nuestros resultados confirmaron el trabajo de Pappachan Kolattukudy, quien estudió la biosíntesis de dimicoserosatos, y obtuvo mutantes que carecían de dimicoserosatos y que resultaron ser avirulentos.

La cepa vacunal MTBVAC es, por tanto, una cepa atenuada de *M. tuberculosis* con dos mutaciones que afectan a los genes de virulencia, una de las cuales conduce a una disminución drástica de la expresión de un gran número de genes de virulencia y la otra inactiva la producción de polisacáridos de superficie, esenciales para la patogenicidad del bacilo. El uso de mutaciones múltiples reduce significativamente la posibilidad de reversión a un genotipo virulento de una cepa atenuada utilizada como vacuna. Es una disposición que cumple con los criterios de seguridad recomendados por el consenso de Ginebra.

El estudio de las respuestas inmunes protectoras inducidas después de la infección de ratones con *M. tuberculosis* ha demostrado que solo la respuesta de anticuerpos no es protectora a diferencia de la respuesta celular, especialmente la respuesta Th1 que consiste en la diferenciación y expansión de las células T CD4+ que es esencial. El estudio de las respuestas inmunitarias inducidas en animales de laboratorio, ratones, cobayas y macacos tras la vacunación con MTBVAC fue llevado a cabo por nuestros compañeros de Zaragoza en colaboración con otros equipos del consorcio europeo TBVAC que habíamos creado, así como con otros grupos como el de Mihai Netea que había destacado la respuesta inducida por BCG y consistente en una reprogramación epigenética de varios genes implicados en la respuesta así como un cambio en el metabolismo celular. La vacunación de animales de laboratorio, ratones o

macacos rhesus, mostró una inducción de la proliferación de células T CD4+ que son multifuncionales y producen IFN-gama, IL-2 y TNF-alfa o IFN-gama e IL-2 para los linfocitos que se sabe que son protectores. Estas respuestas se dirigen contra los antígenos del complejo *M. tuberculosis*, en particular ciertos antígenos dominantes ausentes de la BCG. Además, se observa una respuesta inmunitaria entrenada en ratones y macrófagos humanos que han fagocitado MTBVAC. También se observa en macacos rhesus.

El trabajo realizado para la construcción de la vacuna candidata MTBVAC se ha beneficiado del consorcio europeo que hemos creado. Estaba compuesto por microbiólogos, inmunólogos y expertos en ensayos preclínicos y clínicos de vacunas candidatas contra la tuberculosis. Se han creado dos plataformas de ensayos preclínicos con dos modelos animales diferentes, basadas en las respuestas inmunitarias de cobayas y macacos rhesus. Estas plataformas probaron los candidatos vacunales de nuestro consorcio y los compararon entre sí, lo que permitió determinar prioridades para el uso de modelos animales y luego para la implementación de ensayos clínicos. Que yo sepa, es el único consorcio que ha comparado los resultados obtenidos con diferentes vacunas, lo que ha permitido reducir la cantidad de animales utilizados y también iniciar ensayos clínicos con la candidata vacunal más prometedora. Así fue como se seleccionó la vacuna candidata MTBVAC y comenzó la odisea de ensayos clínicos que aún están en curso.

La búsqueda de nuevos medios terapéuticos contra la tuberculosis

La última odisea que mencionaré es la búsqueda de nuevas moléculas anti-tuberculosas. La búsqueda de nuevos antibióticos se vio facilitada por nuestra instalación en China, en Shanghái y luego en Shenzhen, donde la necesidad de eliminar la tuberculosis es más importante que en otros países desarrollados debido a una mayor incidencia que en Francia (50/100.000 habitantes frente a 7/100.000 habitantes) y un mayor porcentaje de resistencia a múltiples antibióticos. Hemos aislado varios candidatos a antibióticos mediante el cribado de bibliotecas de moléculas derivadas de la química. Uno de ellos resultó ser más prometedor con un objetivo ya conocido. Es un compuesto por una parte de adamantano y una parte de hidrazida-hidrazona cuya diana es Mmpl3,

DISCURSO DE RECEPCIÓN

un transportador de lípidos de membrana esencial para la patogenicidad del bacilo de la tuberculosis. Espero que esta nueva molécula terapéutica y sus derivados continúen su viaje en asociación con socios industriales.

Este es el final de mi odisea en el mundo de las enfermedades infecciosas, con la esperanza de que los nuevos avances en los campos de la biología y el análisis de datos mediante inteligencia artificial permitan avanzar definitivamente en el caso de la tuberculosis, como se hizo con la viruela.

Gracias por su atención.

